

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΠΟΤΩΝ



«Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών
συγκεντρώσεων αδιάστατου οξικού
οξέος στην οξεοανθεκτικότητα
διαφόρων ορότυπων και στελεχών του
παθογόνου μικροοργανισμού
Salmonella spp.»

Μεταπτυχιακή διατριβή

Αδαμαντία Δ. Παπαϊωάννου
[Αθήνα, 2018]

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

“ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ”

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Επιβλέπων καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΠΟΤΩΝ

«Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων αδιάστατου οξικού οξέος στην οξεοανθεκτικότητα διαφόρων ορότυπων και στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp.»

Μεταπτυχιακή διατριβή

Αδαμαντία Δ. Παπαϊωάννου

Αθήνα, 2018

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

“ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ”

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Επιβλέπων καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης

Μεταπτυχιακή διατριβή

Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων αδιάστατου οξικού οξέος στην οξεοανθεκτικότητα διαφόρων ορότυπων και στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp.

Αδαμαντία Δ. Παπαϊωάννου

Επιβλέπων καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης

Εξεταστική επιτροπή:
Σκανδάμης Παναγιώτης
Δροσινός Ελευθέριος
Πανάγου Ευστάθιος

Περίληψη

Σύμφωνα με τα στοιχεία της Ευρωπαϊκής Αρχής Ασφάλειας των Τροφίμων και του Ευρωπαϊκού Κέντρου Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων, η σαλμονέλωση αποτελεί τη δεύτερη συχνότερα εμφανιζόμενη τροφιμογενή αιτία νοσηλείας στην ΕΕ. Το 95% των σαλμονελώσεων είναι τροφιμογενείς, ενώ μεγάλο ποσοστό των κρουσμάτων που έχουν καταγραφεί προέρχεται από κατανάλωση σπιτικής μαγιονέζας.

Η μαγιονέζα είναι ένα τρόφιμο που χρησιμοποιείται ως βάση για σάλτσες ή καταναλώνεται ως έχει. Η χρήση οργανικών οξέων, όπως το οξικό οξύ, κατά την παραγωγή μαγιονέζας αποτρέπει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Παρόλα αυτά, σε σάλτσες με βάση τη μαγιονέζα έχουν βρεθεί παθογόνα βακτήρια όπως *Salmonella*, *E.coli* και *S.aureus*, σε πληθυσμούς της τάξεως του 10^2 - 10^4 cfu/ml. Επιπλέον, έχουν καταγραφεί πολλά κρούσματα από *Salmonella* spp. και *E. coli* τα οποία συσχετίστηκαν με την κατανάλωση μαγιονέζας. Η εγγενής οξεοανθεκτικότητα αυτών των μικροβιακών κυττάρων είναι δυνατό να ενισχυθεί μετά από σύντομη έκθεση σε ήπιο pH, με την επαγωγή του φαινομένου, που είναι γνωστό ως Acid Tolerance Response (ATR).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση υποθανάτιων συγκεντρώσεων οξικού οξέος και τιμών pH στην οξεοανθεκτικότητα έξι διαφορετικών στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. (3 στελέχη *Salmonella* ser. Enteritidis και 3 στελέχη *Salmonella* ser. Typhimurium) μετά από έκθεση σε εμπορικές συσκευσίες μαγιονέζας. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν ήταν τρεις: 15mM οξικού οξέος και pH 5.0, 35mM οξικού οξέος και pH 5.5 και 45mM οξικού οξέος και pH 6.0.

Οι μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ των μη προσαρμοσμένων και προσαρμοσμένων κυττάρων εντοπίστηκαν για τα στελέχη *Salmonella* ser. Enteritidis ATCC 13076 και WT. Η επίδραση του κάθε παράγοντα (pH και συγκέντρωση αδιάστατου οξικού οξέος) στην οξεοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών ήταν διαφορετική και εξαρτώμενη από το εξεταζόμενο στέλεχος. Διαφορετική ήταν, επίσης, και η ανθεκτικότητα του κάθε στελέχους στη μαγιονέζα. Τέλος, ο ρυθμός θανάτωσης ήταν διαφορετικός ανάμεσα στα διάφορα στελέχη και στις περισσότερες περιπτώσεις,

ανεξάρτητος από την ικανότητα προσαρμογής του κάθε στελέχους. Τα στελέχη *Salmonella* ser. Enteritidis ATCC 13076 και *Salmonella* ser. Enteritidis WT αποδείχθηκαν τα λιγότερα ανθεκτικά, φτάνοντας στο όριο ανίχνευσης μέσα σε λιγότερο από 48 ώρες. Αντίθετα, τα στελέχη *Salmonella* ser. Typhimurium 4/74, *Salmonella* ser. Typhimurium FS8, *Salmonella* ser. Enteritidis PT4 P1678707 και *Salmonella* ser. Typhimurium FS115 εμφάνισαν μεγαλύτερα οξεοανθεκτικότητα.

Εν κατακλείδι, η προσαρμογή σε υποθανάτιες συνθήκες οξικού οξέος και χαμηλών τιμών pH είναι πιθανό να επηρεάσει την οξεοανθεκτικότητα του παθογόνου *Salmonella* spp. και να ενισχύσει την μετέπειτα επιβίωση του σε προϊόντα εμπορικής μαγιονέζας. Ωστόσο, η ικανότητα προσαρμογής παραλλάσει ανάλογα με τις συνθήκες προσαρμογής και το εξεταζόμενο στέλεχος.

Abstract

According to EFSA and ECDC, salmonellosis is the second most frequent cause of reported hospitalisations in confirmed human cases. 95% of human cases of salmonellosis are foodborne. A high percentage of these incidents are related to consumption of home made mayonnaise.

Mayonnaise can be used as basis for dressings, but it can also be consumed as such. The use of organic acids, such as acetic acid can prevent the growth of pathogens in such products. However, pathogens such as *Salmonella*, *E.coli* και *S.aureus* have been isolated from mayonnaise based sauces, in populations as high as 10^2 - 10^4 cfu/ml. Moreover, *Salmonella* spp. και *E. coli* have been associated to incidents caused by the consumption of mayonnaise. The intrinsic acid tolerance of these microorganisms can be enhanced during a short term exposure mild acidic environment, through the induction of the so-called Acid Tolerance Response (ATR) mechanism.

This study aims to investigate the effect of sublethal Acetic Acid (AA) concentrations and pH on the acid tolerance of six *Salmonella* strains (3 strains of the serotype *Salmonella* ser. Enteritidis and 3 strains of the serotype *Salmonella* ser. Typhimurium) after exposure in commercial mayonnaise. For this purpose, three different combinations of AA concentration/pH were used: 15mM AA and pH 5.0, 35mM AA και pH 5.5 και 45mM AA και pH 6.0.

The most remarkable differences between unadapted and adapted cells were noted for *Salmonella* ser. Enteritidis ATCC 13076 and *Salmonella* ser. Enteritidis WT. The effect of the different agents (pH and concentration of undissociated AA) on the acid tolerance varied among the different strains. Besides, some strains appeared to be more susceptible in this medium (mayonnaise) than others. The inactivation rate was also different among the strains used and in most cases independent from the ability of each strain to adapt in acidic conditions. The less tolerant strains appeared to be *Salmonella* ser. Enteritidis ATCC 13076 and *Salmonella* ser. Enteritidis WT. These strains survived for almost 48 hours. In the contrary the following strains demonstrated a better ability to survive the acidic conditions: *Salmonella* ser.

Typhimurium 4/74, *Salmonella* ser. Typhimurium FS8, *Salmonella* ser. Enteritidis PT4 P1678707 και *Salmonella* ser. Typhimurium FS115.

In conclusion, acid adaptation in low pH and various concentrations of undissociated AA could enhance the acid tolerance for pathogen *Salmonella* spp., as well as its ability to survive in commercial mayonnaise. However, this ability varies among different strains and in different conditions.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
Abstract	5
1. Εισαγωγή	9
1.1. <i>Salmonella</i> spp.....	9
1.1.1. Χαρακτηριστικά του βακτηρίου <i>Salmonella</i> spp.....	9
1.1.2. Ονοματολογία	10
1.2. Σαλμονέλωση	13
1.2.1. Επιδημιολογία της σαλμονέλλωσης	13
1.2.2. Συμπτωματολογία της σαλμονέλλωσης	15
1.2.3. Τα «οχήματα» μεταφοράς του παθογόνου <i>Salmonella</i> spp. στον ανθρώπινο οργανισμό	16
1.2.4. Επιβίωση της σαλμονέλλας σε τρόφιμα χαμηλού pH	17
1.2.5. Κρούσματα σχετιζόμενα με την κατανάλωση αυγών και μαγιονέζας.....	18
1.2.6. Μέτρα ελέγχου	19
1.3. Μαγιονέζα	20
1.3.1. Ορισμός και τεχνολογικά χαρακτηριστικά.....	20
1.3.2. Μικροβιακή σταθερότητα της εμπορικής μαγιονέζας	21
1.4. Συντήρηση τροφίμων – η χρήση των οργανικών οξέων	23
1.4.1. Γενικά για τη συντήρηση των τροφίμων.....	23
1.4.2. Οργανικά οξέα και η δραστηκότητα τους.....	25
1.4.3. Μηχανισμός δράσης των ασθενών οργανικών οξέων.....	27
1.5. Το βακτήριο <i>Salmonella</i> spp. και το φαινόμενο απόκρισης στο όξινο στρες (ATR).....	28
1.5.1. Το στρες στη ζωή των μικροβιακών κυττάρων	28
1.5.2. Οξεοανθεκτικότητα και το φαινόμενο απόκρισης στο όξινο στρες	29
1.5.3. Παράγοντες που επηρεάζουν το φαινόμενο απόκρισης στο όξινο στρες (ATR).....	36
1.5.4. Διαφοροποίηση μεταξύ στελεχών	38
1.6. Σκοπός της μελέτης	39
2. Υλικά και μέθοδοι	41
2.1. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν.....	41
2.2. Επιλογή των πειραματικών συνθηκών	42
2.3. Πειραματική διαδικασία	43
2.4. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	46

3. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	47
3.1. Αποτελέσματα	47
3.1.1. Φυσικοχημικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά της εμπορικής συσκευασίας μαγιονέζας	47
3.1.2. Επίδραση των συνθηκών προσαρμογής στην οξεοανθεκτικότητα των διαφορετικών στελεχών.....	47
3.1.3. Επίδραση του διαφορετικού παράγοντα (pH ή αδιάστατο οξικό οξύ) στην οξεοανθεκτικότητα.....	55
3.2. Συζήτηση.....	57
Παράρτημα.....	62
Βιβλιογραφία	69

1. Εισαγωγή

1.1. *Salmonella* spp.

1.1.1. Χαρακτηριστικά του βακτηρίου *Salmonella* spp.

Το γένος *Salmonella* ανήκει στα παθογόνα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Πρόκειται για προαιρετικά αναερόβιο, gram-αρνητικό, ραβδόμορφο βακτήριο, το οποίο φέρει βλεφαρίδες. Τα βακτήρια του γένους *Salmonella* μπορούν να αναπτυχθούν κάτω από διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες, εντός ή εκτός ξενιστή. Η παρουσία χλωριούχου νατρίου δεν είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη τους, αλλά διατηρούν την ικανότητα ανάπτυξης σε συγκεντρώσεις NaCl από 0,4 ως 4% (Pui et al., 2011). Επιπλέον, η ανοχή του βακτηρίου στο αλάτι αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας στους 10 έως 30 °C.



Εικόνα 1. *Salmonella* spp.

Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 35-37°C. Αναπτύσσονται γενικά σε θερμοκρασίες 5 έως και 47°C, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις ανάπτυξης σε πολύ χαμηλές (2-4 °C) ή πολύ υψηλές θερμοκρασίες (54°C). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι κύτταρα του βακτηρίου *Salmonella* spp., που διατηρήθηκαν για κάποιο χρονικό διάστημα σε χαμηλές θερμοκρασίες, αύξησαν σημαντικά την ικανότητα επιβίωσης και ανάπτυξης σε τρόφιμα που διατηρήθηκαν σε θερμοκρασίες ψύξης. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και στις πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Μάλιστα, βρέθηκε ότι δύο μεταλλάξεις των γονιδίων (*ttl* και *mth*) παίζουν ρόλο στην προσαρμοστική ικανότητα της σαλμονέλας σε θερμοκρασίες 48°C και 54°C, αντίστοιχα (Doyle and Beuchat, 2007). Το εύρος pH στο οποίο μπορεί να αναπτυχθεί

ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός κυμαίνεται μεταξύ 4,5-9,5, με άριστες τιμές pH από 6,5 έως 7,5. Παρόλα αυτά, το βακτήριο *Salmonella* spp. χρησιμοποιεί και πάλι μηχανισμούς προσαρμογής που του επιτρέπουν να επιβιώνει σε συνθήκες εκτός του εύρους αυτού. Τέλος, για την ανάπτυξη του χρειάζονται υψηλές τιμές ενεργότητας νερού (a_w), μεταξύ 0,99 και 0,94 (Doyle and Beuchat, 2007; Pui et al., 2011).

1.1.2. Ονοματολογία

Η ιστορία της ονοματολογίας του βακτηρίου *Salmonella* spp. είναι αρκετά εκτενής και έχει εξελιχθεί μέσα στο χρόνο. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), στο παρελθόν τα ονόματα των οροτύπων, του γένους *Salmonella* υποδήλωναν σύνδρομο (*S. typhi*) ή σχέση (*S. paratyphi* A, B, C). Πολλές φορές υποδείκνυαν ακόμη και την εξειδίκευση σε επίπεδο ξενιστή. Για παράδειγμα η ονομασία typhimurium προέρχεται από τις λέξεις typhi και murium, το οποίο στα λατινικά σημαίνει ποντίκι. Στη συνέχεια, για την αποφυγή τυχών συγκρίσεων χρησιμοποιήθηκε η γεωγραφική περιοχή του πρώτου στελέχους για κάθε νέο ορότυπο (*S. london*, *S. panama*). Στο μεταξύ τα σύνθετα ονόματα απλοποιήθηκαν (*S. typhimurium*, *S. choleraesuis*), γεγονός που οδήγησε στο λανθασμένο συμπέρασμα ότι αντιπροσωπεύουν ξεχωριστά είδη και για το λόγο αυτόν γράφονταν με πλάγια γραμματοσειρά (*italics*).

Σε αντίθεση με άλλα είδη βακτηρίων, για τα οποία χρησιμοποιούνται ονομασίες βάσει μόνο της αντιγονικής ταξινόμησης, για το βακτήριο *Salmonella* spp. έχουν διατηρηθεί τα ονόματα για κάποιους οροτύπους του υποείδους *enterica*. Αυτό συνέβη διότι οι εν λόγω ορότυποι είναι τόσο συχνά απαντώμενοι, που θα ήταν μη ρεαλιστική η αντικατάσταση των γνωστών ονομάτων με τους αντιγονικούς τύπους. Τα ονόματα όμως αυτά δεν θα πρέπει να γράφονται με πλάγια γραμματοσειρά. Έτσι, είναι σωστό να γράφει κανείς *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, ή *S. enterica* serovar Typhimurium, ή *Salmonella* ser. Typhimurium, αλλά όχι *S. Typhimurium*. Το τελευταίο διότι δεν είναι δυνατό να γράφεται η συντομογραφία του ονόματος ενός γένους (*S.* για το γένος *Salmonella*) χωρίς να ακολουθείται από επίθετο που αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο είδος (*S. enterica*) (WHO, 2007).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μοριακών μεθόδων ταξινόμησης, που βασίζονται στην ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA, το γένος *Salmonella*

αποτελείται από δύο και μόνο είδη, τα *Salmonella enterica* και *Salmonella bongori*. Από τους 2463 οροτύπους του γένους αυτού, οι 2443 ανήκουν στο είδος *S. enterica* και οι 20 στο είδος *S. bongori* (Pui et al., 2011). Το είδος *S. enterica* χωρίζεται σε έξι υποείδη: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indica* (WHO, 2007). Τα στελέχη που προσβάλλουν τον άνθρωπο ανήκουν, σε ποσοστό άνω του 99%, στο είδος *S. enterica* subsp. *enterica* (Pui et al., 2011).

Πίνακας 1.1. Αριθμός ορότυπων σε είδη και υποείδη

Είδη και υποείδη του παθογόνου	Αριθμός ορότυπων
<i>Salmonella</i> spp.	
<i>S. enterica</i>	2557
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1531
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	505
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	99
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	336
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	73
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	13
<i>S. bongori</i>	22
Σύνολο (γένος <i>Salmonella</i>)	2579

Σήμερα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, χρησιμοποιεί μια μέθοδο οροτυποποίησης της σαλμονέλας, που βασίζεται στην αντιγονικότητα συγκεκριμένων δομών, στην επιφάνεια του μικροβιακού κυττάρου. Το σχήμα Kauffmann-White ταξινομεί τη σαλμονέλα σύμφωνα με τους τρεις βασικούς αντιγονικούς καθοριστές: βλεφαριδικά -H- αντιγόνα (flagellar -H- antigens), σωματικά -O- αντιγόνα (somatic -O- antigens) και -K- αντιγόνα ή αντιγόνα κάψας (virulence (Vi) capsular -K- antigens). Τα βλεφαριδικά -H- αντιγόνα είναι δύο ειδών: τα ειδικής φάσης (phase 1), που είναι εξειδικευμένα για τη σαλμονέλα και τα μη ειδικής φάσης (phase 2), που είναι ευρέως διαδεδομένα σε διάφορα είδη μικροοργανισμών. Τα αντιγόνα της 1^{ης} φάσης καταδεικνύονται με μικρά γράμματα του λατινικού αλφαβήτου (a, b, c κλπ.) ενώ εκείνα της 2^{ης} φάσης, με τη χρήση αραβικών αριθμών (1,2,3 κλπ.). Ένας ορότυπος μπορεί να διαθέτει -H- αντιγόνα που ανήκουν και στις δύο ή στη μια μόνο

φάση. Για παράδειγμα η ανάλυση της αντιγονικότητας του βακτηρίου *Salmonella ser. Choleraesuis* είναι: 6,7,c, 1, 5, όπου οι αριθμοί 6 και 7 αναφέρονται σε σωματικά -O- αντιγόνα, το γράμμα c σε βλεφαριδικά -H- αντιγόνα τύπου 1 και οι αριθμοί 1 και 5 σε βλεφαριδικά -H- αντιγόνα τύπου 2. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η αντιγονική δομή μερικών συχνά απαντώμενων στελεχών του παθογόνου *Salmonella spp.*

Πίνακας 1.2. Αντιγονική δομή μερικών συχνά απαντώμενων στελεχών του παθογόνου *Salmonella spp.*

Group	Species/Serovars	<u>O Antigens</u>		<u>H Antigens</u>	
				Phase 1	Phase 2
A	Paratyphi A	1,2,12		a	(1,5)
B	Typhimurium	1,4,(5),12		i	1,2
C ₁	Choleraesuis	6,7		(c)	1,5
	Oranienburg	6,7, 14		m, t	(z ₆₄)
	Montevideo	6,7		g, m, s, (p)	(1,2,7)
C ₂	Newport	6,8, 20		e, h	1,2
D	Typhi	9,12, (vi)		d	-
	Enteritidis	1,9,12		g, m	-
	Gallinarum	1,9,12		-	-

() = πιθανή απουσία

Ένα άλλος τρόπος ταξινόμησης , το γένος *Salmonella* μπορεί να χωριστεί σε τρεις ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τους οροτύπους εκείνους που προσβάλλουν μόνο τον άνθρωπο. Αυτοί είναι οι *Salmonella ser. Typhi*, *Salmonella ser. Paratyphi A* και *Salmonella ser. Paratyphi C*. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει τους οροτύπους που προκαλούν τον τυφοειδή και παρατυφοειδή πυρετό, τις δύο πιο σοβαρές ασθένειες που προκαλούνται από το βακτήριο *Salmonella spp.* Το σύνδρομο του παρατυφοειδή πυρετού είναι πιο ήπιο από ότι εκείνο του τυφοειδή. Ο τυφοειδής πυρετός έχει το μεγαλύτερο χρόνο επώασης, προκαλεί υψηλότερο πυρετό και έχει μεγαλύτερο δείκτη θνησιμότητας. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από του οροτύπους εκείνους που είναι προσαρμοσμένοι στο είδος του ξενιστή. Μερικοί από αυτούς προσβάλλουν τον άνθρωπο και μπορεί να προέρχονται από τα τρόφιμα. Αυτοί είναι: *Salmonella ser. Gallinarum* (κοτόπουλα), *Salmonella ser. Dublin* (βοειδή), *Salmonella ser. Abortus-equi* (άλογα), *Salmonella ser. Abortus-ovis* (πρόβατα) και *Salmonella ser. Choleraesuis* (χοίροι). Τέλος, στην τρίτη ομάδα ανήκουν οι ορότυποι οι οποίοι είναι

παθογόνοι τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα και περιλαμβάνουν τους περισσότερους τροφιμογενείς οροτύπους (Jay, 2000).

1.2. Σαλμονέλωση

1.2.1. Επιδημιολογία της σαλμονέλωσης

Το είδος *Salmonella* spp. αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα για πολλές ασθένειες, όπως η γαστρεντερίτιδα και ο τυφοειδής πυρετός (Foster and Hall, 1990). Σύμφωνα με τα στοιχεία της Ευρωπαϊκής Αρχής Ασφάλειας των Τροφίμων και του Ευρωπαϊκού Κέντρου Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων, στην ΕΕ η σαλμονέλωση αποτελεί τη δεύτερη συχνότερα εμφανιζόμενη τροφιμογενή αιτία νοσηλείας. Το 2015, οι καταγεγραμμένες περιπτώσεις νοσηλείας έφτασαν τις 94.625. Παρόλα αυτά, μόνο για τις 52.605 περιπτώσεις υπήρχαν, επίσης, διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την έκβαση της ασθένειας. Από αυτές, οι 126 κατέληξαν σε θάνατο. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι ο δείκτης θνητότητας για τον παθογόνο *Salmonella* spp. στην ΕΕ είναι 0,24% για το έτος 2015.

Εντούτοις, μεταξύ 2008 και 2015 υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση των περιστατικών σαλμονέλωσης στην Ευρώπη. Συγκεκριμένα από το 2010 έως το 2015 παρατηρήθηκε μείωση των περιστατικών σαλμονέλωσης στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης κατά 40,6% (EFSA and ECDC, 2015). Από την άλλη μεριά, θα πρέπει να τονιστεί η πιθανότητα της εσφαλμένης εκτίμησης της κατάστασης, καθώς ιδιαίτερα στους ηλικιωμένους ασθενείς συχνά δεν πραγματοποιούνται βακτηριολογικές δοκιμές. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή υποεκτίμηση των θανατηφόρων περιστατικών σαλμονέλωσης (Sander, 1993). Οι περιπτώσεις τυφοειδούς σαλμονέλωσης, που είναι η πιο σοβαρή μορφή της λοίμωξης είναι γενικά χαμηλές στις ανεπτυγμένες χώρες. Αντίθετα η μη-τυφοειδής σαλμονέλωση είναι παγκοσμίως αυξημένη. Στον αναπτυσσόμενο κόσμο ο τυφοειδής πυρετός προκαλεί θνητότητα (mortality) σε ποσοστό 5-30% του πληθυσμού.

Πίνακας 1.3. Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων τροφιμογενών νοσημάτων και συρροών/επιδημιών, Ελλάδα, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων 2004-2015

Νόσημα	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Σαλμονέλλωση												
(μη τυφο- παρατυφική)	1327	1062	886	709	810	406	299	471	409	417	349	368
Ηπατίτιδα Α	52	160	120	282	119	89	58	41	74	165	86	62
Σιγγέλωση	62	26	28	48	19	38	33	47	91	119	89	77
Τυφοειδής/ παρατυφοειδής πυρετός	20	20	16	18	11	4	10	8	6	8	9	18
Λιστερίωση	3	8	7	10	1	4	10	9	11	10	10	35
Λοίμωξη από EHEC (STEC/VTEC)	2	0	1	1	0	0	1	1	0	2	1	1
Αλλαντίαση	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Συρροές	59	46	59	58	56	54	63	43	66	71	58	68

Οι διάφοροι ορότυποι του είδους *Salmonella enterica* έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν, σε διάφορους τύπους ξενιστών. Αυτό προϋποθέτει την συνύπαρξη πολλών παραγόντων όπως οι συνθήκες pH, θερμοκρασίας και λοιπές συνθήκες, στο περιβάλλον του ξενιστή, το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και η απόκριση του στους διαφορετικούς οροτύπους, οι παρόντες συμβιωτικοί μικροοργανισμοί και η γενετική του ίδιου του παθογόνου. Το 2014, οι ορότυποι *Salmonella ser. Enteritidis* και *Salmonella ser. Typhimurium* αντιπροσώπευαν, αντίστοιχα, το 44,4% και 17,4% των οροτύπων σαλμονέλας που απομονώθηκαν από τις συνολικές καταγεγραμμένες περιπτώσεις λοιμώξεων σε ανθρώπους. Από το 2014 τα ποσοστά του *Salmonella ser. Enteritidis* έχουν αυξηθεί ακόμη περισσότερο, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό του *Salmonella ser. Typhimurium* έχει μειωθεί (EFSA and ECDC, 2015).

Μία σημαντική παράμετρος για την ποσοτικοποίηση του μικροβιακού κινδύνου είναι η εκτίμηση της σχέσης δόσης-απόκρισης (dose-response relationship). Πρόκειται για την έκφραση την ποσότητα των μικροβιακών κυττάρων που λήφθηκαν μέσω της τροφής σε σχέση με ένα ορισμένο αποτέλεσμα, όπως μόλυνση, λοίμωξη ή ακόμη και θάνατο. Η σχέση δόσης-απόκρισης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως ο ξενιστής, η λοιμοξιογόνος δράση (virulence) του παθογόνου και η δομή και τα

χαρακτηριστικά του τροφίμου, που αποτελεί κάθε φορά το μέσο μεταφοράς του παθογόνου στον άνθρωπο. Για παράδειγμα σε τρόφιμα τα οποία περιέχουν μεγάλο ποσοστό λίπους έχει βρεθεί μεγαλύτερη μολυσματικότητα, για τον παθογόνο *Salmonella* spp. Από την άλλη μεριά, τα παιδιά, οι ηλικιωμένοι και οι έγκυοι γυναίκες, λόγω του ότι ανήκουν σε ένα ευαίσθητο υποσύνολο του πληθυσμού διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο (Bollaerts et al., 2008). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ένα μεγάλο εύρος μολυσματικής δόσης για τη σαλμονέλα, που κυμαίνεται μεταξύ 1 και 10^9 cfu/ml ή g τροφίμου. Παρόλα αυτά στις ομάδες υψηλού κινδύνου είναι πιθανό από ένα έως 10 κύτταρα να προκληθεί λοίμωξη (D'Aoust, 1991; Pui et al., 2011). Επιπλέον, κρούσματα σαλμονέλωσης όπως αυτό στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1994, αποδεικνύουν ότι αρκεί ένας πολύ μικρός αριθμός κυττάρων του παθογόνου για να προκαλέσει μία λοίμωξη εξαιρετικά μεγάλης έκτασης (Hennessy et al, 1996).

1.2.2. Συμπτωματολογία της σαλμονέλωσης

Η προσβολή από το παθογόνο βακτήριο *Salmonella* spp. ξεκινά με την κατάποση του μικροοργανισμού μέσω της τροφής και την αναπαραγωγή του μέσα στον εντερικό αυλό. Στη συνέχεια διαπερνά τον εντερικό βλεννογόνο και πολλαπλασιάζεται μέσα στα μακροφάγα του δίκτυο-ενδοθηλιακού συστήματος. Από εκεί εισέρχεται στη συστηματική κυκλοφορία (Goldberg and Rubin, 1988). Το κλινικό φάσμα της σαλμονέλωσης ποικίλλει από απλή γαστρεντερίτιδα έως εντερικό πυρετό και βακτηριαμία, ενώ είναι δυνατό ο ξενιστής να είναι απλώς ασυμπτωματικός φορέας (Goldberg and Rubin, 1988; Foley et al., 2013).

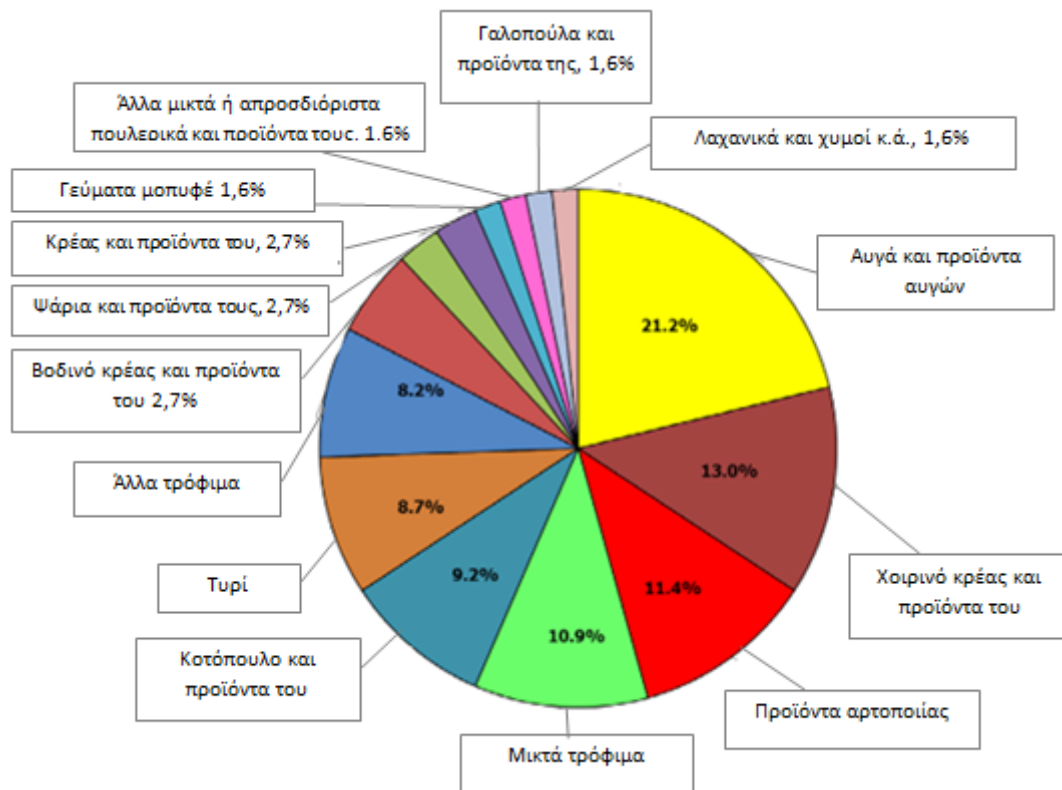
Η τροφική δηλητηρίαση από το βακτήριο *Salmonella* spp. εμφανίζει ως συμπτώματα ναυτία, κρυάδες, έμετο, κοιλιακό άλγος και διάρροια (Ganguly, 2012). Η διάρροια που προκαλείται από τον μη-τυφοειδή *S. enterica* είναι φλεγμονώδης και όχι εκκριτική διάρροια. Αυτό σημαίνει ότι ο μικροοργανισμός εισβάλλει στο εντερικό επιθήλιο χρησιμοποιώντας εκκρινικά συστήματα τύπου III (T3SSs). Η ανοσοποιητική απόκριση που ακολουθεί οδηγεί σε φλεγμονώδη διάρροια που συνίσταται από υδαρείς κενώσεις και υψηλά επίπεδα ουδετερόφιλων (Foley et al., 2013). Ο εντερικός πυρετός προκαλείται από μικροοργανισμούς που εισβάλουν στο λεπτό έντερο και από εκεί διασπείρονται σε άλλους ιστούς. Ένας τέτοιος μικροοργανισμός είναι *S. enterica* serovar typhi. Η ασθένεια που προκαλείται είναι γενικά σοβαρή και χαρακτηρίζεται

από διάχυτη λοίμωξη σε διάφορα μέρη του σώματος. Σε αυτή την περίπτωση η ανοσολογική αντίδραση χαρακτηρίζεται από διάμεση φλεγμονή με διήθηση των ιστών με μονοπύρηνια και όχι ουδετερόφιλα κύτταρα (Foley et al., 2013). Περίπου 2-5% των μη-θεραπευμένων τυφοειδών λοιμώξεων από *Salmonella* ser. typhi καταλήγει σε κατάσταση χρόνιου φορέα. Από τις μη-θεραπευμένες περιπτώσεις που έχουν αναρρώσει, ένα ποσοστό που φτάνει το 10% θα συνεχίσει να εκκρίνει τον μικροοργανισμό, μέσω των κενώσεων, για 1 έως 3 μήνες. Ενώ αναμένεται ένα ποσοστό 1-4% να γίνει χρόνιος φορέας, εκκρίνοντας τον μικροοργανισμό για περισσότερο από ένα χρόνο (Pui et al., 2011).

1.2.3. Τα «οχήματα» μεταφοράς του παθογόνου *Salmonella* spp. στον ανθρώπινο οργανισμό

Το 95% των σαλμονελώσεων είναι τροφιμογενείς (Harrison, 2017). Η σαλμονέλα αποικεί κυρίως τον εντερικό σωλήνα ζώων, όπως πτηνών, ερπετών, οικόσιτων ζώων και φυσικά του ανθρώπου. Ο μικροοργανισμός αυτός έχει την ικανότητα να επιβιώνει στα περιττώματα των ζώων και στο περιβάλλον εκτροφής τους για μεγάλο χρονικό διάστημα και από εκεί είναι δυνατό να μεταφερθεί στους χώρους σφαγής, όπου διατηρείται στις θερμοκρασίες ψύξης και κατάψυξης.

Στις τροφικές δηλητηριάσεις από *Salmonella* spp., το βακτήριο προέρχεται συνήθως από μολυσμένα ζώα και τα τρόφιμα τα οποία εμπλέκονται είναι το κρέας, με συνηθέστερο το κοτόπουλο, το γάλα και το αυγό (Jay, 2000; Ganguly et al., 2012). Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ότι φρέσκα φρούτα και λαχανικά μπορούν επίσης να παίξουν τον ρόλο «μέσου μεταφοράς» για τον παθογόνο *Salmonella* spp. προς τον άνθρωπο (Bouchrif et al., 2009). Αξίζει ακόμη να σημειωθεί ότι τα βακτηριακά κύτταρα έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα (επιφάνειες κοπής, εξοπλισμό κ.ά.) και να δημιουργούν biofilms, οδηγώντας έτσι σε διασταυρούμενη επιμόλυνση (cross-contamination) (Pui et al., 2011). Με αυτόν τον τρόπο ο παθογόνος *Salmonella* spp. μπορεί να βρεθεί σε οποιοδήποτε στάδιο της αλυσίδας παραγωγής τροφίμων ακόμη και κατά τη διανομή ή την προετοιμασία φαγητού στο σπίτι.



Εικόνα 1.2. Στοιχεία από 184 κρούσματα: Αυστρία (2), Βέλγιο (2), Κροατία (15), Φινλανδία (1), Γαλλία (57), Γερμανία (3), Ελλάδα (1), Ουγγαρία (2), Ιταλία (1), Λιθουανία (21), Ολλανδία (2), Πολωνία (54), Πορτογαλία (1), Ρουμανία (6), Σλοβακία (9), Σουηδία και Ηνωμένο Βασίλειο (2) (EFSA and ECDC, 2015)
Τα άλλα τρόφιμα περιλαμβάνουν: ρύζι, σπόρους, όσπρια, βότανα και καρυκεύματα, γλυκά και σοκολάτες κ.ά.

1.2.4. Επιβίωση της σαλμονέλας σε τρόφιμα χαμηλού pH

Είναι γενικά γνωστό ότι τα τρόφιμα χαμηλού pH δεν ευνοούν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών. Σε εργαστηριακές συνθήκες σε θερμοκρασίες 25-37°C, η χαμηλότερη τιμή pH που επέτρεψε την ανάπτυξη της *Salmonella ser. Typhimurium*, σε θρεπτικό υλικό που εμπεριείχε παράγοντες οξίνισης, είναι 6,4 όταν ο παράγοντας ήταν το οξικό οξύ, 5,4 παρουσία γαλακτικού οξέος και 4,5 παρουσία κιτρικού και υδροχλωρικού οξέος (Alvarez-Ordóñez et al., 2010).

Παρόλα αυτά, πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι παθογόνα βακτήρια όπως τα *E. Coli* και *Salmonella spp.* μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε τρόφιμα χαμηλού pH. Σε χυμούς εσπεριδοειδών έχουν βρεθεί ζωντανά κύτταρα του βακτηρίου *Salmonella spp.* έως και μετά από 12 εβδομάδες (Oyarza bal et al., 2003), ενώ σε μαγιονέζα μετά από 4 εβδομάδες (Leuschner and Boughtflower, 2001). Τέλος, σε γιαούρτι ο ίδιος παθογόνος επέζησε ως και μετά από 10 εβδομάδες (El-Gazzar and

Marth, 1992). Ακόμη πιο ενδιαφέρον είναι το εύρημα ότι ο παθογόνος αυτός κατάφερε να επιζήσει στη επιφάνεια κιμά, που προηγουμένως είχε υποστεί οξίνιση, σε pH 3,27 (Waterman and Small, 1998). Οι Waterman και Small αναφέρουν, επίσης, ότι οι *Escherichia coli*O157:H7 και *Salmonella ser. Flexneri* μπορούν να επιβιώσουν για μερικές ώρες ακόμη και σε εξαιρετικά χαμηλό pH όπως 2,5 ή και χαμηλότερο (Waterman and Small, 1998).

1.2.5. Κρούσματα σχετιζόμενα με την κατανάλωση αυγών και μαγιονέζας

Το 1994 συνέβη το μεγαλύτερο κρούσμα στην ιστορία της σαλμονέλλωσης. Ένα φορτηγό όχημα, το οποίο μετέφερε παγωτό, ενώ προηγουμένως είχε μεταφέρει αυγά, αποτέλεσε το σημείο της διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Από την κατανάλωση του παγωτού προσβλήθηκαν τελικά 224.000 άνθρωποι, σε 41 πολιτείες των ΗΠΑ. Ο ορότυπος που απομονώθηκε μετά από εξετάσεις των προσβεβλημένων ατόμων ήταν *Salmonella ser. Enteritidis* (Hennessy et al, 1996; Jay, 2000).

Το Μάρτιο του 1993, 22 άτομα εμφάνισαν πόνους στην κοιλιακή χώρα, πυρετό και διάρροια, μετά από κατανάλωση σάντουιτς από το ίδιο κατάστημα. Από τις καλλιέργειες κοπράνων των ασθενών προέκυψε ότι η λοίμωξη προήλθε από το βακτήριο *S. enteritidis*. Η έρευνα στο συγκεκριμένο κατάστημα έδειξε ότι η μαγιονέζα ήταν το μόνο τρόφιμο, από αυτά που κατανάλωσαν τα άτομα που νόσησαν, που περιείχε ωμό συστατικό ζωικής προέλευσης (αυγό). Τα αυγά που προέρχονταν από τον ίδιο προμηθευτή είχαν συχετιστεί με 2 ακόμη κρούσματα σαλμονέλλωσης νωρίτερα τον ίδιο χρόνο (CDC, 1993).

Σε σάλτσες με βάση τη μαγιονέζα έχουν βρεθεί παθογόνα βακτήρια όπως *Salmonella*, *E.coli* και *S.aureus*, σε πληθυσμούς της τάξεως του 10^2 - 10^4 cfu/ml (Tayfur et al., 2013). Το 1994, στην πολιτεία Όρεγκον των Ηνωμένων Πολιτειών, καταγράφηκε ένα κρούσμα *E. coli*, όπου νόσησαν περίπου 50 άτομα, τα οποία είχαν επισκεφθεί την ίδια αλυσίδα καταστημάτων. Τα κρούσματα συσχετίστηκαν με την κατανάλωση μαγιονέζας που είχε παρασκευαστεί στο κατάστημα (μη εμπορική μαγιονέζα). Ο συσχετισμός αυτός προκάλεσε ερωτήματα σχετικά με το αν ο παθογόνος *E. Coli* O 157:H7 δύναται να επιβιώσει στο περιβάλλον του τροφίμου αυτού (Zhao and Doyle, 1994). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι οι περισσότερες

λοιμώξεις από σαλμονέλα έχουν καταγραφεί από σπιτική μαγιονέζα (De Souza Sant'Ana, 2000). Η χρήση μη παστεριωμένων αυγών και μέσων όξινης σε μη επαρκείς συγκεντρώσεις αυξάνουν τις πιθανότητες ανάπτυξης του παθογόνου *Salmonella* spp. (Zhu et al., 2012).

1.2.6. Μέτρα ελέγχου

Η προστασία της ανθρώπινης υγείας από ασθενείς που μεταδίδονται άμεσα ή έμμεσα από τα ζώα και τα τρόφιμα είναι υψίστης σημασίας, γι' αυτό και η ΕΕ έχει θεσπίσει νομοθεσία για τον έλεγχο των παραγόντων που τις προκαλούν. Συγκεκριμένα για τη σαλμονέλα έχει εκδοθεί ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2160/2003 της 17^{ης} Νοεμβρίου του 2003 για τον έλεγχο της σαλμονέλας και άλλων συγκεκριμένων τροφιμογενών ζωοανθρωπονόσων. Ο σκοπός του κανονισμού αυτού είναι «να εξασφαλισθεί η λήψη κατάλληλων και αποτελεσματικών μέτρων για την ανίχνευση και τον έλεγχο της σαλμονέλας και άλλων ζωονοσογόνων παραγόντων σε όλα τα συναφή στάδια της παραγωγής, της μεταποίησης και της διανομής, ιδίως σε επίπεδο πρωτογενούς παραγωγής, συμπεριλαμβανομένων των ζωοτροφών, ώστε να μειωθεί η εξάπλωσή τους καθώς και ο κίνδυνος που δημιουργούν για τη δημόσια υγεία». Ο κανονισμός αυτός προβλέπει την κατάρτιση εθνικών προγραμμάτων ελέγχου από τα κράτη μέλη της ΕΕ, ώστε να επιτευχθεί η ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών, και να διευκρινιστούν οι αρμοδιότητες των αρμόδιων αρχών και των υπεύθυνων επιχειρήσεων τροφίμων. Επιπλέον, καθορίζει τις γενικές και ειδικές απαιτήσεις ανάλογα με το είδος του ζώου/τροφίμου και προβλέπει την εφαρμογή ειδικών μεθόδων ελέγχου, κατά περιπτώσεις. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τον κανονισμό, ισχύει ότι το νωπό κρέας από κοτόπουλα, γαλοπούλες και χοιρινά, δεν μπορεί να διατίθεται στην αγορά για ανθρώπινη κατανάλωση, εκτός εάν πληροί το ακόλουθο κριτήριο: «*Salmonella*: απουσία στα 25 γραμμάρια.».

Τα στοιχεία που δείχνουν την πτωτική τάση των τελευταίων ετών για τα κρούσματα σαλμονέλωσης δείχνουν ότι τα μέτρα που εφαρμόζονται λειτουργούν επιτυχώς. Παρόλα αυτά συνεχίζουν να υπάρχουν κρούσματα τα οποία δεν δηλώνονται και για το λόγο αυτό δεν υπάρχει μια σαφής εικόνα της πραγματικής κατάστασης στην ΕΕ. Θα πρέπει να υπάρξει περαιτέρω ευαισθητοποίηση των επιχειρήσεων τροφίμων, οι οποίες είναι κυρίως υπεύθυνες για την ασφάλεια των τροφίμων, καθώς και

ενημέρωση των καταναλωτών για τη σωστή μεταχείριση των τροφίμων, ώστε να εξαλειφθούν τα κρούσματα σαλμονέλλωσης. Επιπλέον, η στενή συνεργασία μεταξύ της Ευρωπαϊκής Επιτροπής και των κρατών μελών πρέπει να θεωρείται ουσιαστικής σημασίας και να επιδιώκεται η ουσιαστική εφαρμογή της. Τέλος, συνίσταται η στενή συνεργασία μεταξύ κτηνιάτρων και ειδικών δημόσιας υγείας και η εφαρμογή συστημάτων παρακολούθησης ώστε να επιτυγχάνεται η πρόβλεψη και πρόληψη των ανθρωποζωνόσων στην Ευρώπη (Lahuerta et al., 2011).

1.3. Μαγιονέζα

1.3.1. Ορισμός και τεχνολογικά χαρακτηριστικά

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, με το όνομα «Μαγιονέζα» νοείται το προϊόν σε μορφή ομογενούς πολτού, που παρασκευάζεται από εδώδιμο έλαιο με προσθήκη κρόκου αυγού, μαγειρικού αλατιού, αρτυμάτων, χυμού λεμονιού ή κιτρικού οξέος και μερικές φορές ζάχαρης και ξυδιού (ΚΤΠ, 2011). Το αποτέλεσμα αυτής της ανάμιξης είναι ένα προϊόν χαμηλού pH, που κυμαίνεται σε τιμές 3,6 έως 4,0. Η ενεργότητα νερού (a_w) του τελικού προϊόντος υπολογίζεται στα 0,925.

Παρόλο που το ποσοστό λίπους είναι μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό του νερού, η μαγιονέζα θεωρείται γαλάκτωμα ελαίου (oil-in-water emulsion) σε νερό. Αυτό επιτυγχάνεται με τη σωστή ανάμειξη των υλικών. Συγκεκριμένα η λιπαρή ουσία θα πρέπει να προστεθεί στο τέλος και σταδιακά, διαφορετικά το προϊόν θα καταλήξει σε ένα γαλάκτωμα νερού σε έλαιο. (Depree and Savage, 2001). Το χαρακτηριστικό ιξώδες της μαγιονέζας προκύπτει από το γεγονός ότι, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης λίπους, τα σταγονίδια του λίπους αλλάζουν σχήμα -σε σχέση με το σφαιρικό σχήμα που έχουν κανονικά- και επιπλέον πλησιάζουν πολύ μεταξύ τους, με αποτέλεσμα την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων. Επιπλέον, ο κρόκος αυγού παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ιξωδοελαστικότητα (viscoelasticity) του τελικού προϊόντος. Σύμφωνα με την CIMSCEE (Committee of Mayonnaise and Condiment Sauce of the EU) η ελάχιστη περιεκτικότητα της μαγιονέζας σε λίπος και κρόκο αυγού θα πρέπει να είναι 70% και 5%, αντίστοιχα. Πολλά φυτικά έλαια είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μαγιονέζας. Τα πιο συχνά απαντώμενα είναι το σογιέλαιο, το ηλιέλαιο και το έλαιο ελαιοκράμβης ή λάδι κανόλα (De Souza Sant'Ana, 2017).

Το pH της μαγιονέζας δύναται να επηρεάσει τη δομή του γαλακτώματος. Όταν το pH βρίσκεται κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών του κρόκου αυγού τότε το ιξώδες έχει την υψηλότερη τιμή και το τελικό προϊόν παρουσιάζει την καλύτερη δυνατή σταθερότητα. Οι Kiosseoglou and Sherman (1983) βρήκαν ότι σε pH 3,9 η μαγιονέζα είχε την καλύτερη ιξωδοελαστικότητα και σταθερότητα. Κατά την παρασκευή της μαγιονέζας, ως παράγοντες οξίνισης μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα οξέα όπως το οξικό, το κιτρικό, το γαλακτικό και το μηλικό οξύ (De Souza Sant'Ana, 2017). Παρόλα αυτά, κατά κύριο λόγο, προτιμάται το οξικό οξύ (ξύδι), το οποίο στο τελικό προϊόν αποτελεί ποσοστό 0,29 έως 0,5% (Jay, 2000; De Souza Sant'Ana, 2017).

Η συγκέντρωση του αλατιού συμβάλει στην καλή κατανομή και αλληλεπίδραση των σταγονιδίων λίπους, επηρεάζοντας το φορτίο των πρωτεϊνών που σχηματίζουν ένα λεπτό στρώμα γύρω από τα σταγονίδια. Αντίθετα το υπερβολικό αλάτι μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση των πρωτεϊνών στην υδατική φάση (εξαλάτωση). Το αλάτι και η ζάχαρη προστίθενται επίσης με σκοπό τη αποφυγή της ζελατινοποίησης του κρόκου του αυγού. Αυτή είναι μια φυσιολογική διαδικασία που συμβαίνει όταν το αυγό αποθηκεύεται στους -6°C (Degee and Savage, 2001). Η περιεκτικότητα της υδατικής φάσης σε αλάτι και ζάχαρη είναι συνήθως 9-11% και 7-10% , αντίστοιχα (Jay, 2000).

1.3.2. Μικροβιακή σταθερότητα της εμπορικής μαγιονέζας

Ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών κατατάσσει τη μαγιονέζα στα ευαλλοίωτα τρόφιμα, λόγω του ότι ανήκει στα «προϊόντα σε υγρή ή ημίρρευστη μορφή» (ΚΤΠ, 2011). Παρόλα αυτά, τα προϊόντα που ανήκουν στην κατηγορία «γαλακτωματοποιημένες σάλτσες», όπως είναι η μαγιονέζα, θεωρούνται γενικά ασφαλή, όσον αφορά τη μικροβιακή ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τα προϊόντα αυτά διαθέτουν συγκεκριμένους ενδογενείς παράγοντες που καθυστερούν ή εμποδίζουν την ανάπτυξη των μικροβίων. Τέτοιοι παράγοντες είναι η παρουσία οργανικών οξέων και συντηρητικών, το χαμηλό pH και η χαμηλή a_w (Vermeulen, 2008).

Ο πιο πιθανός τρόπος αλλοίωσης της μαγιονέζας είναι η οργανοληπτική και όχι η μικροβιακή αλλοίωση, μέσω της αυτο-οξειδωσης των ακόρεστων και

πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Εξαιτίας της διαδικασίας αυτής, το προϊόν αποκτά μία χαρακτηριστική ταγγή γεύση. Επιπλέον, διάφορες φυσικοχημικές διεργασίες είναι πιθανό να οδηγήσουν στην κατάρρευση του γαλακτώματος (Degee and Savage, 2001). Λιγότερο συχνά, η αλλοίωση της μαγιονέζας προκύπτει από μικροοργανισμούς που, όμως, δεν αποτελούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, όπως οξυανθεκτικές ζύμες και συγκεκριμένα τον *Zygosaccharomyces bailii* και κάποια οξυγαλακτικά βακτήρια (De Souza Sant'Ana, 2017). Η αλλοίωση από μύκητες λαμβάνει χώρα μόνο στην επιφάνεια των προϊόντων αυτών, όπου υπάρχει το απαραίτητο, για την ανάπτυξη τους, οξυγόνο (De Souza Sant'Ana, 2000).

Η ταχεία θανάτωση παθογόνων μικροοργανισμών σε εμπορικές σάλτσες με βάση τη μαγιονέζα έχει τεκμηριωθεί εδώ και πολλές δεκαετίες. Οι Morita & Woodburn έδειξαν ότι σε σάλτσες, όπως η μαγιονέζα, αναστέλλεται η ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών όπως ο *Staphylococcus aureus* (Morita & Woodburn, 1983). Σε μία μελέτη τους, οι Doyle and Foster έδειξαν ότι η προσθήκη μαγιονέζας σε σαλάτες με βάση το κρέας καθυστέρησε το ρυθμό ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών. Μάλιστα, όσο μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωση της μαγιονέζας στο τελικό προϊόν τόσο περισσότερο μειωνόταν ο ρυθμός ανάπτυξης (Doyle and Foster, 1982).

Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι το περιβάλλον της μαγιονέζας και των σαλτσών χαμηλού pH (acidic dressings or sauces) είναι εχθρικό προς την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Smittle, 1977) και κατά συνέπεια ότι η μαγιονέζα βρίσκεται μεταξύ των πλέον ασφαλών προϊόντων, όταν παρασκευάζεται σε εμπορική κλίμακα, κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες παραγωγής (Doyle, 1996). Η πρώτη ισχυρή ένδειξη της ασφάλειας αυτών των προϊόντων είναι το γεγονός ότι δεν υπάρχει ιστορικό καταγεγραμμένων κρουσμάτων τροφιμογενών λοιμώξεων που να σχετίζονται με την κατανάλωση εμπορικής μαγιονέζας ή σάλτσας που παρασκευάζεται με βάση τη μαγιονέζα (Smittle, 2000; Beuchat, 2006). Τα αποτελέσματα της μελέτης του Beuchat (2006), έδειξαν ότι το είδος της σάλτσας και η διαφορετική συγκέντρωση λίπους δεν έπαιξαν ρόλο στην αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, και *L. monocytogenes*. Επιπλέον, ασχέτως από τον μικροβιακό πληθυσμό που περιεχόταν στο αρχικό εμβόλιο, όλοι οι μικροοργανισμοί θανατώθηκαν ταχύτατα μέσα σε όλα τα εξεταζόμενα εμπορικά προϊόντα. Κατά τους συγγραφείς, ο πιο σημαντικό παράγοντας που συμβάλλει στην θανάτωση των

μικροβίων σε αυτά τα προϊόντα είναι το χαμηλό pH και η ψυγκέντρωση του οξικού οξέος στην υδατική φάση. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και άλλοι ερευνητές που μελέτησαν τη θανάτωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε διαφορετικά είδη εμπορικής μαγιονέζας (Glass & Doyle, 1991; Lock and Board, 1994).

Παρόλα αυτά, οι περισσότερες περιπτώσεις μολύνσεων που έχουν προέλθει από μαγιονέζα, καθώς και από προϊόντα με βάση τη μαγιονέζα (salad dressings) έχουν συσχετιστεί με τον παθογόνο *Salmonella* spp. και με τα μη παστεριωμένα αυγά που πιθανόν χρησιμοποιήθηκαν κατά την παραγωγή αυτών των προϊόντων. Για το λόγο αυτό, η σπιτική μαγιονέζα εμπεριέχει σοβαρό κίνδυνο ανάπτυξης του εν λόγω παθογόνου (Radford and Board, 1993; FDA, 2012). Θα πρέπει, επίσης, να τονιστεί ότι σε αυτά τα προϊόντα ο κίνδυνος παραμένει υψηλός, λόγω της χαμηλής μολυσματικής δόσης (10-25cfu) του παθογόνου σε αυτά (FDA, 2012).

Ο ρυθμός θανάτωσης των παθογόνων μικροοργανισμών σε μαγιονέζα και προϊόντα με βάση τη μαγιονέζα είναι ένα σύνθετο φαινόμενο που φαίνεται να εξαρτάται από πολλούς διαφορετικούς παράγοντες, οι οποίοι θα συζητηθούν παρακάτω.

1.4. Συντήρηση τροφίμων - η χρήση των οργανικών οξέων

1.4.1. Γενικά για τη συντήρηση των τροφίμων

Η συντήρηση των τροφίμων απασχολεί τον άνθρωπο από τους προϊστορικούς χρόνους. Από την ανακάλυψη της φωτιάς μέχρι σήμερα, η ανθρωπότητα συνεχίζει να χρησιμοποιεί και να εξελίσσει πολυάριθμες μεθόδους και τεχνικές που επιτρέπουν στο χρόνο ζωής των τροφίμων να διαρκέσει το μέγιστο δυνατό, ενώ σε πολλές περιπτώσεις προσδίδουν επιπλέον κάποια ιδιαίτερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά σε αυτά. Ο στόχος της συντήρησης των τροφίμων είναι πρωτίστως η θανάτωση ή μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Για να επιτευχθεί αυτό ο άνθρωπος παρενέβη -αρχικά χωρίς να το γνωρίζει- στις συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών:

α) θερμοκρασία ανάπτυξης

Με το μαγείρεμα, την παστερίωση ή τα μικροκύματα η θερμοκρασία αυξάνεται σε σημείο τέτοιο, που επιφέρει θανάτωση ή απενεργοποίηση των μικροοργανισμών. Αντίστοιχα, με την ψύξη ή την κατάψυξη η θερμοκρασία μειώνεται σε σημείο που η ανάπτυξη επιβραδύνεται σημαντικά ή δεν επιτρέπεται.

β) ενεργότητα νερού

Η μείωση της ενεργότητας νερού (a_w) επιτυγχάνεται με την ξήρανση ή με την προσθήκη ζάχαρης ή χλωριούχου νατρίου.

γ) pH

Με την προσθήκη διαφόρων παραγόντων οξίνισης επιτυγχάνεται μείωση του pH κάτω από το εύρος τιμών που είναι κατάλληλο για την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών.

δ) ενδογενής χλωρίδα

Ο άνθρωπος καταφέρνει να μεταβάλει τη σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού σε τρόφιμα όπως το ψωμί, γαλακτοκομικά προϊόντα, αλλαντικά, κρασί μύρα κ.ά., με την ζύμωση (αλκοολική, γαλακτική, προπιονική κ.ά.), ή με την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων, όπως συντηρητικά, βιογενείς αμίνες και άλλα (Pardo and Zufia, 2012; Tiwari et al., 2009).

Καθώς οι καταναλωτές δεν ικανοποιούνται πλέον με τους συμβατικούς τρόπους συντήρησης των τροφίμων, η βιομηχανία αναζητά νέους τρόπους για την ταυτόχρονη διατήρηση της ποιότητας, της ασφάλειας και της φρεσκότητας (De Jonge et al. 2003; Meng et al. 2014). Επιπλέον η υψηλή θερμοκρασία θεωρείται ότι υποβαθμίζει την ποιότητα του τροφίμου, αφού επιταχύνει τις χημικές διεργασίες που αλλάζουν το χρώμα τη γεύση και τη διατροφική αξία του τελικού προϊόντος (Yamamoto, 2017). Έτσι, χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο ήπιες μέθοδοι συντήρησης των τροφίμων που δεν επηρεάζουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και δε απαιτούν τη χρήση χημικών ουσιών. Τέτοιες μέθοδοι είναι η εφαρμογή τροποποιημένης ατμόσφαιρας, η χρήση υπερυψηλής πίεσης ή ακτινών γ , καθώς και η ενεργός συσκευασία τροφίμων (Meng et al. 2014). Εντούτοις, ο κίνδυνος για ένα τρόφιμο το οποίο δεν έχει υποστεί θερμική επεξεργασία να φέρει παθογόνους μικροοργανισμούς

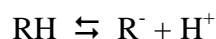
παραμένει μεγάλος (Oliveira et al., 2015). Η τεχνολογία των πολλαπλών εμποδίων (hurdle technology) αποτελεί ένα σύγχρονο τρόπο ήπιας επεξεργασίας των τροφίμων, με την εφαρμογή διαφορεικών μεθόδων συντήρησης σε μικρό όμως βαθμό. Κατά τους De Jonge et al. (2003) θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την εφαρμογή τέτοιων τεχνολογιών, καθώς είναι πιθανή η παρουσία παθογόνων στελεχών, τα οποία διαθέτουν μηχανισμούς αντοχής σε διαφορετικά είδη στρες. Η μαγιονέζα είναι ένα τρόφιμο το οποίο δεν υπόκειται σε θερμική επεξεργασία και η συντήρηση της βασίζεται σε ενδογενείς παράγοντες και κυρίως στο χαμηλό pH, που επιτυγχάνεται με τη χρήση οργανικών οξέων. Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω η παρουσία ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου *Salmonella* spp. σε προϊόντα μαγιονέζας δύναται να αποτελέσει σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία.

1.4.2. Οργανικά οξέα και η δραστηριότητά τους

Η ομάδα ενώσεων που είναι γνωστές με το όνομα οργανικά οξέα αποτελείται από τα κορεσμένα μονοκαρβοξυλικά οξέα και τα αντίστοιχα παράγωγα τους (ακόρεστα, υδροξυκαρβοξυλικά, φαινολικά και πολυκαρβοξυλικά οργανικά οξέα). Πολλά οργανικά οξέα χρησιμοποιούνται σαν πρόσθετα στα τρόφιμα, δεν έχουν όμως όλα αντιμικροβιακή δράση. Τα δραστικότερα οργανικά οξέα είναι τα μονοπρωτικά οξέα συμπεριλαμβανομένου του οξικού, προπιονικού, βενζοϊκού, σορβικού και γαλακτικού οξέος.

Η αποτελεσματικότητα των οργανικών οξέων όσον αφορά στην αντιμικροβιακή δράση τους σχετίζεται άμεσα με το pH του τροφίμου, ενώ πολύ μεγάλο ρόλο παίζει η αδιάστατη μορφή του οξέος. Τα περισσότερα οργανικά οξέα έχουν τιμές pK_a μεταξύ 3,0 και 5,0 και έτσι η δράση τους περιορίζεται σε τρόφιμα με pH μικρότερο του 5,5 (Davidson, 2013). Παρόλα αυτά, στις περισσότερες εφαρμογές τους, η δράση των οξέων αυτών συνίσταται περισσότερο στην αναχαίτιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και λιγότερο στην θανάτωση τους. Είναι γνωστό ότι η πλειονότητα των βακτηρίων αδυνατεί να αναπτυχθεί σε περιβάλλοντα με τιμές pH μικρότερες του 4,5. Έτσι, η απλή μείωση του pH είναι αρκετή για την πρόληψη της μικροβιακής αύξησης. (Stratford and Eklund, 2003).

Διάσταση ενός οξέος καλείται η ιδιότητα του μορίου να διαχωρίζεται σε συγκεκριμένα συστατικά του. Αυτό στην περίπτωση των οργανικών οξέων επιτυγχάνεται με μία αντίδραση ιοντισμού, η οποία εκφράζεται γενικά ως:

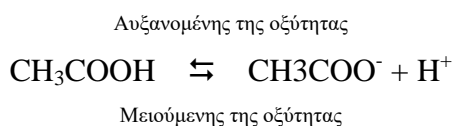


Ο βαθμός διάστασης ενός οξέος περιγράφεται από τη σταθερά διάστασης του (K_a). Η σταθερά αυτή είναι στην πραγματικότητα ο λόγος της συγκέντρωσης του δισταμένου προς τη συγκέντρωση του αδιάστατου οξέος, όταν αυτά βρίσκονται σε ισορροπία σε μία συγκεκριμένη θερμοκρασία. Ο αρνητικός λογάριθμος του λόγου αυτού είναι γνωστός ως pK_a . Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι pK_a , στους $25^\circ C$ για κάποια κοινά οργανικά οξέα.

Πίνακας 1.4. Τιμές K_a και pK_a για κάποια κοινά οργανικά οξέα

Οργανικό οξύ	K_a	pK_a
Οξικό οξύ	1.76×10^{-5}	4.76
Γαλακτικό οξύ	1.37×10^{-4}	3.86
Βενζοϊκό οξύ	6.46×10^{-5}	4.20
Σορβικό οξύ	1.73×10^{-5}	4.76

Στην πραγματικότητα, για τη συντήρηση τροφίμων όπως η μαγιονέζα μας ενδιαφέρει η συγκέντρωση του αδιάστατου οξέος στην υδατική φάση, καθώς σε αυτή τη φάση λαμβάνει χώρα η μικροβιακή αύξηση (Tuynenburg, 1971). Η αλληλεπίδραση μεταξύ της συγκέντρωσης του αδιάστατου οξέος και της οξύτητας του τροφίμου και εκφράζεται μέσω της ακόλουθης ισορροπίας:

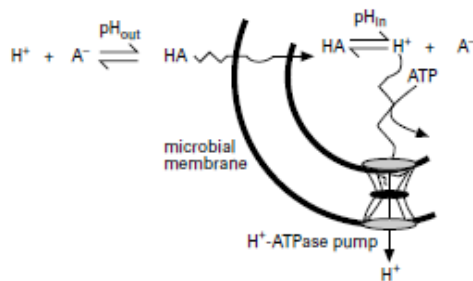
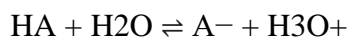


Όπως φαίνεται στο σχήμα, η ισορροπία αυτή μετατοπίζεται προς τα αριστερά όταν αυξάνεται η οξύτητα και προς τα δεξιά όταν η οξύτητα μειώνεται. Έτσι όταν το pH μειώνεται (αύξηση οξύτητας) η συγκέντρωση του H^+ αυξάνεται μετατοπίζοντας την αντίδραση προς τα αριστερά, με αποτέλεσμα την αύξηση του αδιάστατου οξέος. Αν το pH του τροφίμου μειωθεί κάτω από την τιμή pK_a του οξέος το ποσοστό του

αδιάστατου οξέος αυξάνεται, το ίδιο και η αντιμικροβιακή του δράση (Jones and Man, 1994).

1.4.3. Μηχανισμός δράσης των ασθενών οργανικών οξέων

Τα ασθενή οξέα, όπως το οξικό οξύ, όταν βρίσκονται μέσα σε ένα υδατικό διάλυμα βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τις δισταμένης και μη δισταμένης μορφής τους (Hills, 1973; Brul and Coote, 1999):



Εικόνα 1.3. Τρόπος δράσης ασθενών οξέων

Όντας στην αδιάστατη μορφή τους τα οργανικά οξέα διαπερνούν ευκολότερα την κυτταρική μεμβράνη λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα τους (Lambert & Stratford, 1999). Ο τρόπος μεταφοράς των αδιάστατων οξέων από το εξωτερικό στο εσωτερικό του κυττάρου είναι η απλή διάχυση (Stratford & Rose, 1986; Lambert & Stratford, 1999). Το

pH που συναντά το οξύ όταν βρεθεί μέσα στο κύτταρο πλησιάζει το ουδέτερο. Έτσι το οξύ δίσταται στα ιόντα του. Τα ιόντα είναι αδύνατο να κάνουν την αντίστροφη διαδρομή, να διαπεράσουν δηλαδή την κυτταρική μεμβράνη προς το εξωτερικό του κυττάρου (Brul and Coote, 1999; Lambert & Stratford, 1999).

Ο Russel (1992) έκανε την υπόθεση ότι η συσσώρευση ανιόντων είναι η βασική τοξική επίδραση των οργανικών οξέων και ότι ο λόγος, για τον οποίο μερικοί οργανισμοί είναι περισσότερο ανθεκτικοί σε αυτά, είναι ότι έχουν τη δυνατότητα να επιτρέπουν στο εσωτερικό τους pH να μειωθεί. Το γεγονός αυτό, με τη σειρά του, μπορεί να οδηγήσει σε παρεμπόδιση της ανάπτυξης είτε λόγω αναστολής των ενζύμων της γλυκόλυσης (Krebs et al., 1983), είτε λόγω παρεμπόδισης της ενεργούς μεταφοράς (Freese et al., 1973), είτε, τέλος, λόγω παρεμβολής στην μεταγωγή σήματος (signal transduction) (Thevelein, 1994).

Τα αρνητικά κατά gram βακτήρια, όπως ο παθογόνος *Salmonella* spp., λόγω της διπλής κυτταρικής μεμβράνης που διαθέτουν, επιδεικνύουν πιο περίπλοκους

μηχανισμούς άμυνας απέναντι σε συντηρητικά όπως τα οργανικά οξέα, σε σχέση με τα gram-θετικά. Ο μηχανισμός που επιτρέπει στο βακτήριο *Salmonella* spp. να επιβιώνει ακόμη και σε pH της τάξεω του 3, φαίνεται να του προσδίδει επίσης την ικανότητα αντοχής απέναντι σε οργανικά οξέα όπως το βουτυρικό, οξικό και προπιονικό οξύ (Brul and Coote, 1999).

1.5. Το βακτήριο *Salmonella* spp. και το φαινόμενο απόκρισης στο όξινο στρες (ATR)

1.5.1. Το στρες στη ζωή των μικροβιακών κυττάρων

Ο όρος «στρες» αναφέρεται σε ξαφνικές αλλαγές στο περιβάλλον του μικροβιακού κυττάρου. Για παράδειγμα όταν περιοριστούν τα θρεπτικά συστατικά ή οι αποδέκτες ηλεκτρονίων το μικροβιακό κύτταρο θα εισέλθει στην στατική φάση (βλ. αναερόβια αναπνοή). Επιπλέον, το στρες είναι δυνατό να επέλθει κατά την μετεγκατάσταση του μικροοργανισμού από τον ξενιστή στο εξωτερικό περιβάλλον ή και αντίστροφα (Rychlík and Barrow, 2005). Σε κάθε περίπτωση οι μικροοργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς προσαρμογής, που τους επιτρέπουν να επιβιώσουν στο νέο, μη φιλικό προς εκείνους περιβάλλον.

Ως μηχανισμοί προσαρμογής εννοούνται αλλαγές στη μεταβολική δραστηριότητα του κυττάρου. Τέτοιες αλλαγές περιλαμβάνουν την καταστολή της έκφρασης ορισμένων πρωτεϊνών, που εκφράζονται κανονικά όταν το κύτταρο αναπτύσσεται φυσιολογικές περιβαλλοντικές συνθήκες και την επαγωγή της σύνθεσης μιας ομάδας πρωτεϊνών που επιτρέπει στο κύτταρο να λειτουργήσει υπό τις υπάρχουσες στρεσογόνες συνθήκες. Αυτές οι αλλαγές είναι δυνατό να οδηγήσουν σε άλλες μορφολογικές αλλαγές, καθώς και σε εμφάνιση ανθεκτικότητας (resistance) στον ίδιο στρεσογόνο παράγοντα ή ακόμη και σε πολλαπλούς (Święciło and Wężyk, 2013). Για παράδειγμα, ενδιαφέρουν παρουσιάζει η παρατήρηση ότι κύτταρα του παθογόνου *Salmonella* spp. που έχουν υποστεί όξινη προσαρμογή, παρουσιάζουν ταυτόχρονα προστασία (cross protection) κατά την έκθεση σε θερμικό στρες (Sharma et al., 2005), καθώς και η συσχέτιση μεταξύ της οξεοανθεκτικότητας και της λοιμογόνου δράσης του παθογόνου (Bacon et al., 2003; Berk et al., 2005).

1.5.2. Οξεοανθεκτικότητα και το φαινόμενο απόκρισης στο όξινο στρες

Η απόκριση των μικροβιακών κυττάρων στο όξινο στρες έχει μελετηθεί σε πολλά είδη βακτηρίων όπως *Salmonella*, *Listeria*, *Streptococcus*, και *Enterococcus* spp. Το στρες που προκύπτει λόγω χαμηλού pH είναι ένα συχνό φαινόμενο στη ζωή αυτών των μικροοργανισμών, αφού προκύπτει κάθε φορά που ο μικροοργανισμός εισέρχεται στο στομάχι του ανθρώπου (ξενιστή) όπου το pH πλησιάζει τις τιμές 1 έως 2, αλλά και σε άλλα περιβάλλοντα εντός ή εκτός του οργανισμού - ξενιστή (Foster, 1993).

Ο βαθμός οξεοανθεκτικότητας του κυττάρου διαφέρει ανάλογα με τη φάση ανάπτυξης. Συγκεκριμένα για τον παθογόνο *Salmonella* spp., γνωρίζουμε ότι είναι σχετικά ανθεκτικός σε συνθήκες χαμηλού pH όταν βρίσκεται στη στατική φάση ανάπτυξης. Αντίθετα, στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης μπορεί να επιβιώσει μόνο σε ήπια χαμηλό pH, της τάξης του 4-5. Εντούτοις, και στις δύο περιπτώσεις η οξεοανθεκτικότητα ενός μικροβιακού κυττάρου μπορεί να ενισχυθεί εάν αυτό εκτεθεί για ένα μικρό χρονικό διάστημα σε ελαφρώς όξινο pH. Το φαινόμενο αυτό καλείται Acid Tolerance Response (ATR) ή φαινόμενο απόκρισης στο όξινο στρες (Rychlik and Barrow, 2005). Εδώ θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι η γενικότερη οξεοανθεκτικότητα (Acid Resistance) που παρουσιάζει ο παθογόνος *Salmonella* spp. μετά την είσοδο του στη στατική φάση είναι ανεξάρτητη από το pH και διαφοροποιείται από το φαινόμενο απόκρισης στο όξινο στρες που εκδηλώνεται λόγω έκθεσης σε ελαφρώς χαμηλό pH (stationary phase ATR) (Bacon et al., 2003). Έτσι, κατά τη στατική φάση παρατηρείται τόσο η εξαρτώμενη-από-το-pH οξεοανθεκτικότητα (pH-dependent Acid Resistance), η οποία ρυθμίζεται από το RpoS, όσο και ο εξαρτώμενος-από-το-pH μηχανισμός ATR (Semelis et al., 2003).

Ο λόγος για τον οποίο επάγεται ο μηχανισμός ATR μέσα στο μικροβιακό κύτταρο είναι η διατήρηση του ενδοκυττάρου pH. Ο μηχανισμός ATR εξυπηρετεί έτσι την ομοιόσταση του κυττάρου. Με τον τρόπο αυτόν το κύτταρο διατηρεί το pH του μεταξύ 5,0 και 5,5 και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την επιμήκυνση του χρόνου επιβίωσης του κυττάρου όταν μετέπειτα εκτεθεί σε πιο σοβαρό όξινο στρες (pH 3,0) (Foster and Hall, 1991; de Jonge et al., 2003).

Οι Perez et al. (2009), μελέτησαν 2 στελέχη του παθογόνου *Salmonella* spp., τα *Salmonella* ser. Enteritidis (SE86) και *Salmonella* ser. Typhimurium (ST99). Χρησιμοποίησαν προσαρμοσμένα και μη προσαρμοσμένα κύτταρα τα οποία στην πορεία εκτέθηκαν σε προσομοίωση γαστρικού υγρού για 20, 40, 60, 80 και 100 δευτερόλεπτα. Όπως αποδείχθηκε τα προσαρμοσμένα κύτταρα του ST99 θανατώθηκαν γρηγορότερα σε σχέση με τα προσαρμοσμένα κύτταρα του SE86. Η διαφορά τους ήταν 1-2 λογάριθμοι κάθε φορά. Μετά από έκθεση 100 δευτερολέπτων στην προσομοίωση γαστρικού υγρού ο πληθυσμός του SE86 ήταν 3,4 log cfu/ml και ο πληθυσμός του ST99 ήταν 2,4 log cfu/ml.

Οι Lee et al. (1994), έδειξαν ότι τα κύτταρα που βρίσκονται σε στατική φάση ανάπτυξης επιδεικνύουν οξεοανθεκτικότητα έως και 1000 φορές μεγαλύτερη από εκείνη που παρουσιάζουν τα κύτταρα που βρίσκονται στην λογαριθμική φάση. Επιπλέον, δοκιμάζοντας διαφορετικά pH ανάπτυξης, έδειξαν ότι τα κύτταρα της στατικής φάσης είναι πιο ανθεκτικά, όταν προέρχονται από καλλιέργεια σε pH 4,3 από εκείνα που καλλιεργήθηκαν σε pH 7,4. Όταν το φαινόμενο συμβαίνει στη λογαριθμική φάση, παρατηρούνται δύο διαφορετικές προσεγγίσεις στον τρόπο προσαρμογής. Η πρώτη προσέγγιση της παροδικής προσαρμογής ξεκινά 20 λεπτά μετά την έκθεση στο ήπια χαμηλό pH, ενώ ο δεύτερος μηχανισμός της «μόνιμης» προσαρμογής απαιτεί τη συνεχόμενη έκθεση του μικροοργανισμού στο ήπιο pH για περίπου 60 λεπτά (Rychlik and Barrow, 2005). Αυτό σημαίνει ότι αν ένα κύτταρο, εβρισκόμενο στη λογαριθμική φάση, εκτεθεί σε pH 4,3 για 20 έως 40 λεπτά θα καταφέρει να επιβιώσει. Αν όμως στη συνέχεια εκτεθεί σε θανατηφόρα όξινο pH, δεν θα επιβιώσει, σε αντίθεση με ένα κύτταρο της στατικής φάσης (Lee et al, 1994; Foster, 1993).

Όταν το κύτταρο βρεθεί υπό συνθήκες στρες προκαλείται η (υπερ)έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων και η αντίστοιχη (υπερ)παραγωγή πρωτεϊνών. Ο Foster (1993) αναφέρει ότι όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες όξινου στρες, κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, πραγματοποιείται σύνθεση 43 πρωτεϊνών (log phase ATR). Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται Acid Shock Proteins (ASP). Αυτές οι πρωτεΐνες και τα αντίστοιχα γονίδια μπορεί να σχετίζονται με α) την επιφανειακή δομή του κυττάρου και τη διατήρηση της, τέτοια είναι τα γονίδια *aas*, *pbpA* και *cld* β) την απόκριση στο στρες, για παράδειγμα η πρωτεΐνη *dps* είναι γνωστή για τον

προστατευτικό ρόλο της στο DNA κατά το όξινο στρες (Yoo et al., 2007) και γ) τις αντλίες εκροής *mar* και *emr*. Οι προαναφερθείσες πρωτεΐνες ανήκουν στους λεγόμενους τελεστές ή effectors (πρωτεΐνες που παίζουν σπουδαίο ρόλο κατά την κυτταρική απόκριση). Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στις παραπάνω διαδικασίες είναι εξίσου σημαντικές. Αυτές ελέγχουν συγκεκριμένα ρεγουλόνια (regulons) τα οποία έχουν σπουδαίο ρόλο στην απόκριση στο όξινο στρες. Οι πιο σημαντικές από αυτές τις πρωτεΐνες είναι οι RpoS, Fur, PhoPQ, και OmpR/EnvZ. Τα RpoS και OmpR/EnvZ είναι συστήματα μεταγωγής σήματος που αποτελούνται από δύο μέρη, που δρουν συνεργικά, ενώ τα Fur, PhoPQ δρουν ατομικά μέσα στο κυτταρόπλασμα. Τα RpoS και Fur χρησιμοποιούνται στην απόκριση σε όξινο στρες που προκαλείται από οργανικά οξέα, ενώ το PhoPQ συμμετέχει στην απάντηση σε στρες που προκαλείται από τη δράση ανόργανων οξέων. Το OmpR/EnvZ είναι απαραίτητο για την όξινη απόκριση των κυττάρων που βρίσκονται σε στατική φάση (Bang et al., 2000; Bang et al., 2002). Τέλος, έχει αναφερθεί η έκφραση του γονιδίου *orxG*, αλλά δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για τη λειτουργία του (Foster et al., 1994).

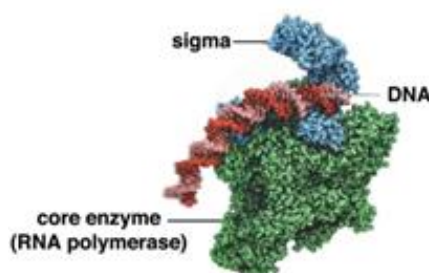
RpoS και όξινη προσαρμογή

Η πρωτεΐνη RpoS αποτελεί μια σίγμα – υπομονάδα (sigma subunit/sigma factor) της RNA πολυμεράσης. Σύμφωνα με τους Tanka et al. (1993), ο παράγοντας αυτός εμπλέκεται σε πολλές πτυχές της φυσιολογίας του κυττάρου. Έχει περιγραφεί για τη συμμετοχή του τόσο στην απάντηση στο στρες που προκαλείται από έλλειψη θρεπτικών συστατικών (starvation stress response), όσο και σε εκείνο που προκαλείται από το χαμηλό pH, σε *E.coli* και *Salmonella* spp. Γενικά, η RpoS, κάτω από στρεσογόνες συνθήκες, δεσμεύει την RNA πολυμεράση, ελέγχοντας έτσι την έκφραση ορισμένων γονιδίων, τα οποία τελικά αυξάνουν την αντοχή σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες (Rychlik and Barrow, 2005).

Φαίνεται ότι το RpoS ρεγουλόνιο ρυθμίζει περισσότερα από 50 γονίδια, πολλές όμως από τις λειτουργίες του παραμένουν άγνωστες. Στο παθογόνο βακτήριο *Salmonella* spp. το συγκεκριμένο ρεγουλόνιο ελέγχει τα γονίδια *spv*, *ots*, *katE*, *poxB* και *ogt*, ή *narZYWV*, καθώς και άλλα λιγότερο γνωστά. Γενικά, τα γονίδια που σχετίζονται με το συγκεκριμένο ρεγουλόνιο έχουν περιγραφεί καλύτερα στο βακτήριο *E.coli* από ότι

στο είδος *Salmonella* spp. Παρόλα αυτά αναμένεται ο ίδιος τρόπος ελέγχου της έκφρασής τους (Rychlik and Barrow, 2005).

Το RpoS ρεγουλόνιο είναι υπεύθυνο για την γενική οξειανθεκτικότητα που παρουσιάζει ο παθογόνος *Salmonella* spp. κατά τη στατική φάση, καθώς και για την εκδήλωση του ATR τόσο κατά τη λογαριθμική όσο και κατά τη στατική φάση. Η RpoS-εξαρτώμενη απόκριση στο όξινο στρες του παθογόνου, στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, εμφανίζεται μετά από προσαρμογή για τουλάχιστον τα 60 λεπτά της ώρας. Σε αυτή τη διάρκεια επάγεται η παραγωγή 50 περίπου πρωτεϊνών, οι 7 από τις οποίες καθορίζονται από το RpoS ρεγουλόνιο. Σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα μπορεί να επιτευχθεί ενίσχυση της γενικότερης οξειανθεκτικότητας του παθογόνου, αλλά η διαδικασία αυτή απαιτεί την παρουσία της πρωτεΐνης Fur, η οποία θα συζητηθεί στη συνέχεια (Rychlik and Barrow, 2005).



Εικόνα 1.4. Βακτηριακή RNA πολυμεράση

Οι σίγμα υπομονάδες της RNA πολυμεράσης, μια από τις οποίες είναι το RpoS, ανταγωνίζονται για την πρόσδεση τους στο ένζυμο. Έτσι, όταν κατά την RpoS-εξαρτώμενη προσαρμογή του παθογόνου, η ποσότητα του ρεγουλονίου μέσα στο κυτταρόπλασμα αυξάνεται, το κύτταρο οδηγείται σε όλο και μεγαλύτερη επαγωγή του ρεγουλονίου. Η ρύθμιση του ρεγουλονίου είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, που πραγματοποιείται σε όλα τα στάδια, από την μεταγραφή και τον έλεγχο της σταθερότητας του mRNA έως τη μετάφραση και την πρωτεόλυση του.

Fur και όξινη προσαρμογή

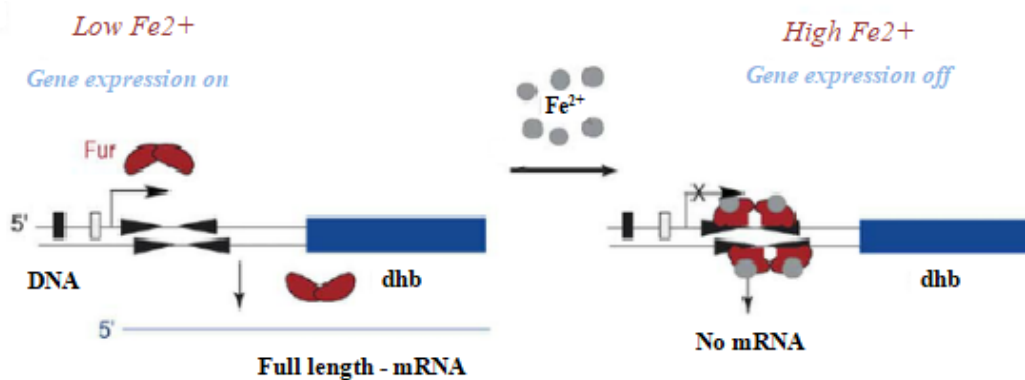
Η πρωτεΐνη Fur σχετίζεται, γενικά, με τον μεταβολισμό του σιδήρου στα βακτηριακά κύτταρα και θεωρείται αρνητικός ρυθμιστής, καθώς η σύνδεση του συμπλέγματος Fe^{2+} - Fur στη συγκεκριμένη αλληλουχία DNA που καλείται «fur box» οδηγεί στην παρεμπόδιση της γονιδιακής μεταγραφής. Εάν η ποσότητα σιδήρου είναι

περιορισμένη τότε τα ιόντα σιδήρου αποσπώνται από το σύμπλεγμα καθιστώντας την πρωτεΐνη ανίκανη να συνδεθεί στο «fur box» και έτσι πραγματοποιείται η μεταγραφή των κατεσταλμένων γονιδίων. Παρόλα αυτά η πρωτεΐνη fur είναι δυνατό να λειτουργήσει και ως θετικός ρυθμιστής, καθώς υπάρχουν πολλές πρωτεΐνες που απαιτούν το σύμπλεγμα Fe^{2+} - Fur για την έκφραση τους, καθώς και άλλες που χρειάζονται την πρωτεΐνη στην μη-συζευγμένη με το κατιόν του σιδήρου μορφή της.

Κατά τους Rychlik and Barrow (2005), οι πρωτεΐνες που ρυθμίζονται από τον παράγοντα *Fur* μπορούν να ομαδοποιηθούν σε εκείνες που σχετίζονται με την έλλειψη σιδήρου και σε εκείνες που προκύπτουν από την επίδραση του χαμηλού pH. Σε αυτή την ομαδοποίηση, εξαίρεση αποτελούν 7 πρωτεΐνες, που επηρεάζονται και από τους δύο αυτούς παράγοντες.

Όπως και το RpoS η πρωτεΐνη fur εμπλέκεται στον μηχανισμό ATR κατά τη λογαριθμική φάση. Αντίθετα όμως με εκείνο, η πρωτεΐνη fur είναι απαραίτητη για τη γρήγορη αλλά παροδική απόκριση στο όξινο στρες. Οδηγεί δε στην επαγωγή μίας ομάδας πρωτεϊνών, σε pH κοντά στο 5, που τελικά επιτρέπουν στο βακτήριο να επιβιώσει μιας επερχόμενης έκθεσης σε pH ίσο 3. Η επαγωγή των πρωτεϊνών αυτών λαμβάνει χώρα τα πρώτα 20 με 40 λεπτά της έκθεσης στο ήπια όξινο pH, αλλά σταματά μετά τα 60 λεπτά. Τότε είναι που επάγεται η δράση του RpoS-εξαρτώμενου ATR (Rychlik and Barrow, 2005).

Το γιατί η πρωτεΐνη αυτή σχετίζεται τόσο την αλλαγή pH όσο και με την έλλειψη σιδήρου στο περιβάλλον της παραμένει άγνωστο. Μια υπόθεση, ωστόσο, είναι η πρόληψη του οξειδωτικού στρες που συμβαίνει, τόσο εξαιτίας της συσσώρευσης του σιδήρου πάνω από ένα ορισμένο όριο (αυτό συμβαίνει μέσω της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου κατά την αντίδραση Fenton) όσο και λόγω χαμηλού pH. Τέλος, δεν υπάρχουν ακόμη αρκετές πληροφορίες για την ταυτότητα των γονιδίων που ρυθμίζονται μέσω της πρωτεΐνη fur, κατά την όξινη προσαρμογή (Foster, 1994).



Εικόνα 1.5. Σύνδεση του συμπλέγματος Fe²⁺ - Fur στο fur box και παρεμπόδιση της μεταγραφής

PhoPQ και όξινη προσαρμογή

Το διπαραγοντικό σύστημα *phoPQ* έχει βρεθεί σε βακτήρια όπως *Salmonella*, *E. coli*, *Shigella* και *Yersinia* (Groisman, 2001). Το σύστημα αποτελείται από δύο πρωτεΐνες τις *phoQ* και *phoP*. Η πρώτη είναι συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη και ο ρόλος της είναι να αντιδρά στις αλλαγές των συγκεντρώσεων Mg²⁺ και Ca²⁺. Όταν τα ιόντα αυτά εκλείπουν τότε η *phoQ* φωσφορυλιώνει τη δεύτερη πρωτεΐνη (*phoP*). Το ρεγουλόνιο που ρυθμίζει την επαγωγή του συστήματος *phoPQ* αποτελείται από 40 περίπου πρωτεΐνες και είναι ζωτικής σημασίας για τον παθογόνο *Salmonella* spp., καθώς αυξάνει την αντοχή σε αντιμικροβιακά πεπτίδια, συμβάλει στην αντίσταση στη φαγοκυττάρωση από μη-επαγγελματικά φαγοκύτταρα, κ.ά. Το κυρίαρχο σήμα για την έκφραση του *phoPQ* ρεγουλονίου είναι η χαμηλή συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου. Παρόλα αυτά, το σχετικά χαμηλό pH επηρεάζει επίσης την έκφραση του (Rychlik and Barrow, 2005).

Το γονίδιο *phoP* ήταν από τα πρώτα γονίδια που φάνηκαν να παίζουν ρόλο στην όξινη προσαρμογή (Foster, 1990). Ο τρόπος που έγινε αντιληπτό αυτό ήταν μέσω μιας μετάλλαξης του γονιδίου η οποία οδήγησε σε περιορισμένη προσαρμογή στο χαμηλό pH. Αργότερα αποδείχθηκε ότι η κύρια λειτουργία της *phoPQ*-εξαρτώμενης απόκρισης στο όξινο στρες είναι η προστασία του παθογόνου απέναντι στα ανόργανα οξέα (Bearson et al., 1998; Rychlik and Barrow, 2005).

OmpR/EnvZ και όξινη προσαρμογή

Το σύστημα *OmpR/EnvZ* έχει ως βασικό ρόλο τη μεταγωγή σήματος που αφορά στην οσμοεξαρτώμενη ρύθμιση των πρωτεϊνών *OmpC* και *OmpF*. Οι αλλαγές στην

οσμωτικότητα του περιβάλλοντος οδηγούν σε φωσφορυλίωση της EnvZ και μεταφορά του φωσφόρου σε μια συγκεκριμένη θέση του ρεγουλόνιου OmpR. Το φωσφορυλιωμένο OmpR, στη συνέχεια, προσδένεται στο DNA επάγοντας την μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Σε συνθήκες χαμηλής όσμωσης πραγματοποιείται σύνθεση της OmpF, ενώ η OmpC είναι μια από τις κυρίαρχες πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης κάτω από συνθήκες υψηλής όσμωσης.

Η επαγωγή του γονιδίου *ompC* φαίνεται πως συμβαίνει, επίσης, κατά την μετάβαση του παθογόνου *Salmonella* spp. σε περιβάλλον χαμηλού pH. Η επαγωγή αυτή είναι, και πάλι, ρυθμιζόμενη από το ρεγουλόνιο OmpR (Foster, 1994), όμως αντίθετα με την περίπτωση της οσμωεξαρτώμενης ρύθμισης, που είδαμε προηγουμένως, η EnvZ δεν απαιτείται για την έκφραση του ρεγουλόνιου OmpR κατά το όξινο στρες (Sato et al., 2000). Ο Rychlik υποστήριξε ότι η έκφραση του ρεγουλόνιου OmpR στον ορότυπο *Salmonella* ser. Typhimurium συνέβη σε μικρό μόνο βαθμό, ως απάντηση στην αλλαγή της οσμωτικότητας, σε αντίθεση με τη δεκαπλάσια έκφραση του κατά την όξινη καταπόνηση (Rychlik and Barrow, 2005). Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης, το γεγονός ότι το πολύ χαμηλό pH του στομάχου οδηγεί σε επαγωγή των κωδικοποιημένων γονιδίων SPI1, ενώ το pH σε τιμές κοντά στο 5 σε επαγωγή των κωδικοποιημένων γονιδίων SPI2. Άλλα γονίδια που σχετίζονται με την επαγωγή του OmpR είναι τα *hilA* και *ssrAB*, τα οποία σχετίζονται με την τοξικότητα του παθογόνου. Αυτό σημαίνει ότι το σύστημα *OmpR/EnvZ*, όμοια με το σύστημα *PhoPQ* και αντίθετα με τα *RpoS* και *Fur*, έχει σαν κύριο μέλημα την επαγωγή λοιμογόνων παραγόντων, σαν απόκριση στο χαμηλό pH και όχι την προστασία του κυττάρου. Τέλος, το ρεγουλόνιο OmpR παίζει ρόλο στην όξινη προσαρμογή της σαλμονέλας κατά τη στατική φάση ανάπτυξης, κάτι που αποτελεί ακόμη μια διαφορά του συστήματος OmpR με τους παράγοντες *RpoS* και *Fur* (Rychlik and Barrow, 2005).

Πίνακας 1.5. Οι κυριότεροι ρυθμιστικοί παράγοντες της απόκρισης στο όξινο στρες

Ρυθμιστικός παράγοντας	RpoS	Fur	PhoPQ	OmpR/EnvZ
Βασικός ρόλος	Stress	Stress	Virulence	Virulence
Είδος όξινου στρες	Οργανικά οξέα	Οργανικά οξέα	Ανοργανα οξέα	Οργανικά οξέα
Χρόνος προσαρμογής	60' (pH = 5)	20' (pH = 5)	-	-
Φάση ανάπτυξης	Εκθετική φάση	Εκθετική	Στατική φάση	Στατική φάση

(Log phase)

φάση (Log
phase)

(Stationary
phase)

(Stationary
phase)

1.5.3. Παράγοντες που επηρεάζουν το φαινόμενο απόκρισης στο όξινο στρες (ATR)

Πολλοί παράγοντες φαίνεται να εμπλέκονται στην εμφάνιση του μηχανισμού ATR των παθογόνων μικροοργανισμών. Το pH, η θερμοκρασία, το είδος του τροφίμου, η φάση της ανάπτυξης, το μέσο οξίνισης είναι κάποιοι από αυτούς. Στη μελέτη των Heo et al. ο ρυθμός θανάτωσης της *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium σε εμπορική μαγιονέζα ήταν μεγαλύτερος κατά το συνδυασμό χαμηλότερου pH και υψηλότερης θερμοκρασίας (Heo et al., 2010). Οι Lock and Board (1994) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι πιθανόν να υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στη θανάτωση του παθογόνου *Salmonella* spp., εκτός του pH και της συγκέντρωσης οξικού οξέος. Ο Vermeulen (2008) αναφέρει ως τέτοιους παράγοντες το είδος του μικροοργανισμού, το είδος και τη συγκέντρωση του οξέος, τη θερμοκρασία συντήρησης, το pH, καθώς επίσης και το βαθμό προσαρμοστικότητας του μικροοργανισμού. Οι παράγοντες αυτοί σε ένα βαθμό μπορούν να εξαλειφθούν μέσω της τήρησης των κανόνων ορθής πρακτικής (Good Manufacturing Practices), οι οποίοι, ως γνωστόν, παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ασφάλεια του τελικού προϊόντος.

Σύμφωνα με τους Alvarez-Ordóñez et al. (2010), το είδος του οξέος ως μέσο οξίνισης των προϊόντων παρουσιάζει σημαντική επίδραση στις κινητικές παραμέτρους κατά την επιβίωση/θανάτωση του βακτηρίου *Salmonella* ser. Typhimurium. Συγκεκριμένα, η μελέτη αυτή έδειξε ότι το οξικό οξύ αναστέλει την ανάπτυξη του παθογόνου σε pH μικρότερο ή ίσο του 6,4, ενώ το κιτρικό, το γαλακτικό και το υδροχλωρικό δρουν σε pH ίσο ή μικρότερο του 5,4. Οι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τα οξέα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό αποτελεσματικότητας στην θανάτωση του *Salmonella* ser. Typhimurium, που φαίνεται από τη σχέση: οξικό > γαλακτικό > κιτρικό > υδροχλωρικό οξύ.

Σε μια άλλη μελέτη ο Alvarez-Ordóñez και οι συνεργάτες του (2010) μελέτησαν την απόκριση του παθογόνου *Salmonella* spp. στο όξινο στρες σε διαφορετικές θερμοκρασίες από τους 4 έως και τους 37 βαθμούς κελσίου και κατέληξαν στο

συμπέρασμα ότι υπάρχει ξεκάθαρη αλληλεπίδραση μεταξύ θερμοκρασίας και ATR. Συγκεκριμένα τα μη-προσαρμοσμένα κύτταρα επιβίωσαν καλύτερα στις θερμοκρασίες 4 και 10°C, ενώ τα κύτταρα που είχαν υποστεί όξινη προσαρμογή επιβίωσαν καλύτερα στις θερμοκρασίες 25 και 37 °C. Είναι γνωστό ότι η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει το ρυθμό θανάτωσης των μικροβιακών κυττάρων σε όξινο pH, παρόλα αυτά δεν φάνηκε να ισχύει κάτι τέτοιο μετά την προσαρμογή. Αυτό ίσως οφείλεται στο ότι η χαμηλή θερμοκρασία ή κάποια συστατικά του τροφίμου πιθανόν να προκαλούν καταστολή των μηχανισμών απόκρισης στο όξινο στρες.

Οι Stopforth et al. (2005) μελέτησαν την επιβίωση του παθογόνου *Listeria monocytogenes* σε προσωμοίωση γαστρικού υγρού, μετά από προσαρμογή σε διαφορετικά οξέα. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το γαλακτικό οξύ είχε μεγαλύτερη επίδραση στην επιβίωση του παθογόνου και κατά συνέπεια στην εμφάνιση του μηχανισμού ATR σε σχέση με το οξικό οξύ.

Ο Alvarez-Ordóñez και οι συνεργάτες του (2012) έδειξαν, ακόμη, ότι η επιβίωση του παθογόνου *Salmonella* spp. ήταν μεγαλύτερη στο γιαούρτι από ότι στον χυμό πορτοκάλι σε όλες τις συνθήκες ανάπτυξης. Μάλιστα οι ερευνητές τόνισαν την εξαιρετικά μεγάλη διάρκεια επιβίωσης του παθογόνου μικροοργανισμού στο γιαούρτι, ως πιθανό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία σε περίπτωση που υπάρξει τέτοια επιμόλυνση. Η διαφορά μεταξύ των δυο προϊόντων εντοπίστηκε στο pH (γιαούρτι 4,1 και χυμός πορτοκάλι 3,6), ενώ η σύσταση του τροφίμου, επίσης παίζει ρόλο. Όσον αφορά στη σύσταση του τροφίμου, πολλές περιπτώσεις σαλμονέλλωσης έχουν συσχετιστεί με τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας λίπους (Kapperud et al. 1989, 1990; Vought and Tatini, 1998; Waterman and Small 1998). Κατά τους Waterman and Small (1998) και Alvarez-Ordóñez et al. (2009) τρόφιμα που διαθέτουν υψηλές συγκεντρώσεις λίπους και πρωτεϊνών είναι πιθανό να προστατεύουν τους μικροοργανισμούς από την επίδραση των οξέων. Από την άλλη μεριά, οι υδατάνθρακες δεν φαίνεται να προσφέρουν κάποια είδους προστασία, καθώς ο παθογόνος *Salmonella* spp. δεν επιβίωσε όταν εμβολιάστηκε στην επιφάνεια κόκκων ρυζιού (Waterman and Small, 1998).

1.5.4. Διαφοροποίηση μεταξύ στελεχών

Πολλοί ερευνητές αναφέρουν την παραλλακτικότητα σε επίπεδο στελέχους, σαν έναν από τους παράγοντες που καθορίζουν την απόκριση του παθογόνου *Salmonella* spp. σε συνθήκες όξινου στρες (Leyer and Johnson, 1992; Humphrey et al., 1995; Bacon et al., 2003; Semelis et al., 2003; Skandamis et al., 2009; Lianou and Koutsoumanis., 2011). Οι Lianou et al (2017) μελέτησαν την παραλλακτικότητα 30 διαφορετικών στελεχών του είδους *S. enterica* και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το φαινόμενο απόκρισης στο όξινο στρες του συγκεκριμένου παθογόνου εξαρτάται από το στέλεχος και ότι η αναμενόμενη επαγωγή του μηχανισμού ATR μέσω της γλυκόζης δεν επαληθεύεται για όλα τα στελέχη του είδους αυτού. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συμφωνούν με εκείνα των Berry and Cutter (2000), οι οποίοι κατηγοριοποίησαν το βακτήριο *E.coli* O157:H7 σε τρεις κατηγορίες βάσει του μηχανισμού ATR: α) στελέχη μονίμως οξεοανθεκτικά (των οποίων οι μη-προσαρμοσμένες αποικίες είναι ανθεκτικές στο όξινο περιβάλλον, β) στελέχη με επαγόμενο μηχανισμό ATR (των οποίων η γενική οξεοανθεκτικότητα ενισχύεται μέσω της προσαρμογής και γ) οξεο-ευαίσθητα στελέχη.

Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα της μελέτης των De Jonge et al. (2003). Οι ερευνητές μελέτησαν το ποσοστό επιβίωσης 20 στελεχών του παθογόνου *Salmonella* ser. Typhimurium μετά από 2 ώρες σε pH 2.5, τα οποία είχαν προηγουμένως προσαρμοστεί σε χαμηλό pH. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 8 από τα 20 στελέχη επιβίωσαν σε ποσοστό άνω του 10%, 3 στελέχη επιβίωσαν σε ποσοστό 5-10%, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη δεν επιβίωσαν.

Οι Berk et al. (2005), σε μελέτη τους, επίσης συμπέραναν ότι τα διάφορα στελέχη του παθογόνου *Salmonella* ser. Typhimurium DT104 παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα αντοχής στο όξινο στρες. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Για παράδειγμα στο στέλεχος 911 μια πρωτεΐνη του μαστιγίου αυξήθηκε κατά 82,4 φορές, μετά την επίδραση του όξινου pH. Το στέλεχος αυτό εμφάνισε χαμηλή ανοχή στο όξινο περιβάλλον. Η κίνηση με τη βοήθεια μαστιγίου συνδέεται άμεσα με την εισροή πρωτονίων στο κυτταρόπλασμα (MacNab 2003). Στο χαμηλό pH το κύτταρο προσπαθώντας να μειώσει την κατανάλωση ενέργειας μειώνει την κίνηση και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της εισροής πρωτονίων στο

κυτταρόπλασμα (Adams et al., 2001). Αυτό από ότι φαίνεται δε συνέβη στο στέλεχος 911 όπου παρατηρήθηκε αύξηση της εν λόγω πρωτεΐνης και αυτός είναι ίσως ο λόγος που το συγκεκριμένο στέλεχος δεν επιβίωσε στο όξινο περιβάλλον.

Οι Lianou and Koutsoumanis (2013) τόνισαν τη σημασία του χαρακτηρισμού των παθογόνων σε επίπεδο στελέχους, όσον αφορά στην οξεοανθεκτικότητα και θερμοανθεκτικότητα που επιδεικνύουν σε συνθήκες όξινου και θερμικού στρες, αντίστοιχα. Κάτι τέτοιο μπορεί να βοηθήσει την επιστημονική κοινότητα κατά την επιλογή στελεχών για την εκάστοτε μελέτη, που αφορά στη ασφάλεια των τροφίμων. Στη μελέτη τους για την απόκριση διαφορετικών στελεχών του είδους *S. enterica* στο όξινο και θερμικό στρες βρέθηκε μεγάλου βαθμού παραλλακτικότητα μεταξύ των στελεχών. Συγκεκριμένα, για τον βαθμό οξεοανθεκτικότητας που παρουσίασαν τα διαφορετικά στελέχη ο συντελεστής παραλλακτικότητας ήταν 39%, ενώ ο ρυθμός μείωσης (k_{acid}) μεταξύ των καμπυλών θανάτωσης των διαφορετικών στελεχών κυμάνθηκε από 0,47 έως 3,25 (h^{-1}).

Μελέτες που αφορούν στην παραλλακτικότητα σε επίπεδο στελέχους έχουν γίνει και σε άλλους παθογόνους όπως *E. coli* και *L. monocytogenes*. Οι Lundén et al. (2007) μελέτησαν την ανθεκτικότητα σε δύο είδη στρες (όξινο και θερμικό) για διαφορετικά στελέχη του παθογόνου *L. monocytogenes*. Στη μελέτη αυτή έγινε φανερό ότι τα στελέχη του εν λόγω παθογόνου παρουσιάζουν σε μεγάλο βαθμό παραλλακτικότητα στην οξεοανθεκτικότητα (διαφορά της τάξης των 6 λογαρίθμων) και μικρότερου βαθμού στην θερμοανθεκτικότητα (της τάξης των 3 λογαρίθμων). Σε άλλη μελέτη του ίδιου παθογόνου οι Lianou et al. (2006) βρήκαν, επίσης, μεγάλη παραλλακτικότητα στην οξεοανθεκτικότητα και τον ρυθμό ανάπτυξης, μεταξύ 25 διαφορετικών στελεχών του παθογόνου, τονίζοντας έτσι τον κίνδυνο εξαγωγής συμπερασμάτων από τη μελέτη ενός μόνο στελέχους σε άλλα στελέχη του ίδιου μικροοργανισμού.

1.6. Σκοπός της μελέτης

Με βάση τα παραπάνω, η προσαρμογή αποτελεί ένα μηχανισμός που βοηθά τα κύτταρα να επιβιώσουν, όταν αυτά βρεθούν αντιμέτωπα με δύσκολες περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν κατά την επεξεργασία και συντήρηση των τροφίμων, Ωστόσο, η ικανότητα προσαρμογής εξαρτάται τόσο από το μέσο

προσαρμογής, όσο και από το εξεταζόμενο μικροοργανισμό. Για το λόγο αυτό, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση υποθανάτιων συγκεντρώσεων οξικού οξέος και τιμών pH στην οξεοανθεκτικότητα έξι διαφορετικών στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. (3 στελέχη *Salmonella* ser. Enteritidis και 3 στελέχη *Salmonella* ser. Typhimurium) μετά από έκθεση σε εμπορικές συσκευσίες μαγιονέζας.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη ανήκουν στο είδος *Salmonella* spp. και προήλθαν από τη συλλογή του εργαστηρίου Υγιεινής και Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων και Ποτών και του εργαστηρίου Μικροβιολογίας, του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Συγκεκριμένα, οι μικροοργανισμοί ανήκουν στους ορότυπους *Salmonella* ser. Enteritidis (3 στελέχη) και *Salmonella* ser. Typhimurium (3 στελέχη).

Πίνακας 2.1. Ονόματα και προέλευση των υπό μελέτη στελεχών

Ορότυπος	Στέλεχος	Απομονώθηκε από:
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium	4/74	Έντερο μοσχαριού
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium	FS8	Χοιρινός κιμάς (βιομηχανία τροφίμων)
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium	FS115	Σουβλάκι κοτόπουλο (βιομηχανία τροφίμων)
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	PS4 P167807	Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων ΓΠΑ
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	ATCC 13076	American Type Culture Collection
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	WT	Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων ΓΠΑ

Για τη δημιουργία stock τρυβλίων, 10ml μεταφέρθηκαν σε 10ml TSB και επώαστηκαν στους 37oC για 24h. Στη συνέχεια, διατηρήθηκαν στους 4oC για ένα μήνα.

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω θρεπτικά υποστρώματα:

- Tryptone Soy Broth w/o Dextrose της εταιρίας LAB M, το οποίο δεν περιέχει δεξτρόζη (TSB Glu-).

Το Tryptone Soya Broth w/o Dextrose είναι ένα υγρό γενικό θρεπτικό υλικό που υποστηρίζει την ανάπτυξη πληθώρας μικροοργανισμών (βακτηρίων και μυκήτων). Στο πείραμα μας χρησιμοποιήθηκε για την ανανέωση των κυττάρων καθώς και για την προετοιμασία των όξινων διαλυμάτων προσαρμογής.

- Tryptone Soy Agar της εταιρίας LAB M με προσθήκη 0.1% Πυρουβικού Νατρίου της εταιρίας PanReac AppliChem (TSA/SP)

Το Tryptone Soya Agar είναι στερεό γενικό θρεπτικό υλικό που υποστηρίζει την ανάπτυξη πληθώρας μικροοργανισμών. Χρησιμοποιήθηκε για την απαρίθμηση των κυττάρων, με την προσθήκη 0.1% πυρουβικού νατρίου, ώστε να ανακτηθούν ακόμη και τα τραυματισμένα κύτταρα σαλμονέλας στο μέγιστο δυνατό βαθμό.

- Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD) της εταιρίας LAB M.

Πρόκειται για ένα επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα, το οποίο αρχικά σχεδιάστηκε για την ανάκτηση κυττάρων του μικροοργανισμού *Shigella* spp., ενώ στη συνέχεια αποδείχτηκε πως είναι ένα εξαιρετικό θρεπτικό υπόστρωμα για το είδος *Salmonella* spp. Η επιλεκτικότητα του υλικού βασίζεται σε μια μικρή ποσότητα (1g/L) δεοξυχολικού νατρίου. Είναι γενικά φτωχό σε θρεπτικά συστατικά ανάμεσα στα οποία είναι και η λυσίνη. Η σαλμονέλα αποκαρβοξυλιώνει τη λυσίνη ώστε να διατηρήσει το pH ουδέτερο. Κοντά σε ουδέτερο pH παράγει H₂S από την αναγωγή του θειοθειικού νατρίου παράγοντας έτσι μαύρες αποικίες ή διαφανείς αποικίες με μαύρο κέντρο.

2.2. Επιλογή των πειραματικών συνθηκών

Η επιλογή των πειραματικών συνθηκών έγινε βάσει προηγούμενης μελέτης του εργαστηρίου. Στην εν λόγω μελέτη εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών

συγκεντρώσεων οξικού οξέος στην οξεοανθεκτικότητα του στελέχους *Salmonella ser. Enteritidis* PT4 P167807, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.2. Πειραματικές συνθήκες προηγούμενης μελέτης, στην οποία βασίστηκε ο πειραματικός σχεδιασμός της παρούσας μελέτης

Συγκέντρωση ολικού οξικού οξέος (mM)	pH (μετά από ρύθμιση)	Συγκέντρωση αδιάστατου οξικού οξέος* (mM)	Υπό μελέτη στέλεχος	Μέσο προσαρμογής	Επίδραση στην οξεοανθεκτικότητα
15	5.0	2.4 ± 0.6			καμία
35	5.5	5.4 ± 1.1	<i>Salmonella ser. Enteritidis</i> PT4 P167807	Tryptone Soy Broth	αύξηση
45	6.0	5.5 ± 0.8			αύξηση

*Ο υπολογισμός του αδιάστατου οξικού οξέος έγινε με την εφαρμογή της εξίσωσης Henderson-Hasselbalch

Όπως φαίνεται στον πίνακα οι δύο από τις τρεις επεμβάσεις (35mM/pH 5.5 και 45mM/pH 6.0) καταλήγουν στην ίδια συγκέντρωση αδιάστατου οξικού οξέος. Η επίδραση όμως στην οξεοανθεκτικότητα του συγκεκριμένου στελέχους δεν είναι η ίδια στις δύο αυτές περιπτώσεις. Το στέλεχος *Salmonella ser. Enteritidis* PT4 P167807 χρησιμοποιήθηκε εκ νέου στην παρούσα μελέτη. Τα αποτελέσματα όσον αφορά την επίδραση στην οξεοανθεκτικότητα ήταν διαφορετικά.

2.3. Πειραματική διαδικασία

1^ο σταδιο: Ανανέωση

Για την ανάκτηση των μικροοργανισμών, που διατηρούνταν σε στοκ τρυβλία ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο ανανέωσης:

1. Μεταφορά μιας αποικίας σε 10 ml TSB Glu(-) και επώαση για 24 ώρες στους 37°C (A' Ανανέωση).
2. Στη συνέχεια μεταφορά 100μl από τη πρώτη ανανέωση σε 10 ml TSB Glu(-) και επώαση στους 37°C για 18 ώρες (B' ανανέωση).

3. Τέλος, μεταφορά των κυττάρων της δεύτερης ανανέωσης με streaking σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA και επώαση στους 37°C για 24 ώρες και εν συνεχεία συντήρηση στους 4°C για 30 ημέρες.

2ο στάδιο: προετοιμασία του μέσου προσαρμογής

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις ολικού οξικού οξέος 15mM, 35mM και 45mM., οι οποίες επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου. Για την παρασκευή του κάθε διαλύματος, ο κατάλληλος όγκος οξικού οξέος (1.5ml, 3.5ml και 4.5ml αντίστοιχα) προστέθηκε σε 100ml TSB Glu(-). Στη συνέχεια, τα διαλύματα αποστειρώθηκαν και ακολούθησε ρυθμισή τους, υπό ασηπτικές συνθήκες, στις τιμές 5.0, 5.5 και 6.0 αντίστοιχα, με την προσθήκη HCl ή NaOH. Τέλος, για τη μελέτη των μη προσαρμοσμένων κυττάρων (Non Adapted), χρησιμοποιήθηκε TSB Glu(-), χωρίς προσθήκη οξικού οξέος και ρύθμιση του pH. Τα κύτταρα που επαναιωρήθηκαν σε αυτό το μέσο χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας.

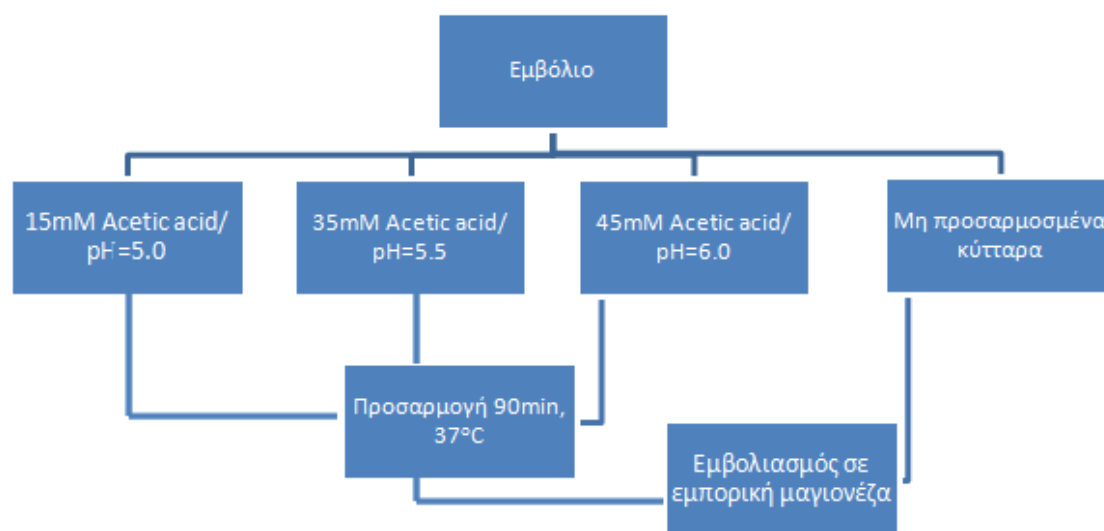
3ο στάδιο: προσαρμογή των κυττάρων

Μετά την ανάπτυξη ακολούθησε ο καθαρισμός του εμβολίου. Έγινε φυγοκέντρηση των κυττάρων (3600 rpm/10min) 3 φορές, με τις 2 πρώτες να περιλαμβάνουν επαναιώρηση των κυττάρων σε διάλυμα ringer και την τελευταία να ακολουθείται από επαναιώρηση στις διαφορετικές συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω. Για τα προσαρμοσμένα κύτταρα ακολούθησε προσαρμογή σε υδατόλουτρο, στους 37°C, για 90 λεπτά. Μετά το τέλος της προσαρμογής ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στους 37°C και στη συνέχεια το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 4 ml αραιωμένης μαγιονέζας (10g μαγιονέζας και 30ml ringer). Για τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα η επαναιώρηση στην αραιωμένη μαγιονέζα πραγματοποιήθηκε απευθείας, χωρίς να μεσολαβήσει στάδιο προσαρμογής.

Σε κάθε περίπτωση γινόταν καταμέτρηση του πληθυσμού μετά το τέλος της προσαρμογής. Επιπλέον γινόταν κάθε φορά καταμέτρηση της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX) στις συσκευασίες μαγιονέζας, οι οποίες θα χρησιμοποιούνταν στο πείραμα. Στο παρακάτω σχεδιάγραμμα φαίνεται συνοπτικά η πειραματική διαδικασία που ακολούθησαμε.

4ο στάδιο εμβολιασμός σε εμπορική μαγιονέζα

Μετά το τέλος της διαδικασίας προσαρμογής, ακολούθησε εμβολιασμός των δειγμάτων μαγιονέζας (0,8 ml εμβολίου σε 80g μαγιονέζας) με περίπου 10^7 cfu/g. Για την προετοιμασία των δειγμάτων, ζυγίστηκαν 80g μαγιονέζας σε πλαστικούς περιέκτες, υπό ασηπτικές συνθήκες. Το κάθε δείγμα κλείστηκε ερμητικά και αποθηκεύτηκε στους 5°C μέχρι το τέλος του πειράματος.



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας

Δειγματοληψία

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνται ανά τακτά χρονικά διαστήματα ανάλογα με το ρυθμό μείωσης που παρουσίαζε το κάθε στέλεχος.

Για τη δειγματοληψία, 90 ml ringer προστίθονταν σε 10g μαγιονέζας και μεταφέρονταν σε σακούλα stomacher. Ακολουθούσε ο κατάλληλος αριθμός δεκαδικών αραιώσεων και η απαρίθμηση των μικροοργανισμών γινόταν με την τεχνική της επίστρωσης σε τρυβλία που περιείχαν τα θρεπτικά υποστρώματα που προαναφέρθηκαν (TSA και XLD). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε εις διπλούν σε ανεξάρτητες επαναλήψεις.

Η μέτρηση του pH γινόταν μετά από κάθε δειγματοληψία. Επιπλέον πραγματοποιούνταν μέτρηση του pH για κάθε συσκευασία μαγιονέζας που θα χρησιμοποιούνταν στο πείραμα.

2.4. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS 23.0 for Mac. Οι διαφορές στους πληθυσμούς μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών προσδιορίστηκαν με βάση το τεστ Tukey και το ttest όπου η τιμή πιθανότητας μικρότερη του 0,05 ($P < 0.05$) θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

Επιπλέον, έγινε επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το στατιστικό πρόγραμμα GInafiT (Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool), χρησιμοποιώντας τα μοντέλα του Weibull και Albert. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε πίνακα. Ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 εκφράζει το άθροισμα των τετραγωνικών διαφορών μεταξύ των μετρούμενων τιμών και του μέσου όρου αυτών των τιμών. Ο συντελεστής αυτός παίρνει τιμές από το 0 έως το 1, και όσο πιο υψηλός είναι τόσο καλύτερα τα δεδομένα προσαρμόζονται στο μοντέλο. Η παράμετρος 4D εκφράζει το χρονικό διάστημα που απαιτείται για να μειωθεί ο πληθυσμός του παθογόνου κατά τέσσερις λογαρίθμους. Τέλος, τα γράμματα του λατινικού αλφαβήτου (a,b,c) εκφράζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών 4D ($P < 0.05$).

3. Αποτελέσματα – Συζήτηση

3.1. Αποτελέσματα

3.1.1. Φυσικοχημικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά της εμπορικής συσκευασίας μαγιονέζας

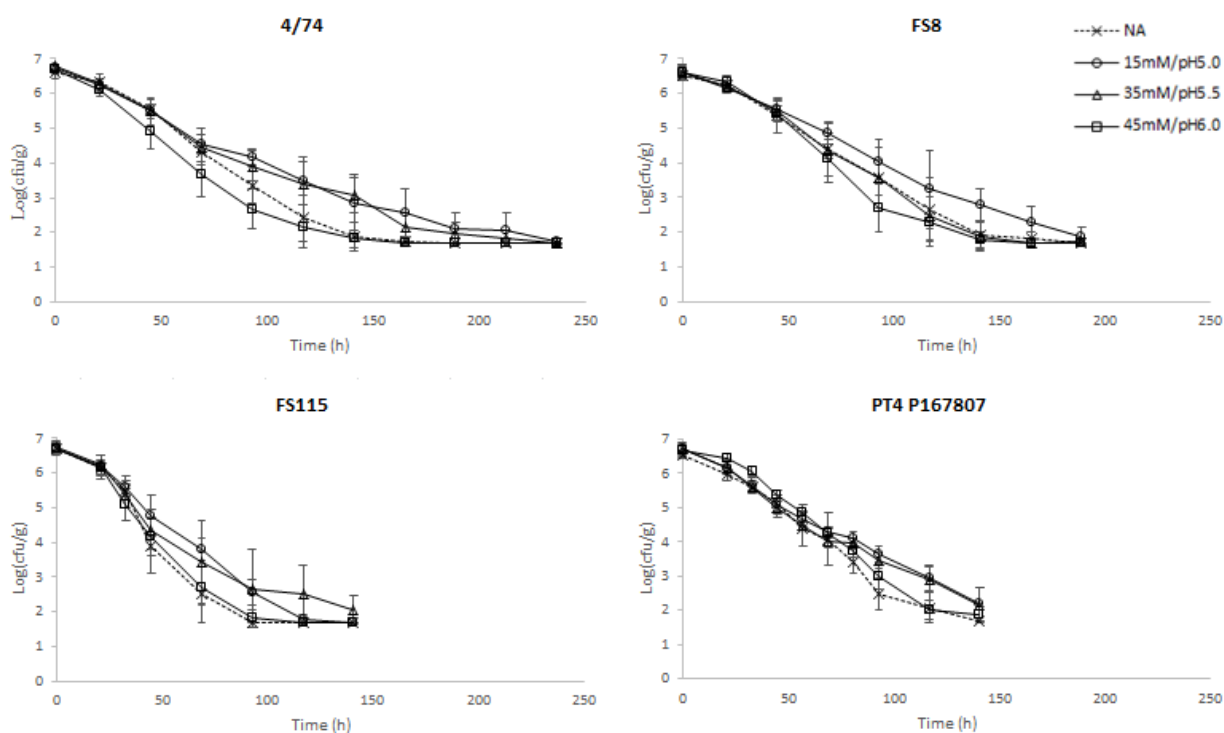
Το αρχικό pH των εμπορικών συσκευασιών μαγιονέζας μετρήθηκε και βρέθηκε, κατά μέσο όρο, 3.89 ± 0.05 . Για τις περισσότερες συσκευασίες, δεν ανιχνεύθηκε αρχική μικροχλωρίδα ($< 2 \log_{cfu/ml}$). Σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις, οι αρχικοί πληθυσμοί που καταμετρήθηκαν έφταναν μέχρι τους 3 λογαρίθμους. Παρόλα αυτά, η εγγενής μικροχλωρίδα της μαγιονέζας δεν επηρέασε την καταμέτρηση του παθογόνου, αφού για πληθυσμούς μικρότερους των 3-3.5 λογαρίθμων πραγματοποιήθηκε striking στο επιλεκτικό υπόστρωμα XLD, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι οι εν λόγω αποικίες δεν ανήκουν στο γένος *Salmonella* spp.

3.1.2. Επίδραση των συνθηκών προσαρμογής στην οξεοανθεκτικότητα των διαφορετικών στελεχών

Προκειμένου να διευκρινιστεί η επίδραση του αδιάστατου οξικού οξέος και του pH στην οξεοανθεκτικότητα διαφορετικών στελεχών του παθογόνου *Salmonella* ser. Typhimurium και *Salmonella* ser. Enteritidis μελετήθηκαν τρεις διαφορετικοί συνδυασμοί pH και αδιάστατου οξικού οξέος. Οι συνθήκες αυτές επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενα *in vitro* πειράματα με το στέλεχος PT4 P167807, με τις δύο από αυτές (15mM/pH5.0, 35mM/pH5.5) να παρουσιάζουν περίπου την ίδια θεωρητική συγκέντρωση αδιάστατου οξικού οξέος (περίπου 5.5mM), αλλά διαφορετική απόκριση στο στέλεχος αυτό (αύξηση, καμία επίδραση αντίστοιχα). Ως τρίτη συνθήκη προσαρμογής επιλέχθηκαν τα 45mM ολικού οξικού οξέος με τιμή pH 6.0, το οποίο αντιστοιχεί σε τιμή αδιάστατου οξικού οξέος 2.4mM.

Η προσαρμογή στις παραπάνω συνθήκες δεν είχε επίδραση στην οξεοανθεκτικότητα, των στελεχών 4/74, FS8 και PT4 P167807, αφού δεν εντοπίστηκαν ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ των προσαρμοσμένων σε οξικό οξύ και χαμηλό pH κυττάρων και

των μη προσαρμοσμένων κυττάρων. Παρόλα αυτά για ορισμένα χρονικά σημεία, εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$), αλλά αυτές ήταν οριακές (Παράρτημα: πίνακες 3.1., 3.2. και 3.3.). Αντίθετα, διαφορές, εντοπίστηκαν για το στέλεχος FS115, μεταξύ των κυττάρων που προσαρμόστηκαν σε 15mM ολικού οξικού οξέος και τιμής pH 5.0 και των μη προσαρμοσμένων κυττάρων (NA), με τα πρώτα να εμφανίζουν πληθυσμούς σημαντικά υψηλότερους ($P < 0.05$) κατά 1-1.5 λογάριθμο κατά τις 45, 69, 93 ώρες του χρόνου συντήρησης. Συγκεκριμένα, κατά τις 45, 69 και 93 ώρες οι πληθυσμοί που καταμετρήθηκαν ήταν 4.8 ± 0.6 , 3.8 ± 0.3 και 2.6 ± 0.4 logcfu/ml για τα προσαρμοσμένα κύτταρα και 3.9 ± 0.8 , 2.5 ± 0.3 και 1.7 ± 0.0 logcfu/ml για τα μη προσαρμοσμένα (Διάγραμμα 1; Παράρτημα: πίνακες 3.1., 3.2. και 3.3.). Επιπλέον, τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα έφτασαν στο όριο ανίχνευσης (2 logcfu/ml) σε 93 ώρες μετά τον εμβολιασμό (1.7 ± 0.0 logcfu/ml), ενώ αντίθετα χρειάστηκαν 117 ώρες για τα προσαρμοσμένα κύτταρα για να φτάσουν στον ίδιο πληθυσμό (1.8 ± 0.1 logcfu/ml). Τέλος, μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών προσαρμογής, δεν παρουσιάστηκαν ιδιαίτερες διαφορές.

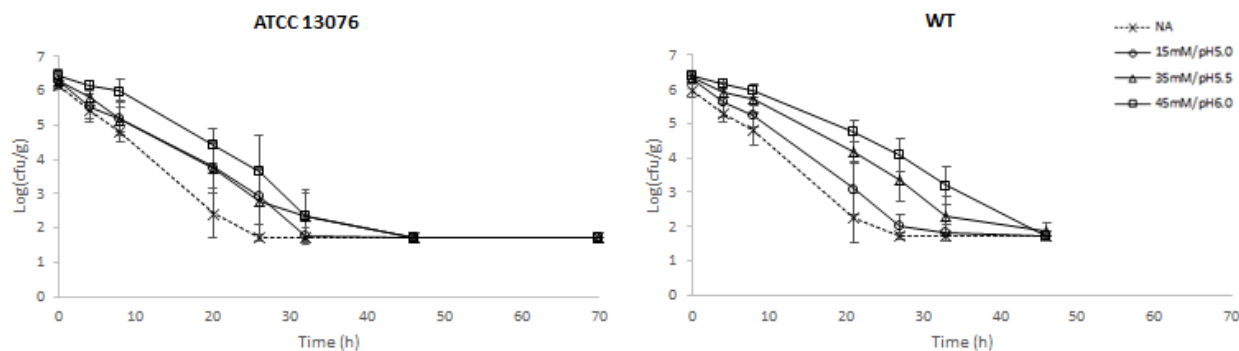


Διάγραμμα 1. Καμπύλες θανάτωσης των στελεχών *Salmonella* ser. Typhimurium 4/74, FS, FS1158 και *Salmonella* ser. Enteritidis PT4 P167807 σε θρεπτικό υπόπρωμα TSA/SP

Οι μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ των μη προσαρμοσμένων και προσαρμοσμένων κυττάρων εντοπίστηκαν για τα στελέχη ATCC 13076 και WT. Συγκεκριμένα, η

προσαρμογή του στελέχους ATCC 13076 σε 45mM/pH6.0 επηρέασε θετικά την οξεοανθεκτικότητα του. Σε σχέση με τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα, τα κύτταρα που προσαρμόστηκαν σε αυτές τις συνθήκες παρουσιάζουν πληθυσμούς σημαντικά υψηλότερους ($P < 0.05$), κατά 1.5-2 λογαρίθμους για τα χρονικά σημεία 20, 26 και 32. Για τα χρονικά σημεία αυτά καταμετρήθηκαν οι πληθυσμοί 4.4 ± 0.5 , 1.7 ± 1.0 και 2.3 ± 0.7 logcfu/ml για τα προσαρμοσμένα κύτταρα και αντίστοιχα, 2.4 ± 0.7 , 1.7 ± 0.1 και 1.7 ± 0.0 logcfu/ml για τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα. Επιπλέον, τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα φτάνουν στο όριο ανίχνευσης στις 20-26 ώρες μετά τον εμβολιασμό (1.7 ± 0.1 logcfu/ml). Αντίθετα, τα κύτταρα που προσαρμόστηκαν σε 45mM/pH6.0 έφτασαν σε πληθυσμό 2.3 ± 0.7 logcfu/ml στις 32h, όταν ο χρόνος συντήρησης για τα στελέχη αυτά δεν ξεπερνούσε τις 48 ώρες (Διάγραμμα 2, Παράρτημα: πίνακας 3.5.).

Την ίδια επίδραση (ενίσχυση της οξεοανθεκτικότητας) παρουσιάζει τόσο η προσαρμογή σε 45mM/pH6.0 και όσο και η προσαρμογή σε 35mM/pH5.5 για το στέλεχος WT. Με τις πρώτες συνθήκες (45mM/pH6.0) να έχουν μεγαλύτερη επίδραση σε σύγκριση με τις δεύτερες (35mM/pH5.5). Συγκεκριμένα, για τα χρονικά σημεία 21, 27 και 33 ώρες καταμετρήθηκαν οι εξής πληθυσμοί: 5.0 ± 0.3 , 4.3 ± 0.5 και 2.8 ± 0.6 logcfu/ml για τα προσαρμοσμένα κύτταρα σε 45mM/pH6.0, 4.3 ± 0.3 , 3.7 ± 0.4 και 2.8 ± 0.5 logcfu/ml για τα προσαρμοσμένα κύτταρα σε 35mM/pH5.5. 2.2 ± 0.7 και 2.2 ± 0.7 , 1.7 ± 0.1 και 1.7 ± 0.0 για τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα. Επιπλέον, τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα έφτασαν πολύ γρήγορα (21h) στο όριο ανίχνευσης (2.2 ± 0.7) σχέση με τα προσαρμοσμένα (33h) στις 2 παραπάνω συνθήκες. Αντίθετα, η προσαρμογή στις συνθήκες 15mM/pH5.0 δεν είχε καμία επίδραση στην οξεοανθεκτικότητα του μικροοργανισμού, αφού οι πληθυσμοί που καταμετρήθηκαν στην περίπτωση αυτή ήταν στα ίδια επίπεδα με τους αντίστοιχους των μη προσαρμοσμένων κυττάρων καθόλη τη διάρκεια του χρόνου συντήρησης ($P < 0.05$) (Διάγραμμα2, Παράρτημα: πίνακας 3.6.). Η παρατήρηση αυτή παρουσιάζει ενδιαφέρον, γιατί τα επίπεδα αδιάστατου οξικού οξέος είναι τα ίδια (2.5mM) για τις συνθήκες προσαρμογής 15mM/pH5.0 και 35mM/pH5.5. Παρόλα αυτά η επίδραση στην οξεοανθεκτικότητα του μικροοργανισμού δεν είναι η ίδια.



Διάγραμμα 2. Καμπύλες θανάτωσης των στελεχών *Salmonella ser. Enteritidis* ATCC 13076 και WT σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA/SP

Μια άλλη σημαντική παρατήρηση ήταν η παραλλακτικότητα στους χρόνους θανάτωσης μεταξύ των διαφορετικών στελεχών όταν η προσαρμογή έλαβε χώρα κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Η σύγκριση έγινε χρησιμοποιώντας την παράμετρο 4D η οποία ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται για μείωση του πληθυσμού κατά τέσσερις λογαρίθμους (Πίνακας 3.1.). Με βάση τα αποτελέσματα, τα στελέχη του ορότυπου *Salmonella ser. Enteritidis* ATCC 13076 και WT εμφάνισαν τις χαμηλότερες τιμές 4D ($P < 0.05$), ανεξαρτήτως της συνθήκης στην οποία προσαρμόστηκαν. Οι τιμές αυτές ήταν έως και πέντε φορές μικρότερες σε σχέση με τις τιμές τις οποίες εμφάνισαν τα στελέχη 4/74 και FS8 (και τα δύο ανήκουν στον ορότυπο *S. Typhimurium*) τα οποία παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές σε όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες. Για παράδειγμα, για την περίπτωση των μη προσαρμοσμένων κύτταρων, ο μέσος χρόνος για τη μείωση τεσσάρων λογαρίθμων για τα στελέχη ATCC 13076 και WT ήταν 22.36 (± 3.05) και 24.11 (± 2.83) ώρες αντιστοίχως, ενώ για τα στελέχη 4/74 και FS8 112.49 (± 11.12) και 117.03 (± 23.76) ώρες αντιστοίχως. Αντίστοιχα είναι και τα αποτελέσματα στις υπόλοιπες συνθήκες προσαρμογής.

Αντίθετα, το στέλεχος FS115 αποτέλεσε μια ενδιαμέση περίπτωση, με τιμές 4D που για τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα και τα κύτταρα που προσαρμόστηκαν στη συνθήκη 15mM/pH5.0 υπολογίστηκαν μεταξύ των υψηλότερων και χαμηλότερων τιμών ($P < 0.05$; (Πίνακας 3.1.). Ωστόσο, όταν το στέλεχος αυτό προσαρμόστηκε στη συνθήκη 35mM/pH5.5, οι τιμές 4D ήταν ίδιες με τις τιμές των στελεχών FS8 και PT4 P167807, ($P < 0.05$) ενώ όταν η προσαρμογή έγινε στη συνθήκη 45mM/pH6.0 δεν

εμφάνισε σημαντική διαφορά με κανένα στέλεχος ($P>0.05$). Τέλος, ο χρόνος (σε ώρες) που απαιτήθηκε ώστε το στέλεχος PT4 P167807 να παρουσιάσει τέσσερις λογαριθμικές μειώσεις ήταν ίδιος ($P<0.05$) με αυτόν που υπολογίστηκε για τα στελέχη 4/74, FS8 και FS115 ((Πίνακας 3.1.).

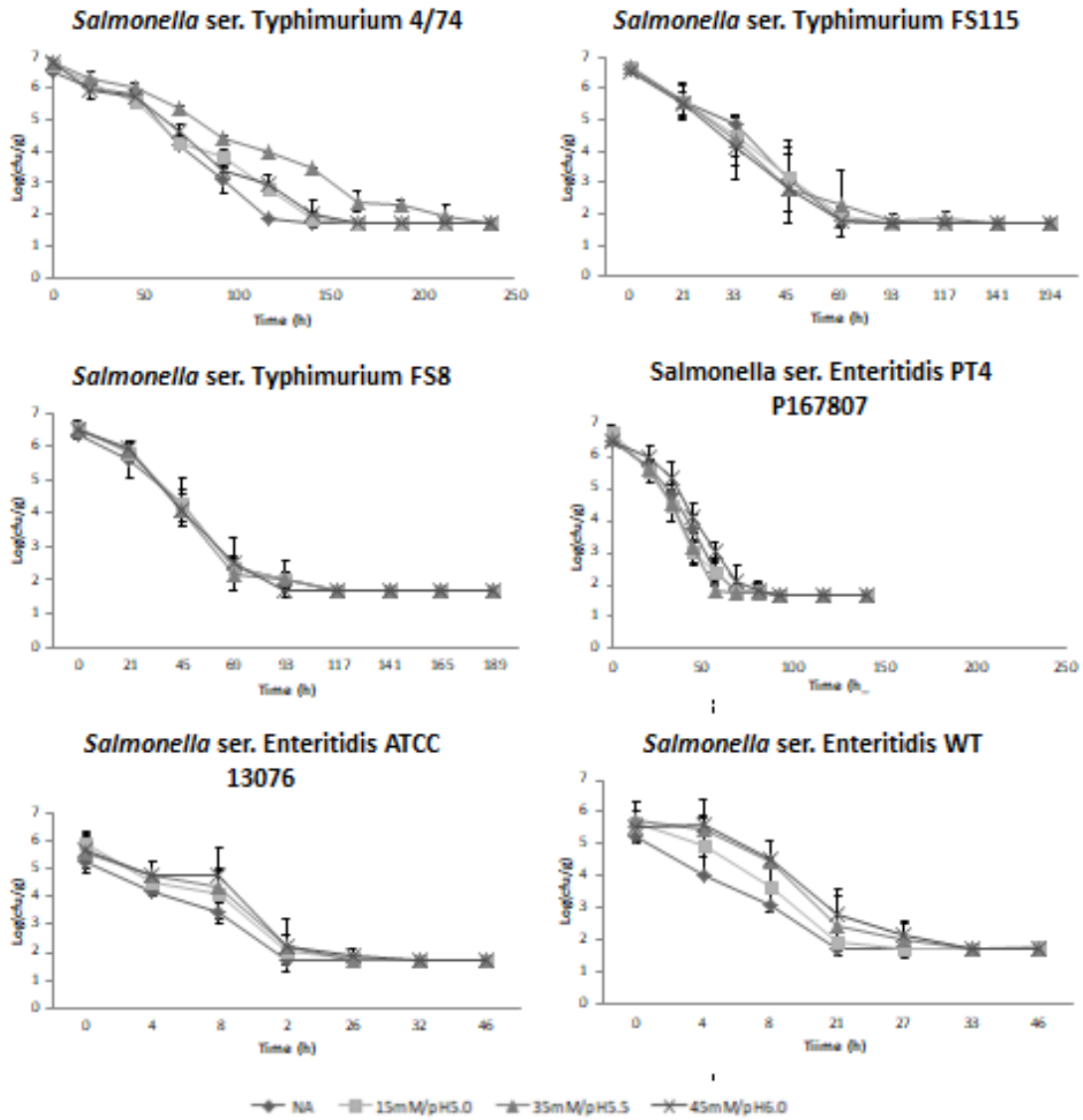
Πίνακας 3.1. Στατιστικά αποτελέσματα όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του προγράμματος Ginafit

Treatment	Strain	R²	4D
NA	PS1	0,9861 ± 0.0067	112.49 ± 11.12 (a)
NA	FS8	0,9773 ± 0,0058	117.03 ± 23.76 (a)
NA	FS115	0.9881 ± 0.0012	68.51 ± 5.98 (b)
NA	PS12	0.9742 ± 0.0145	96.02 ± 8.31 (ab)
NA	286	0,9860 ± 0,0012	22.37 ± 3.05 (c)
NA	287	0.9756 ± 0.0209	24.11 ± 2.83 (c)
15mM/pH5.0	PS1	0,9752 ± 0.018	153.08 ± 32.57 (a)
15mM/pH5.0	FS8	0.9732 ± 0.0019	141.12 ± 32.20 (a)
15mM/pH5.0	FS115	0.9799 ± 0.0099	88.20 ± 0.72 (b)
15mM/pH5.0	PS12	0.9638 ± 0.0062	117.03 ± 5.64 (ab)
15mM/pH5.0	286	0,9498 ± 0,0315	29.59 ± 1.83 (c)
15mM/pH5.0	287	0,9743 ± 0,0099	25.40 ± 3.81 (c)
35mM/pH5.5	PS1	0.9690 ± .0178	139.07 ± 17.74 (a)
35mM/pH5.5	FS8	0.9743 ± 0.0072	115.47 ± 14.87 (ab)
35mM/pH5.5	FS115	0.9791 ± 0.0066	88.65 ± 37.81 (b)
35mM/pH5.5	PS12	0.9660 ± 0.0084	113.74 ± 7.10 (ab)
35mM/pH5.5	286	0.9808 ± 0.0096	31.89 ± 7.82 (c)

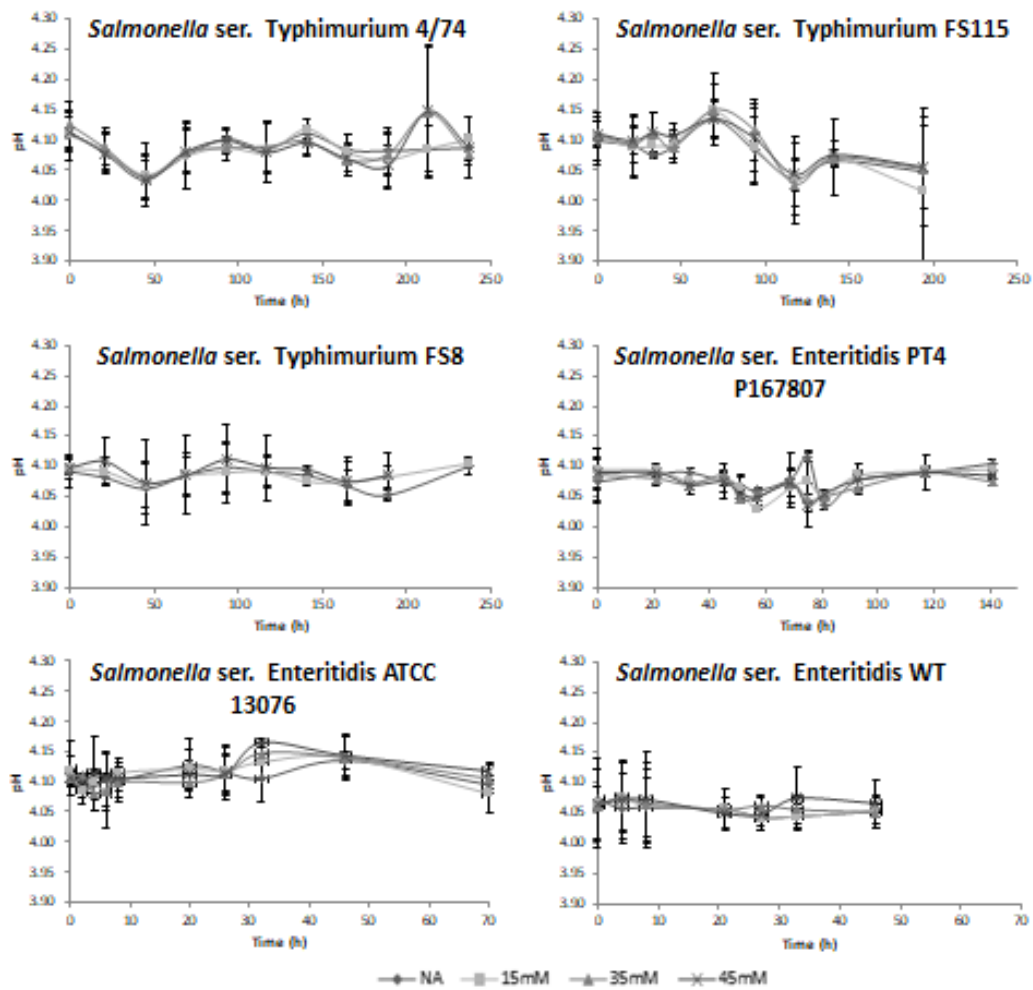
35mM/pH5.5	287	0,9704 ± 0.0187	36.84 ± 5.08 (c)
45mM/pH6.0	PS1	0.9853 ± 0.0077	92.47 ± 22.17 (a)
45mM/pH6.0	FS8	0.9554 ± 0.0087	97.96 ± 19.49 (a)
45mM/pH6.0	FS115	0.9844 ± 0.0030	65.83 ± 14.22 (ab)
45mM/pH6.0	PS12	0.9882 ± 0.0017	98.23 ± 3.26 (a)
45mM/pH6.0	286	0.9791 ± 0.0100	33.20 ± 5.92 (b)
45mM/pH6.0	287	0.9901 ± 0.0056	39.26 ± 4.15 (b)

Όσον αφορά τη χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων για την καταμέτρηση των πληθυσμών, η χρησιμοποίηση του επιλεκτικού υποστρώματος XLD οδήγησε σε κάθε περίπτωση σε σημαντικά μειωμένες ανακτήσεις σε σχέση με το γενικό υπόστρωμα TSA/SP (Διάγραμμα 3), πιθανόν λόγω της αυξημένης επιλεκτικότητας του υλικού σε συνδυασμό με τον τραυματισμό των κυττάρων. Στο στέλεχος FS8, για παράδειγμα, παρατηρούνται διαφορές έως και 2.5 λογαρίθμων μεταξύ των δύο υποστρωμάτων. Συγκεκριμένα για τα προσαρμοσμένα κύτταρα σε 35mM/pH5.5, στις 69 ώρες καταμετρήθηκαν $4.7 \pm 0.6 \log_{cfu/g}$ και $2.2 \pm 0.5 \log_{cfu/g}$ στα υποστρώματα TSA/SP και XLD, αντίστοιχα. Παρόμοιες διαφορές εντοπίστηκαν και για τα υπόλοιπα στελέχη. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα αποτελέσματα που ανακτήθηκαν στο γενικό υπόστρωμα TSA/SP.

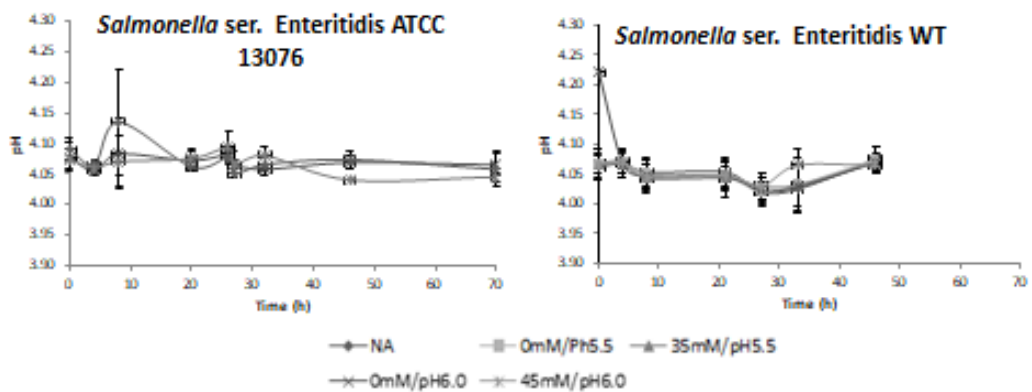
Τέλος, όσον αφορά τις τιμές του pH, παρέμειναν αμετάβλητες στα αρχικά τους επίπεδα για όλη τη διάρκεια του χρόνου συντήρησης (Διάγραμμα 4; Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 3. Καμπύλες θανάτωσης των στελεχών 4/74, FS, FS1158, PT4 P167807 ATCC 13076 και WT σε θρεπτικό υπότρομα XLD



Διάγραμμα 4. Διακύμανση της τιμής του pH με την πάροδο του χρόνου κατά το 1^ο μέρος του πειράματος

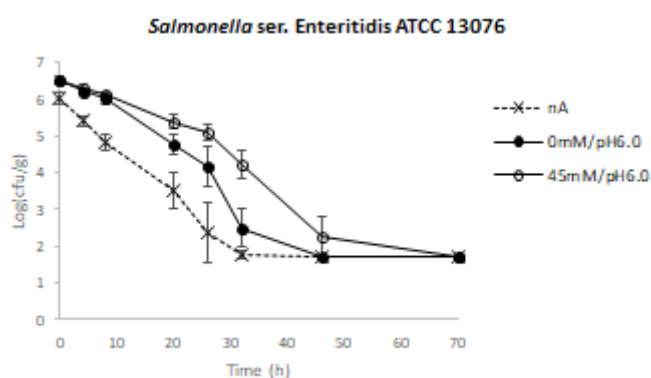


Διάγραμμα 5. Διακύμανση της τιμής του pH με την πάροδο του χρόνου κατά το 2^ο μέρος του πειράματος

3.1.3. Επίδραση του διαφορετικού παράγοντα (pH ή αδιάστατο οξικό οξύ) στην οξεοανθεκτικότητα

Στόχος του επόμενου σταδίου ήταν να εξεταστεί η επίδραση του κάθε παράγοντα ξεχωριστά (pH, αδιάστατο οξικό οξύ) στην μεταβολή της οξεοανθεκτικότητας. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν τα δύο στελέχη με τις μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων (ATCC 13076, WT) καθώς και οι αντίστοιχες συνθήκες προσαρμογής που οδήγησαν στην αύξηση της οξεοανθεκτικότητας (45mM/pH6.0 για το στέλεχος ATCC 13076; 35mM/pH5.5, 45mM/pH6.0 για το στέλεχος WT). Η επίδραση του αδιάστατου οξικού οξέος εξετάστηκε έναντι της δράσης του pH (0mM/pH5.5 και 0mM/pH6.0), χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα.

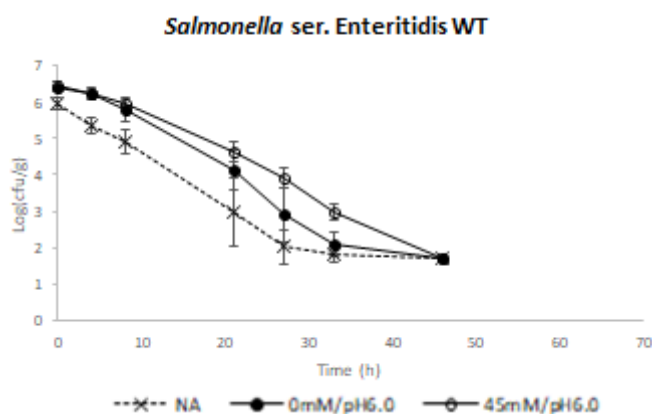
Για την περίπτωση του στελέχους ATCC 13076, η προσαρμογή σε pH6.0 (0mM αδιάστατου οξικού οξέος) οδήγησε σε αυξημένους πληθυσμούς σε σχέση με το μάρτυρα (μη προσαρμοσμένα κύτταρα). Ωστόσο, η προσθήκη του οξικού οξέος επέδρασε ακόμα περισσότερο στην οξεοανθεκτικότητα του μικροοργανισμού, αφού σημαντικά υψηλότεροι πληθυσμοί περίπου 2 λογαρίθμων ($P < 0.05$) ανακτήθηκαν μετά τις 20 ώρες του χρόνου συντήρησης μεταξύ των συνθηκών 0mM/pH6.0 και 45mM/pH6.0 (Διάγραμμα 6).



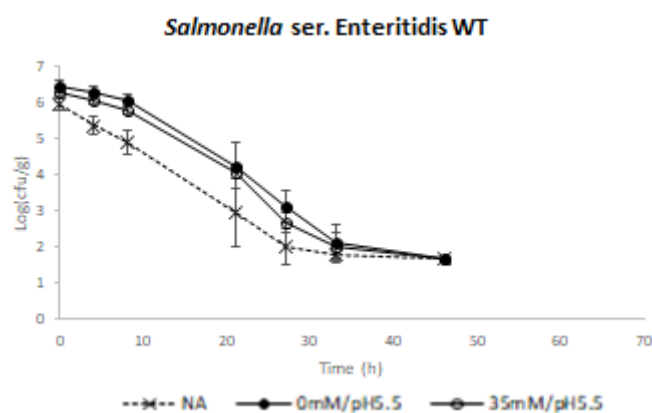
Διάγραμμα 6. Επίδραση του pH και επίδραση της συγκέντρωσης αδιάστατου οξέος στο στέλεχος ATCC 13076

Ωστόσο, αντίθετα είναι τα αποτελέσματα για τα στέλεχος WT. Στην περίπτωση αυτή η προσαρμογή σε 0mM/pH6.0 επέδρασε θετικά στην οξεοανθεκτικότητα του συγκεκριμένου στελέχους οδηγώντας σε πληθυσμούς σημαντικά υψηλότερους (περίπου 1-1.2 λογάριθμους) σε σχέση με τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα. Αντίθετα, η προσθήκη του οξικού οξέος δε μετέβαλλε σημαντικά την απόκριση των κυττάρων,

αφού στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) μεταξύ των κυττάρων που προσαρμόστηκαν με την επίδραση του pH και αυτών στα οποία προστέθηκε οξικό οξύ παρατηρήθηκαν μόνο κατά τις 27 και 33 ώρες του χρόνου συντήρησης με λογαριθμικές διαφορές 0.9 και 0.3 αντίστοιχα (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7. Επίδραση του pH και της συγκέντρωσης αδιάστατου οξέος στο στέλεχος *Salmonella ser. Enteritidis WT*



Διάγραμμα 8. Επίδραση του pH και της συγκέντρωσης αδιάστατου οξέος στο στέλεχος *Salmonella ser. Enteritidis WT*

Όσον αφορά τη συνθήκη 35mM/pH5.5, η προσαρμογή μόνο υπό την επίδραση του pH5.5 (0mM/pH5.5) οδήγησε σε υψηλότερους πληθυσμούς μέχρι και τις 27 ώρες μετά τον εμβολιασμό. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές, η προσθήκη του οξικού οξέος δεν επηρέασε ιδιαίτερα τους καταμετρούμενους πληθυσμούς. Αν και για τα χρονικά σημεία των 4 και 8 ωρών οι διαφορές μεταξύ των προσαρμοσμένων σε οξικό οξύ και

pH κρίθηκαν στατιστικά σημαντικές ($P < 0.05$), αφορούν διαφορές 0.2 logcfu/g (4 και 8 ώρες) και 0,5 logcfu/g (27 ώρες) που είναι ιδιαίτερα μικρές (Διάγραμμα 8).

3.2. Συζήτηση

Η διαστελεχιακή παραλλακτικότητα του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella* spp. έχει γίνει αντικείμενο μελέτης από διάφορους μελετητές. Οι Lianou et al. (2017) μελέτησαν την απόκριση 30 διαφορετικών στελεχών *S. enterica* στο όξινο στρες και έδειξαν ότι η επίδραση της όξινης προσαρμογής στην καμπύλη θανάτωσης είναι διαφορετική ανάλογα με το στέλεχος. Σε άλλη μελέτη, οι Lianou and Koutsoumanis (2011) έδειξαν ότι η παραλλακτικότητα μεταξύ των διαφορετικών στελεχών αυξήθηκε με την αύξηση της έντασης των στρεσογόνων παραγόντων, όπως pH και NaCl.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, η προσαρμογή σε διαφορετικούς συνδυασμούς τιμών pH και συγκεντρώσεων αδιάστατου οξικού οξέος με μετέπειτα εμβολιασμό στη μαγιονέζα επέδρασε διαφορετικά στα διάφορα στελέχη. Σε κάποιες από τις περιπτώσεις, παρατηρήθηκε αύξηση της οξεοανθεκτικότητας, όπως για παράδειγμα η προσαρμογή σε 15mM/pH5.0 για το στέλεχος FS115, 45mM/pH6.0 για το στέλεχος ATCC 13076 και 45mM/pH6.0 και 35mM/pH5.5 για το στέλεχος WT. Για τις υπόλοιπες περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ προσαρμοσμένων και μη προσαρμοσμένων κυττάρων. Σύμφωνα με τους Berk et al. (2005), οι οποίοι μελέτησαν την απόκριση στο όξινο στρες σε διαφορετικά στελέχη της *Salmonella* ser. Typhimurium, τα στελέχη κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες: υψηλής, μέτριας και χαμηλής αντοχής. Η παραλλακτικότητα μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του παθογόνου σχετίζεται με διάφορες ενδοκυτταρικές παραμέτρους, όπως η σύνθεση ορισμένων πρωτεϊνών και ο λόγος $H^+/ATPase$ (Berk et al., 2005).

Ως μέσα για τη μεταβολή της οξεοανθεκτικότητας στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν η τιμή του pH και η συγκέντρωση οξικού οξέος. Για ορισμένες από τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, η επίδραση του κάθε παράγοντα στην όξινη ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών ήταν διαφορετική και εξαρτώμενη από το εξεταζόμενο στέλεχος. Για παράδειγμα, η προσαρμογή σε ίδιες συγκεντρώσεις αδιάστατου οξικού οξέος αλλά διαφορετικής τιμής pH (συνθήκες 15mM/pH5.0 και

35mM/pH5.5) επηρέασε διαφορετικά τα στελέχη FS115 και WT. Το στέλεχος FS115 εμφάνισε αυξημένη οξεοανθεκτικότητα όταν προσαρμόστηκε σε 15mM/pH5.0 (περίπου 2,4 mM αδιάστατο οξικό οξύ), ωστόσο οριακές μεταβολές σε σχέση με τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα παρατηρήθηκαν όταν η προσαρμογή πραγματοποιήθηκε στη συνθήκη 35mM/pH5.5, η οποία είχε την ίδια συγκέντρωση αδιάστατου οξικού οξέος αλλά διαφορετική τιμή pH. Το ακριβώς αντίθετο ισχύει για το στέλεχος WT, στο οποίο ανακτήθηκαν αυξημένοι πληθυσμοί όταν η προσαρμογή έγινε σε 35mM/pH5.5, ενώ καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε για τη συνθήκη 15mM/pH5.0. Συνεπώς, η τιμή του pH επηρέασε την προσαρμοστικότητα των στελεχών αυτών και μάλιστα με διαφορετικό τρόπο.

Ο ρόλος του κάθε παράγοντα ξεχωριστά (pH, αδιάστατο οξικό οξύ) είναι πιο εμφανής στο δεύτερο κομμάτι της μελέτης, όπου εκεί η επίδραση του pH εξετάστηκε έναντι της δράσης του του αδιάστατου οξικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, η προσαρμογή σε 45mM/pH6.0 (περίπου 5,5mM αδιάστατο οξικό οξύ) για το στέλεχος ATCC 13076 αποτέλεσε το σημαντικότερο παράγοντα που επέδρασε στην οξεοανθεκτικότητα του μικροοργανισμού τόσο σε σχέση με τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα, όσο και με τα κύτταρα που προσαρμόστηκαν μόνο με την επίδραση του pH6.0. Αντίθετα, για το στέλεχος WT, η προσαρμογή στην ίδια συνθήκη οδήγησε σε πιο οριακές μεταβολές (μέχρι 1 λογάριθμο; $P < 0.05$) προς το τέλος του χρόνου συντήρησης σε σχέση με τα κύτταρα που προσαρμόστηκαν σε 0mM/pH6.0, υποδεικνύοντας ότι για το στέλεχος αυτό, η προσαρμογή σε pH6.0 είχε μεγαλύτερη επίδραση. Συνεπώς, ο βαθμός επίδρασης του κάθε παράγοντα ήταν διαφορετικός για το κάθε στέλεχος, ενώ ο συνδυασμός τους οδήγησε στο μεγαλύτερο βαθμό οξεοανθεκτικότητας. Όσον αφορά την προσαρμογή σε 35mM/pH5.5, η προσαρμογή αποκλειστικά με τη δράση του pH ήταν ο καθοριστικός παράγοντας που συνέβαλε στην αυξημένη ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού κατά τη συντήρηση του στη μαγιονέζα.

Επιπλέον, διαφορετική ήταν και η ανθεκτικότητα του κάθε στελέχους στη μαγιονέζα. Ο ρυθμός θανάτωσης ήταν διαφορετικός ανάμεσα στα διάφορα στελέχη και στις περισσότερες περιπτώσεις, ανεξάρτητος από την ικανότητα προσαρμογής του κάθε στελέχους. Τα στελέχη *Salmonella ser. Enteritidis* ATCC 13076 και *Salmonella ser. Enteritidis* WT αποδείχθηκαν τα λιγότερα ανθεκτικά, φτάνοντας στο όριο ανίχνευσης μέσα σε λιγότερο από 48 ώρες. Τη μεγαλύτερη οξεοανθεκτικότητα παρουσίασαν τα

στελέχη *Salmonella* ser. Typhimurium 4/74 και *Salmonella* ser. Typhimurium FS8, ενώ τα στελέχη *Salmonella* ser. Enteritidis PT4 P1678707 και *Salmonella* ser. Typhimurium FS115 αποτέλεσαν δύο ενδιάμεσες περιπτώσεις, με το στέλεχος PT4 P1678707 να παρουσιάζει σε κάποιες περιπτώσεις τιμές ίδιες με τα στελέχη 4/74 και FS8.

Τέλος, ιδιαίτερα σημαντική κρίνεται η χρήση του μέσου έκθεσης. Πιο συγκεκριμένα, σε προηγούμενη *in vitro* μελέτη, η προσαρμογή του στελέχους *Salmonella* ser. Enteritidis PT4 P1678707 σε 35mM/pH5.5 και 45mM/pH6.0 είχε οδηγήσει σε αυξημένη οξεοανθεκτικότητα σε σχέση με τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα. Ωστόσο, η χρήση της μαγιονέζας ως μέσο έκθεσης είχε διαφορετικά αποτελέσματα, αφού δε σημειώθηκαν ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ των μη προσαρμοσμένων και των προσαρμοσμένων στη συνθήκη αυτή κυττάρων.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες. Οι Shen et al., (2007) μελέτησαν την όξινη προσαρμογή του παθογόνου *Salmonella* Typhimurium και την επιβίωση των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων, κατά τη διάρκεια γαλακτικής ζύμωσης και συντήρησης, σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Απο τη μελέτη αυτή φαίνεται ότι στα διαφορετικά τρόφιμα το ίδιο στέλεχος παρουσιάζει διαφορές στον βαθμό επιβίωσης. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι για την επιβίωση του παθογόνου μετά την προσαρμογή σε συνθήκες όξινου στρες δεν παίζει ρόλο μόνο η διαστελεχειακή παραλλακτικότητα αλλά και το μέσο στο οποίο βρίσκεται, καθώς και πιθανά περισσότεροι παράγοντες.

Ο Doyle και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι τα προσαρμοσμένα κύτταρα του παθογόνου *L. monocytogenes* ήταν πιο ανθεκτικά στο θερμικό στρες από εκείνα που δεν είχαν υποστεί προσαρμογή (Doyle et al., 2001). Οι Foster and Hall (1991) μελέτησαν το φαινόμενο απόκρισης στο όξινο στρες σε 16 στελέχη *Salmonella* ser. Typhimurium και έδειξαν ότι η διαδικασία της όξινης προσαρμογής ενίσχυσε την επιβίωση των κυττάρων κατά την μετέπειτα έκθεση τους σε pH μικρότερο του 4. Ετσι λοιπόν, αναμέναμε τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα (NA) να θανατώνονται ταχύτερα από εκείνα που υποβλήθηκαν σε όξινη προσαρμογή. Εντούτοις δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές στις καμπύλες θανάτωσης. Μάλιστα, σε δύο από τις τρεις περιπτώσεις, και συγκεκριμένα στα στελέχη 4/74 και FS8 φαίνεται τα μη

προσαρμοσμένα κύτταρα να επιβιώνουν καλύτερα από εκείνα που προσαρμόστηκαν στα 45mM οξικού οξέος/pH 6. Παρόλα αυτά, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα η παρατήρηση αυτή δεν έχει ιδιαίτερη αξία, καθώς η διαφορά στους μικροβιακούς πληθυσμούς είναι της τάξεως του 0.5 logcfu/ml. Συγκεκριμένα για το στέλεχος *Salmonella ser. Typhimutium* 4/74, 69 ώρες μετά τον εμβολιασμό τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα βρίσκονται στους 4.3 λογαρίθμους ενώ αυτά που υπέστησαν όξινη προσαρμογή σε 45mM οξικού οξέος/pH 6 βρίσκονται στους 3.7 λογαρίθμους. Αντίστοιχα για το στέλεχος *Salmonella ser. Typhimutium* FS8, την ίδια χρονική στιγμή τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα βρίσκονται στους 4.4 λογαρίθμους ενώ εκείνα που προσαρμόστηκαν σε 45mM/pH6.0 βρίσκονται στους 4.1 λογαρίθμους. Φαίνεται λοιπόν ότι τα συγκεκριμένα στελέχη δεν παρουσιάζουν το φαινόμενο της απόκρισης στο όξινο στρες υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες.

Στην περίπτωση του στελέχους *Salmonella ser. Enteritidis* ATCC 13076, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών επεμβάσεων (NA, 0mM/pH6.0 και 45mM/pH6.0). Τα κύτταρα, τα οποία δεν προσαρμόστηκαν φτάνουν στο όριο ανίχνευσης στις 32 ώρες από τη στιγμή του εμβολιασμού, ενώ εκείνα που προσαρμόστηκαν σε pH ίσο με 6, με ή χωρίς οξικό οξύ, φτάνουν στο όριο ανίχνευσης στις 46 ώρες. Έτσι, φαίνεται ότι η περίοδος προσαρμογής έπαιξε ρόλο στην επιβίωση του συγκεκριμένου στελέχους. Κατά τις δύο διαφορετικές επεμβάσεις, παρατηρείται μία περίοδος ως τις 8 ώρες, όπου οι δύο πληθυσμοί επιβιώνουν το ίδιο καλά. Στη συνέχεια τα κύτταρα που βρίσκονται υπό την επίδραση του pH και μόνο (0mM οξικού οξέος) φαίνεται να θανατώνονται ταχύτερα από εκείνα που βρίσκονται υπό την επίδραση του οξέος (45mM οξικού οξέος). Όσον αφορά στο στέλεχος WT, είναι φανερό ότι η συγκέντρωση του οξέος δεν παίζει κάποιον ιδιαίτερο ρόλο αφού τόσο μετά την προσαρμογή σε pH 5.5 απουσία οξικού οξέος, όσο και μετά την προσαρμογή σε pH 5.5 με προσθήκη 35mM οξικού οξέος τα κύτταρα επιβιώνουν στο ίδιο βαθμό. Συνεπώς, η προσαρμογή του συγκεκριμένου στελέχους οφείλεται στο χαμηλό pH και η αντοχή στο όξινο στρες δεν ενισχύεται από την επίδραση του οξέος όπως συμβαίνει με το στέλεχος ATCC 13076.

Εν κατακλείδι, η προσαρμογή σε υποθανάτιες συνθήκες οξικού οξέος και χαμηλών τιμών pH είναι πιθανό να επηρεάσει την οξεοανθεκτικότητα του παθογόνου *Salmonella* spp. και να ενισχύσει την μετέπειτα επιβίωση του σε προϊόντα εμπορικής

μαγιονέζας. Ωστόσο, η ικανότητα προσαρμογής παραλλάσει ανάλογα με τις συνθήκες προσαρμογής και το εξεταζόμενο στέλεχος. Επιπλέον, ο κάθε ορότυπος παρουσιάζει διαφορετική εγγενή οξεοανθεκτικότητα μέσα στο συγκεκριμένο προϊόν. Τέλος, η συγκέντρωση οξικού οξέος και το χαμηλό pH επιδρούν διαφορετικά στον κάθε μικροοργανισμό.

Η προσαρμογή του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. στο όξινο στρες παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων, καθώς κατά την επεξεργασία των τροφίμων οι μικροοργανισμοί είναι δυνατό να εκτεθούν σε ήπια όξινο περιβάλλον το οποίο δυνητικά μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη επιβίωση του παθογόνου μέσα στο τρόφιμο. Κάποιοι ερευνητές προτείνουν, μάλιστα, τη χρήση προσαρμοσμένων κυττάρων (και όχι υγιείς αποικίες) για εργαστηριακά πειράματα που αφορούν στην ασφάλεια των τροφίμων, καθώς κάτι τέτοιο ανταποκρίνεται καλύτερα στην πραγματικότητα (Leyer et al., 1995, Lianou and Koutsoumanis, 2013).

Τέλος, η αυξημένη ικανότητα προσαρμογής στο όξινο στρες μπορεί να είναι δείκτης της λοιμογόνου δράσης του παθογόνου *Salmonella* spp., καθώς η επιβίωση στο όξινο pH ενός τροφίμου σημαίνει αντίστοιχα επιβίωση στο pH του στομάχου. Σε αυτό το πλαίσιο, θα παρουσίαζε μεγάλο ενδιαφέρον η μελέτη της επιβίωσης του παθογόνου σε προσομοίωση γαστρικού οξέος.

Παράρτημα

Πίνακας 3.1. Καταμετρούμενοι πληθυσμοί (cfu/g) του στελέχους *Salmonella ser. Typhimurium 4/74* σε εμπορική μαγιονέζα μετά από όξινη προσαρμογή

Time (h)	Non-adapted	15mM/pH5.0	35mM/pH5.5	45mM/pH6.0
0	6.6 ± 0.2 (a)	6.7 ± 0.1 (a)	6.8 ± 0.1 (a)	6.7 ± 0.1 (a)
21	6.3 ± 0.2 (a)	6.2 ± 0.1 (ab)	6.3 ± 0.1 (ab)	6.1 ± 0.2 (b)
45	5.5 ± 0.3 (a)	5.5 ± 0.1 (a)	5.5 ± 0.4 (a)	4.9 ± 0.5 (b)
69	4.3 ± 0.3 (a)	4.5 ± 0.3 (a)	4.5 ± 0.5 (a)	3.7 ± 0.7 (b)
93	3.4 ± 0.5 (b)	4.2 ± 0.2 (a)	3.9 ± 0.4 (a)	2.7 ± 0.6 (c)
117	2.4 ± 0.7 (b)	3.5 ± 0.7 (a)	3.4 ± 0.6 (a)	2.2 ± 0.6 (b)
141	1.9 ± 0.4 (b)	2.8 ± 0.9 (a)	3.1 ± 0.5 (a)	1.8 ± 0.2 (b)
165	1.7 ± 0.1 (bc)	2.6 ± 0.7 (a)	2.2 ± 0.4 (ab)	1.7 ± 0.0 (c)
189	1.7 ± 0.0 (b)	2.1 ± 0.5 (a)	2.0 ± 0.3 (ab)	1.7 ± 0.0 (b)
213	1.7 ± 0.0 (b)	2.1 ± 0.5 (a)	1.8 ± 0.2 (ab)	1.7 ± 0.0 (b)
237	1.7 ± 0.0 (a)	1.7 ± 0.1 (a)	1.7 ± 0.0 (a)	1.7 ± 0.0 (a)

Πίνακας 3.2. Καταμετρούμενοι πληθυσμοί (cfu/g) του στελέχους *Salmonella ser. Typhimurium* FS8 σε εμπορική μαγιονέζα μετά από όξινη προσαρμογή

Time (h)	Treatment (Log(cfu/g) ± StDev)			
	Non-adapted	15mM/pH5.0	35mM/pH5.5	45mM/pH6.0
0	6.5 ± 0.1 (a)	6.6 ± 0.2 (a)	6.6 ± .2 (a)	6.6 ± 0.2 (a)
21	6.3 ± 0.1 (ab)	6.1 ± 0.2 (b)	6.2 ± 0.2(ab)	6.3 ± 0.2 (a)
45	5.4 ± 0.5 (a)	5.5 ± 0.3 (a)	5.5 ± 0.3 (a)	5.4 ± 0.2 (a)
69	4.4 ± 0.3 (a)	4.8 ± 0.3 (a)	4.4 ± 0.8 (a)	4.1 ± 0.7 (a)
93	3.6 ± 0.9 (a)	4.0 ± 0.6 (a)	3.6 ± 0.5 (a)	2.7 ± 0.7 (b)
117	2.7 ± 0.9 (a)	3.2 ± 1.1 (a)	2.5 ± 0.8 (a)	2.3 ± 0.7 (a)
141	1.9 ± 0.4(a)	2.8 ± 0.5 (b)	1.9 ± 0.4 (a)	1.8 ± 0.2 (a)
165	1.8 ± 0.2 (a)	2.3 ± 0.5 (b)	1.7 ± 0.0 (a)	1.7 ± 0.0 (a)
189	1.7 ± 0.0 (a)	1.9 ± 0.3 (b)	1.7 ± 0.1 (a)	1.7 ± 0.0 (a)

Πίνακας 3.3. Καταμετρούμενοι πληθυσμοί (cfu/g) του στελέχους *Salmonella ser. Typhimurium* FS115 σε εμπορική μαγιονέζα μετά από όξινη προσαρμογή

Time (h)	Treatment (Log(cfu/g) ± StDev)			
	Non-adapted	15mM/pH5.0	35mM/pH5.5	45mM/pH6.0
0	6.7 ± 0.1 (a)	6.7 ± 0.2 (a)	6.8 ± 0.2 (a)	6.7 ± 0.2 (a)
21	6.1 ± 0.2 (a)	6.2 ± 0.3 (a)	6.2 ± 0.3 (a)	6.2 ± 0.2 (a)
33	5.5 ± 0.2 (a)	5.6 ± 0.3 (ab)	5.4 ± 0.4 (ab)	5.1 ± 0.5 (b)
45	3.9 ± 0.8 (b)	4.8 ± 0.6 (a)	4.4 ± 0.6 (ab)	4.2 ± 0.6 (ab)
69	2.5 ± 0.3 (b)	3.8 ± 0.3 (a)	3.4 ± 1.2 (ab)	2.7 ± 1.0 (b)
93	1.7 ± 0.0 (b)	2.6 ± 0.4 (a)	2.7 ± 1.1 (a)	1.8 ± 0.3 (b)
117	1.7 ± 0.0 (b)	1.8 ± 0.1 (b)	2.5 ± 0.9 (a)	1.7 ± 0.0 (b)
141	1.7 ± 0.0 (b)	1.7 ± 0.9 (b)	2.1 ± 0.4 (a)	1.7 ± 0.0 (b)

Πίνακας 3.4. Καταμετρούμενοι πληθυσμοί (cfu/g) του στελέχους *Salmonella ser. Enteritidis* PT4 P16787 σε εμπορική μαγιονέζα μετά από όξινη προσαρμογή

Time (h)	Treatment (Log(cfu/g) ± StDev)			
	Non-adapted	15mM/pH5.0	35mM/pH5.5	45mM/pH6.0
0	6.2 ± 0.1 (b)	6.3 ± 0.2 (ab)	6.3 ± 0.2 (ab)	6.5 ± 0.2 (a)
4	5.4 ± 0.2 (b)	5.5 ± 0.4 (b)	5.8 ± 0.2 (ab)	6.1 ± 0.1 (a)
8	4.8 ± 0.3 (b)	5.2 ± 0.5 (b)	5.2 ± 0.4 (b)	6.0 ± 0.3 (a)
20	2.4 ± 0.7 (b)	3.8 ± 0.8 (a)	3.7 ± 0.7 (a)	4.4 ± 0.5 (a)
26	1.7 ± 0.1 (b)	2.9 ± 0.8 (a)	2.8 ± 1.0 (a)	3.7 ± 1.0 (a)
32	1.7 ± 0.0 (b)	1.8 ± 0.2 (ab)	2.3 ± 0.8 (a)	2.3 ± 0.7 (a)
46	1.7 ± 0.0 (a)	1.7 ± 0.1 (a)	1.7 ± 0.1 (a)	1.7 ± 0.0 (a)
70	1.7 ± 0.0 (a)	1.7 ± 0.0 (a)	1.7 ± 0.9 (a)	1.7 ± 0.0 (a)

Πίνακας 3.5. Καταμετρούμενοι πληθυσμοί (cfu/g) του στελέχους *Salmonella ser. Enteritidis* ATCC 13076 σε εμπορική μαγιονέζα μετά από όξινη προσαρμογή

Time (h)	Treatment (Log(cfu/g) ± StDev)			
	Non-adapted	15mM/pH5.0	35mM/pH5.5	45mM/pH6.0
0	6.2 ± 0.1 (b)	6.3 ± 0.2 (ab)	6.3 ± 0.2 (ab)	6.5 ± 0.2 (a)
4	5.4 ± 0.2 (b)	5.5 ± 0.4 (b)	5.8 ± 0.2 (ab)	6.1 ± 0.1 (a)
8	4.8 ± 0.3 (b)	5.2 ± 0.5 (b)	5.2 ± 0.4 (b)	6.0 ± 0.3 (a)
20	2.4 ± 0.7 (b)	3.8 ± 0.8 (a)	3.7 ± 0.7 (a)	4.4 ± 0.5 (a)
26	1.7 ± 0.1 (b)	2.9 ± 0.8 (a)	2.8 ± 1.0 (a)	3.7 ± 1.0 (a)
32	1.7 ± 0.0 (b)	1.8 ± 0.2 (ab)	2.3 ± 0.8 (a)	2.3 ± 0.7 (a)
46	1.7 ± 0.0 (a)	1.7 ± 0.1 (a)	1.7 ± 0.1 (a)	1.7 ± 0.0 (a)
70	1.7 ± 0.0 (a)	1.7 ± 0.0 (a)	1.7 ± 0.9 (a)	1.7 ± 0.0 (a)

Πίνακας 3.6. Καταμετρούμενοι πληθυσμοί (cfu/g) του στελέχους *Salmonella ser. Enteritidis* WT σε εμπορική μαγιονέζα μετά από όξινη προσαρμογή

Time (h)	Treatment (Log(cfu/g) ± StDev)			
	Non-adapted	15mM/pH5.0	35mM/pH5.5	45mM/pH6.0
0	6.0 ± 0.2 (b)	6.3 ± 0.1 (a)	6.3 ± 0.2 (a)	6.4 ± 0.1 (a)
4	5.3 ± 0.3 (c)	5.6 ± 0.4 (bc)	5.9 ± 0.3 (ab)	6.1 ± 0.1 (a)
8	4.8 ± 0.5 (c)	5.2 ± 0.3 (b)	5.7 ± 0.4 (a)	6.0 ± 0.2 (a)
21	2.2 ± 0.7 (d)	3.1 ± 0.7 (c)	4.2 ± 0.3 (b)	4.8 ± 0.3 (a)
27	1.7 ± 0.1 (c)	2.0 ± 0.4 (c)	3.4 ± 0.6 (b)	4.1 ± 0.5 (a)
33	1.7 ± 0.0 (c)	1.8 ± 0.2 (c)	2.3 ± 0.6 (b)	3.2 ± 0.5 (a)
46	1.7 ± 0.0 (b)	1.7 ± 0.0 (b)	1.8 ± 0.3 (a)	1.7 ± 0.5 (b)

Βιβλιογραφία

- Adams P., Fowler R., Kinsella N., Howel G., Farris M., Coote P. and O'Connor, C.D., 2001. Proteomic detection of PhoPQ- and acid-mediated repression of *Salmonella* motility. *Proteomics*, 1, 597–607.
- Alvarez-Ordóñez A., Fernández A., López M. and Bernardo A., 2009. Relationship between membrane fatty acid composition and heat resistance of acid and cold stressed *Salmonella* senftenberg CECT 4384. *Food Microbiology*, 3, 347-353
- Alvarez-Ordóñez A., Fernández A., Bernardo A. and López M., 2010. Acid tolerance in *Salmonella* Typhimurium induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. *Food Microbiology*, 27, 44–49
- Alvarez-Ordóñez A., Valde s L., Bernardo A., Prieto M. and López M., 2012. Survival of acid adapted and non-acid adapted *Salmonella* Typhimurium in pasteurized orange juice and yogurt under different storage temperatures. *Food Science and Technology International*, 19, 407–414
- Bacon R.T, Sofos J.N., Kendall P.A., Belk K.E. and Smith G.C., 2003. Comparative Analysis of Acid Resistance between Susceptible and Multi-Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Strains Cultured under Stationary-Phase Acid Tolerance–Inducing and Noninducing Conditions. *Journal of Food Protection*, 66, 732–740
- Bang I.S., Audia J.P., Park Y.K. and Foster J.W., 2002. Autoinduction of the ompR response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response. *Mol. Microbiol.* 44, 1235–1250
- Bang I.S., Kim B.H., Foster J.W. and Park Y.K., 2000. OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 182, 2245-2252
- Bearson B.L., Wilson L. and Foster, J.W. (1998) A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *Journal of Bacteriology*, 180, 2409–2417
- Berk P.A., Jonge de R., Zwietering M.H., Abee T. and Kieboom J., 2005. Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 99, 859-866. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02658.x
- Berry, E.D., Cutter, C.N., 2000. Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1493e1498.

- Beuchat L.R., RYU J.H., ADLER B.B. and HARRISON M.D., 2006. Death of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in Shelf-Stable, Dairy-Based, Pourable Salad Dressings. *Journal of Food Protection*, 69, 801–814.
- Bollaerts K., Aerts M., Faes C., Grijspeerdt K., Dewulf J. and Mintiens K., 2008. Human Salmonellosis: Estimation of Dose-Illness from Outbreak Data. *Risk Analysis*, 28, 427-40. doi: 10.1111/j.1539-6924.2008.01038.x.
- Bouchrif B., Paglietti B., Murgia M, Piana A., Cohen N., Ennaji M.M., Rubino S. and Timinouni M., 2009. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from food in Morocco. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3, 35-40
- Brantl S., 2006. Bacterial gene regulation: metal ion sensing by proteins or RNA. *Trends in Biotechnology*, 24, 384-387. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.07.004
- D'Aoust, J.-Y. 1997. *Salmonella* species, p. 129–158. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.
- D'Aoust J.-Y., 1991. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 17-40
- Davidson P., Taylor T., Schmidt S., 2013. Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds, p. 765-801. In Doyle M, Buchanan R (ed), *Food Microbiology*. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555818463.ch30
- De Jonge R., Ritmeester W.S. and van Leusden F.M., 2003. Adaptive responses of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and other *S. Typhimurium* strains and *Escherichia coli* O157 to low pH environments
- Depree J.A. and Savage G.P., 2001. Physical and flavour stability of mayonnaise. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 157–163
- De Souza Sant'Ana A. (Ed), (2017) *Quantitative Microbiology in Food Processing: Modeling the Microbial Ecology*. John Wiley and sons, West Sussex, UK
- Doyle M.P., 1996. Statement by Michael P. Doyle, Ph.D., Professor and Director, University of Georgia, Center for Food Safety and Quality Enhancement.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14, 4634,231. doi:10.2903/j.efsa.2016.4634
- FDA, 2012. *Bad Bug Book - Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins*. 2nd edition. [Pathogenic bacteria, pp. 9-13]

- Foster J.W. and Hall H.K., 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 172, 771–778
- Foster J.W. and Hall H.K., 1991. Inducible pH Homeostasis and the Acid Tolerance Response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 173, 5129–5135. doi: 0021-9193/91/165129-07\$02.00/0
- Foster J.W., Park Y.K., Bang I.S., Karem K., Betts H., Hall H.K. and Shaw E., 1994. Regulatory circuits involved with pH regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*, 140, 341–352
- Foley S.M., Johnson T.J., Ricke S.C., Nayak R. and Danzeisen J., 2013. *Salmonella* Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77, 582–607. doi: 10.1128/MMBR.00015-13 PMID: PMC3973385
- Freese E., Sheu C.W. and Galliers E., 1973. Function of Lipophilic Acids as Antimicrobial Food Additives. *Nature* 241, 321–325. doi:10.1038/241321a0
- Ganguly S., Mukhopadhyay S.K. and Biswas S., 2012. Potential threat to human health from foodborne illness having serious implications on public health- a Review. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 1, 65–68
- Glass K.A. and Doyle M.P., 1991. Fate of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in Commercial, Reduced-Calorie Mayonnaise. *Journal of Food Protection*, 54, 691-695. doi:10.4315/0362-028X-54.9.691
- Goldberg M.B. and Rubin R.H., 1988. The spectrum of *Salmonella* infection. *Infectious Diseases Clinics of North America*, 2, 571-98.
- Goldberg M.B. and Rubin R.H., 1988. The spectrum of *Salmonella* infection. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2, 571-598.
- Grimont P.A.D. and Weill F.-X., 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris, France: Pasteur Institute; 2007
- Groisman, E.A., 2001. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP–PhoQ. *Journal of Bacteriology*, 183, 1835–1842.
- Harrison M., (2017). Revision notes for the FRCEM primary. 2nd edition. Oxford University Press. Oxford, UK.
- Hengge-Aronis R., 2002. Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the σ S (RpoS) Subunit of RNA Polymerase Regime. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 373–395
- Hennessy T.W., Hedberg C.W., Slutsker L., White K.E., Besser-Wiek J.M., Moen M.E., Feldman J., Coleman W.W., Edmonson L.M., MacDonald K.L., Osterholm

M.T., 1996. A national outbreak of *Salmonella enteritidis* infections from ice cream. The Investigation Team. The National England Journal of Medicine, 16,1281–6.

Heo S.K., Lee J.Y., Jo S.H., Bae D.H., Kim Y.S., Chung M.S., Ha S.D., 2010. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in commercial mayonnaise at different temperatures and pH. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 53, 351–355.

Hills A.G., 1973. pH and the Henderson-Hasselbalch Equation. The American Journal of Medicine, 55, 131–133

Humphrey T.J., Slater E., McAlpine K., Rowbury R.J. and Gilbert R.J., 1995. *Salmonella enteritidis* phage type 4 isolates more tolerant of heat, acid, or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces. Applied and Environmental Microbiology 61, 3161–3164

Man C.M.D., Jones A.A. (eds), (1994). Ambient-stable sauces and pickles. Shelf Life Evaluation of Foods. Springer, Boston, MA

Krebs, H. A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A., Bedoya, F., 1983. Studies on the mechanism of the anti-fungal action of benzoate. Biochemical Journal 214, 657–663.

Lahuerta A., Westrell T., Takkinen J., Boelaert F., Rizzi V., Helwigh B., Borck B., Korsgaard H., Ammon A., Mäkelä P., (2011). Zoonoses in the European Union: origin, distribution and dynamics - the EFSA-ECDC summary report 2009. Euro Surveill, 16, 19832. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19832>

Leyer G.J. and Johnson E.A., 1992. Acid Adaptation Promotes Survival of *Salmonella* spp. in Cheese. Applied and Environmental Microbiology, 2075–2080. doi: 0099-2240/92/062075-06\$02.00/0

Leyer G.J., Wang L.L and Johnson E.A., 1995. Acid Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 Increases Survival in Acidic Foods. Applied and environmental Microbiology, 61, 3752–3755

Lianou A., Stopforth J.D., Yoon Y., Wiedmann M., and Sofos J.N., 2006. Growth and Stress Resistance Variation in Culture Broth among *Listeria monocytogenes* Strains of Various Serotypes and Origins. Journal of Food Protection, 69, 2640–2647. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.11.2640>

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

Lianou A., Nychas G.-J.E. and Koutsoumanis K.P., 2017. Variability in the adaptive acid tolerance response phenotype of *Salmonella enterica* strains. Food Microbiology 62, 99–105

Leushner R. G. K. and Boughtflower M.P., 2001. Standardized Laboratory-Scale Preparation of Mayonnaise Containing Low Levels of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Journal of Food Protection*, 64, 623-629

Lock J.L. and Board R.G., 1994. The fate of *Salmonella enteritidis* PT4 in deliberately infected commercial mayonnaise. *Food Microbiol.*, 11, 499–504

Lundén J., Tolvanen R. and Korke H., Acid and heat tolerance of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* food plant strains Authors J. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 276–280. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02305.x

MacNab R.M., 2003. How bacteria assemble flagella. *Annual Review of Microbiology*, 57, 77–100

Meng, X., Kim, S., Puligundla, P. and Ko, S., 2014. Carbon dioxide and oxygen gas sensors possible application for monitoring quality, freshness, and safety of agricultural and food products with emphasis on importance of analytical signals and their transformation. *J. Korean Soc. Appl. Biological Chem.* 57, 723–733

Oliveira, M., Abadias, M., Usall, J., Torres, R., Teixidó, N. and Viñas, I., 2015. Application of modified atmosphere packaging as a safety approach to fresh-cut fruits and vegetables – A review. *Trends Food Sci. Technol.* 46, 13–26

Pardo G. and Zufía J., 2012. Life cycle assessment of food-preservation technologies. *Journal of Cleaner Production* Volume 28, 198–207. doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.10.016

Pui C.F., Wong W.C., Chai L.C., Tunung R., Jeyaletchumi P., Noor Hidayah M.S., Ubong A., Farinazleen M.G., Cheah Y.K. and Son R., 2011. *Salmonella*: A foodborne pathogen (Review). *International Food research journal*, 118, 465–473

Radford, S. A., Board, R. G., 1993. Fate of pathogens in home-made mayonnaise and related products. *Food Microbiology* 10, 269–278

Sander J, 1993. Pathogenesis of salmonella infections in humans. *Deutsche Tierarztle Wochenschrift*, 100, 283–285

Sato M., Machida K., Arikado E., Saito H., Kakegawa T. and Kobayashi H., 2000. Expression of outer membrane proteins in *Escherichia coli* growing at acid pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 943–947

Semelis J., Ikeda J.S. and Sofos J.N., 2003. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 563–575

Sharma M., Adler B.B., Harrison M.D. and Beuchat L.R., 2005. Thermal tolerance of acid-adapted and unadapted *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria*

monocytogenes in cantaloupe juice and watermelon juice. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 448–453

Skandamis P.N., Stopforth J.D., Yoon Y., Kendall P.A. and Sofos J.N., 2009. Heat and Acid Tolerance Responses of *Listeria monocytogenes* as Affected by Sequential Exposure to Hurdles during Growth. *Journal of Food Protection*, 72, 1412–1418

Smittle R.B., 1977. Microbiology of Mayonnaise and Salad Dressing: A Review. *Journal of Food Protection*, 40, 415–422. [doi:10.4315/0362-028X-40.6.415](https://doi.org/10.4315/0362-028X-40.6.415)

Smittle R.B., 2000. Microbiological Safety of Mayonnaise, Salad Dressings, and Sauces Produced in the United States: A Review. *Journal of Food Protection*: August 2000, Vol. 63, No. 8, pp. 1144–1153

Stratford M., Eklund T. (2003) Organic acids and esters. In: Russell N.J., Gould G.W. (eds). *Food Preservatives*. Springer, Boston, MA

Stratford M. & Rose, A. H., 1986. Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 132, 1–6

Święciło A., Zych-Wężyk I., 2013. Bacterial stress response as an adaptation to life in a soil environment. *Polish Journal of Environmental Studies* Vol. 22, 1577–1587

Tanka K., Takayanagi Y., Fugita J., Ishihama A., and Takahashi H., 1993. Heterogeneity of the principal σ factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, σ^{32} , is a second principal σ factor of RNA polymerase in stationary-phase *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 3511–3515

Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O' Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P. and Cullen P.J., 2009. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 5987–6000 DOI: 10.1021/jf900668n

Thevelein J.M., 1994 Signal transduction in yeast. *Yeast*, 10, 1753–1790

Tuynenburg M.G., 1971. Microbial safety in emulsions. *Process Biochemistry*, 6, 25–8

Vermeulen A. (2008). Microbial stability and safety of acid sauces and mayonnaise-based salads assessed through probabilistic growth/no growth models. *Sciences. Faculty of Bioscience Engineering, University of Ghent*

Vought, K.J. and Tatini, S.R., 1998. *Salmonella enteritidis* contamination of ice cream associated with a 1994 multistate outbreak. *Journal of Food Protection* 61, 5–10

Waterman S.R. and Small P.L.C., 1998. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3882–3886

WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella (2007).
Antigenic formulae of the Salmonella serovars (9th edition) Patrick A.D. Grimont &
François-Xavier Weill. Institut Pasteur, Paris, France

Yamamoto K, 2017. Food processing by high hydrostatic pressure. Bioscience,
Biotechnology and Biochemistry, 81, 672–679

Yoo A.Y., Kim S.W., Yu J.E., Kim Y.H., Cha J., Oh J.I., Eo S.K., Lee J.H., Kang
H.Y., 2007. Requirement of Fur for the full induction of Dps expression in
Salmonella enterica serovar typhimurium. Journal of Microbiology and
Biotechnology, 17, 1452–1459

Zhao T. and Doyle M.P., 1994. Fate of Enterohemorrhagic Escherichia coli 0157: H7
in Commercial Mayonnaise. Journal of Food Protection, 57, 780–783

Zhu J.L., Li J.R., Chen J.R., 2012. Survival of *Salmonella* in home-style mayonnaise
and acid solutions as affected by acidulant type and preservatives. Journal of Food
Protection. 75, 465–71

<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00024937.htm>