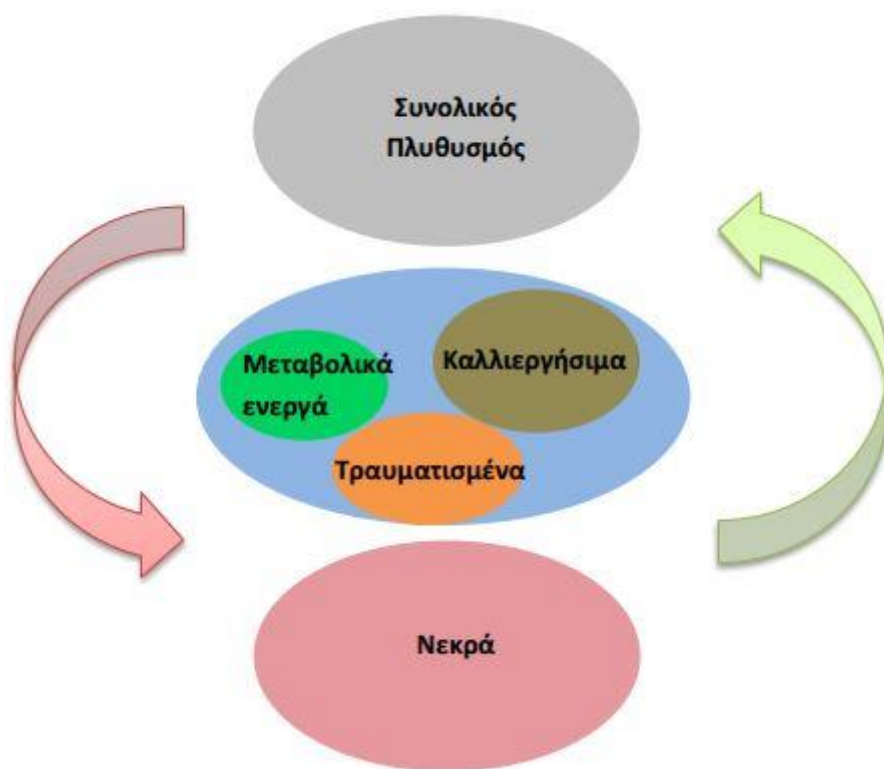


Μελέτη διαφορετικών συνθηκών καταπόνησης στη φυσιολογία μεμονωμένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* με τη χρήση φθορισμομετρικών τεχνικών και μικροσκοπίας.



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επιβλέπων Καθηγητής:

Παναγιώτης Σκανδάμης, Αναπληρωτής Καθηγητής

MARIANNA K. ARBANITHI

Βιολόγος

Αθήνα, 2020



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο

Σχολή Επιστημών Τροφίμων και Διατροφής

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μαριάννα Κ. Αρβανίτη

«Μελέτη διαφορετικών συνθηκών καταπόνησης στη φυσιολογία μεμονωμένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* με τη χρήση φθορισμομετρικών τεχνικών και μικροσκοπίας».

“Study of different stress conditions in the physiology of individual *Listeria monocytogenes* cells using fluorescence techniques and microscopy”.

Επιβλέπων Καθηγητής:

Παναγιώτης Σκανδάμης (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Αν. Καθ. Παναγιώτης Σκανδάμης, Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής

Καθ. Ελευθέριος Δροσινός, Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής

Καθ. Γεώργιος Ιωάννης Νυχάς, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Στη Ράνια

‘Φύσις κρύπτεσθαι φιλεί’

Ηράκλειτος ο Εφέσιος, Έλληνας Προσωκρατικός Φιλόσοφος, 544 π.Χ.-484 π. Χ.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο **Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής**, του **Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών**, στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου εκπαίδευσης, υπό την επίβλεψη του **Αναπληρωτή Καθηγητή Παναγιώτη Ν. Σκανδάμη**.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας **Παναγιώτη Ν. Σκανδάμη** για την καθοδήγηση, για την εμπιστοσύνη και για τον χρόνο που αφιέρωσε προκειμένου να με εκπαιδεύσει. Κύριε Σκανδάμη υπήρξε τιμή μου να συνεργαστώ μαζί σας, να μάθω από εσάς και σας ευχαριστώ που σταθήκατε δίπλα μου με αμείωτη διάθεση, χαρά και ενθουσιασμό.

Επιπλέον, οφείλω ευχαριστίες στον **Καθηγητή Γεώργιο Ιωάννη Νυχά** καθώς και στον **Καθηγητή Ελευθέριο Δροσινό** για την επιλογή μου στο Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης με τίτλο «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου», ειδίκευση «Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων», δίνοντάς μου την ευκαιρία να εμβαθύνω τις γνώσεις μου στον τομέα αυτό.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επιστημονικής ομάδας του κ. Σκανδάμη για το ευχάριστο κλίμα, την άψογη συνεργασία και την αμέριστη βοήθεια. Πιο συγκεκριμένα, τις Μεταδιδάκτορες Ερευνήτριες **Αία Ζιελίδου**, **Σοφία Ποιμενίδου**, **Αναστασία Καπετανάκου** και **Άρτεμις Γιαννακοπούλου** για τις συμβουλές και την καθοδήγηση αλλά και τις Υποψήφιες Διδάκτορες **Δανάη Σιδεράκου** και **Μαρία Γκερέκου** για την υποστήριξη. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την **κ.Γιαλιτάκη** για τον χρόνο που αφιέρωσε να μου εξηγήσει τους κανόνες λειτουργίας κι ασφαλείας του εργαστηρίου. Ιδιαίτερος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδάκτορα ερευνητή **Παναγιώτη Τσακανίκα** για την ανάλυση των εικόνων του Μικροσκοπίου, καθώς η συμβολή του ήταν κρίσιμη στην επίτευξη κι ολοκλήρωση της συγκεκριμένης πειραματικής μελέτης.

Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, **Κώστα** και **Μαρία**, τον αδερφό μου **Σπύρο**, την θεία μου, **Μαρία** και τους εγκάρδιους φίλους μου **Τιμοκράτη** και **Άννα** για την υποστήριξη, την πίστη και την αγάπη τους.

Περιεχόμενα

Περύληψη	8
Abstract	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
<i>Listeria monocytogenes</i>	12
Χαρακτηριστικά του Μικροοργανισμού	13
Μορφολογικά χαρακτηριστικά	13
Μεταβολικά χαρακτηριστικά.....	13
Θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης.....	14
Ορολογική τυποποίηση.....	15
Λιστερίωση	17
Λοιμογόνος παράγοντας	17
Κλινικά Χαρακτηριστικά της νόσου.....	18
Επιδημιολογικά Χαρακτηριστικά - Διάγνωση.....	19
Θεραπεία	20
Νομοθετική Ισχύς	20
Απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης.....	22
Στοχαστική Συνύπαρξη Ζώντων αλλά Μη καλλιεργήσιμων (VBNC state-Viable But Non Culturable) και Ανθεκτικών κυττάρων (Persisters)	24
Ζώντα αλλά Μη καλλιεργήσιμα (VBNC state-Viable But Non Culturable).....	26
<i>Listeria monocytogenes</i> απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης	29
Όξινη καταπόνηση	29
Απολυμαντικά στη βιομηχανία τροφίμων	30
Υπεροξικό οξύ/ Peroxyacetic-Acid (PAA).....	30
Προσαρμογή σε απολυμαντικά.....	31
Υπόθεση εργασίας	33
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
Υλικά και Εξοπλισμός	35
Α΄ ΜΕΡΟΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟ	35
Στελέχη του μικροοργανισμού <i>L. monocytogenes</i>	35
Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων <i>L. monocytogenes</i>	35
Προετοιμασία εμβολίου	36
Θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης.....	37
Μη επιλεκτικά μέσα ανάπτυξης.....	37
Επιλεκτικά μέσα ανάπτυξης	37
Χειρισμός και συντήρηση θρεπτικών μέσων ανάπτυξης.....	39

Διαλύματα	39
Παράγοντες καταπόνησης	39
Όξινη καταπόνηση	39
Οξικό οξύ (Acetic Acid-AA)	39
Υδροχλωρικό οξύ (HCl)	39
Απολυμαντικό Peroxy-Acetic Acid (PAA)	40
Στατιστική Ανάλυση	40
Ανάλυση αποτελεσμάτων	40
Β' ΜΕΡΟΣ ΕΠΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΖΩΝΤΑ ΑΛΛΑ ΜΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΣΙΜΑ (VBNC state-Viable But Non Culturable) ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΠΟΛΥΜΑΝΤΙΚΟΥ Peroxy-Acetic Acid.....	42
Προετοιμασία εμβολίου	42
Καθαρισμός εμβολίου.....	42
Ανίχνευση της κατάστασης ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα με συνδυασμό κλασσικής μικροβιολογίας και μικροσκοπίας φθορισμού.....	42
Έλεγχος καλλιεργησιμότητας με τη μέθοδο της επίστρωσης.....	42
Διαλύματα Φθοροφόρων	43
Ανίχνευση μεταβολικής ενεργότητας με τη χρήση Μικροσκοπίας Φθορισμού.....	43
Παρακολούθηση της ικανότητας ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων με βιντεομικροσκοπία.....	46
Image Analysis.....	47
Στατιστική Ανάλυση.....	47
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	51
Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση υδροχλωρικού οξέος (pH 2.5) σε θερμοκρασία 20°C	51
Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση οξικού οξέος (pH 3) σε θερμοκρασία 20°C	52
Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση οξικού οξέος (pH 3) σε θερμοκρασία 4°C	54
Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση με απολυμαντικό Peroxy-Acid (PAA) συγκέντρωσης 10, 20 και 30 ppm σε θερμοκρασία 20°C	55
Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση με απολυμαντικό Peroxy-Acid (PAA) συγκέντρωσης 10, 20 και 30 ppm σε θερμοκρασία 4°C	59
Εκτίμηση της ικανότητας επαγωγής της κατάστασης Ζώντα αλλά μη Καλλιεργήσιμα (Viable But Non Culturable, VBNC state) με την χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων (20ppm, 30ppm, 40ppm) του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA) σε θερμοκρασία καταπόνησης 20°C	63
Αξιολόγηση της ικανότητας ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων σε άγαρ ύστερα από έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (20ppm, 30ppm, 40ppm) του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA) στους 37°C	72

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	82

Περίληψη

Ο τροφιμογενής παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* συναντάται συχνά στη φύση και στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων και αποτελεί τον αιτιώδη παράγοντα της γνωστής νόσου, Λιστερίωσης, που χαρακτηρίζεται από ποσοστό θνησιμότητας 20-30%. Η έκθεση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε υποθανάτιες συνθήκες καταπόνησης ενδέχεται να επάγει την κατάσταση Ζώντα αλλά Μη Καλλιεργήσιμα (VBNC), η οποία εκφράζεται στοχαστικά σε επίπεδο ενός κυττάρου, με μεταβαλλόμενη ικανότητα επακόλουθης ανάκαμψης.

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι να διερευνήσει, σε επίπεδο πληθυσμού αλλά και ενός κυττάρου, την κινητική της κατάστασης Ζώντα αλλά Μη Καλλιεργήσιμα στον μικροοργανισμό *L.monocytogenes*, να περιγράψει την κατανομή των καλλιεργήσιμων, VBNC και νεκρών κυττάρων κατά την έκθεση σε συνθήκες καταπόνησης και να παρακολουθήσει σε πραγματικό χρόνο την ικανότητα ανάκαμψης με την χρήση βιντεομικροσκοπίας. Πιο συγκεκριμένα, δύο βακτηριακά στελέχη, το ScottA (ορότυπος 4b) και το EGD-e (ορότυπος 1/2a) υποβλήθηκαν σε όξινη καταπόνηση, σε καταπόνηση από το ευρέως χρησιμοποιούμενο απολυμαντικό, Peracetic Acid (PAA) και σε καταπόνηση λιμού σε συνδυασμό με προσθήκη αλατιού. Οι παράγοντες καταπόνησης διαλύθηκαν σε διάλυμα Ringer, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μέσης στατικής φάσης με τελικό πληθυσμό 10^9 CFU/ml, και οι θερμοκρασίες που μελετήθηκαν είναι 4 °C ή 20°C.

Peroxy-acetic acid (PAA) (10, 20, 30 και 40 ppm στους 20°C, για 3ώρες) χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της κατάστασης Ζώντα αλλά Μη Καλλιεργήσιμα στον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, στέλεχος Scott-A. Προκειμένου να διαφοροποιηθεί ο ανθεκτικός υποπληθυσμός από τον συνολικό, θρεπτικό μέσο Tryptic Soy Agar με 0.6% Yeast Extract (TSAYE) συμπληρωμένο ή όχι με 5% w/v NaCl χρησιμοποιήθηκε συγκριτικά. Τα κύτταρα VBNC προσδιορίστηκαν συγκρίνοντας αποτελέσματα από την μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης και της Μικροσκοπίας Φθορισμού, χρησιμοποιώντας συνδυασμό των φθοροφόρων cFDA και Ιωδιούχο Προπίδιο. Σε κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας αποτυπώθηκε και μία

φωτογραφία από το Μικροσκόπιο Φθορισμού. Η ικανότητα της ανάκαμψης παρακολούθηθηκε επάνω σε TSAYE στους 37 °C.

Όσον αφορά το απολυμαντικό PAA, ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* παρέμεινε καλλιεργήσιμος μετά από την έκθεση σε 20 και 30 ppm PAA για 3 ώρες. Στα 40ppm, ο συνολικός πληθυσμός έχασε την καλλιεργησιμότητά του ήδη από την πρώτη ώρα έκθεσης. Παρόλα αυτά, τα κύτταρα παρέμειναν CFDA-θετικά, εκπέμποντας πράσινο φθορισμό, υποδεικνύοντας την επαγωγή της κατάστασης VBNC. Ύστερα από έκθεση στα 40ppm δεν παρατηρήθηκε ικανότητα ανάκαμψης των κυττάρων. Ύστερα από έκθεση σε 20 και 30 ppm PAA ο χρόνος γενεάς είχε επιμηκυνθεί (150 ± 30 λεπτά) συγκριτικά με μη επεξεργασμένα κύτταρα (40 ± 15 λεπτά). Εικόνες μικροσκοπίας μετά από 18 ώρες έδειξαν διακύμανση του δυναμικού ανάκαμψης, αποτυπώνοντας μεμονωμένα κύτταρα, που δεν είχαν διαιρεθεί, ανάμεσα σε μικρο-αποικίες με μεταβλητούς αριθμούς κυττάρων.

Η παρούσα μελέτη θα μπορούσε να συμβάλει στην εκτίμηση της κινητικής της κατάστασης VBNC αποκαλύπτοντας τους κινδύνους κατανάλωσης τροφής που εμπεριέχουν κύτταρα σε κατάσταση ληθάργου.

Λέξεις-Κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, Ζώντα αλλά Μη Καλλιεργήσιμα (VBNC), Μικροσκοπία Φθορισμού, Ανάκαμψη

Abstract

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen often found in nature and in food processing environment and the causal agent of the well-known infection, Listeriosis, with a mortality rate of 20-30%. Exposure of *Listeria monocytogenes* to sub-lethal food related stresses may induce a Viable-But-Non-Culturable (VBNC) state that is stochastically expressed at single-cell level, with varying capacity in subsequent recovery.

The aim of this study is to investigate, at population and single cell level, the kinetics of VBNC state to *L. monocytogenes*, to describe the distribution of culturable, VBNC and dead cells during exposure to stress and to monitor real-time resuscitation with direct cell imaging. More specifically, two bacterial strains, ScottA (serotype 4b) and EGD-e (serotype 1/2a) were subjected to acidity stress, to the commonly used disinfectant agent Peroxy-acetic acid (PAA) and to starvation conditions with the addition of salt in the medium. The stress agents were dissolved in Ringer's solution and after the initial exposure of 10^9 CFU inoculum of bacteria in mid stationary growth phase, the cells were incubated in two temperatures, 4°C or 20°C.

Peroxy-acetic acid (PAA) (10, 20, 30 and 40 ppm at 20°C for 3 h) was used to induce the VBNC state of *L. monocytogenes* Scott-A. To differentiate the resistant sub-population from the total, Tryptic Soy Agar with 0.6% Yeast Extract (TSAYE) supplemented or not with 5% w/v NaCl was comparatively used. VBNC cells were determined by comparing plate counts with fluorescent microscopy, using combinations of CFDA and Propidium-Iodide. Each time point corresponded to a fluorescent microscope snapshot. Resuscitation on TSAYE was monitored with time-lapse microscopy at 37°C.

Regarding the disinfectant agent PAA, *L. monocytogenes* remained culturable after exposure to 20 and 30 ppm PAA for 3 h. At 40 ppm, the whole population became non-culturable from the first hour. However, cells appeared as CFDA-positive (emitting green fluorescence), indicating viability and thus, induction of VBNC state. No resuscitation was evident after treatment with 40 ppm. 20 and 30 ppm PAA resulted in longer individual generation times (150 ± 30 minutes) compared to untreated cells (40 ± 15 min). Microscopy images after 18 h showed variation in

resuscitation potential from non-dividing single cells to micro-colonies with variable cell numbers.

The present study could contribute to the assessment of VBNC kinetics shedding light into risks of consuming food with dormant cells.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, VBNC state, Fluorescent Microscopy, Resuscitation

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Listeria monocytogenes

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* έχει ταυτοποιηθεί ως η κύρια αιτία πολλών περιπτώσεων τροφιμογενών λοιμώξεων, σε παγκόσμια κλίμακα, με αποτέλεσμα σήμερα να αποτελεί έναν από τους πλέον σημαντικούς και εκτενώς μελετημένους παθογόνους μικροοργανισμούς, που σχετίζονται με τη Μικροβιολογία Τροφίμων και ενδιαφέρουν άμεσα το χώρο της Βιομηχανίας (Farber and Peterkin, 1991). Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους (Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, 1926). Πιο συγκεκριμένα, το 1924, οι Murray, Webb και Swann, παρατήρησαν 6 περιπτώσεις αιφνίδιου θανάτου νεαρών κουνελιών, στις εγκαταστάσεις εκτροφής ζώων του Τμήματος Παθολογίας του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, κρούσματα που αυξήθηκαν σημαντικά τους επόμενους 15 μήνες. Τα συμπτώματα που παρουσίαζε η νόσος σε συνδυασμό με την αυξημένη θνησιμότητα αποτέλεσαν κρίσιμους παράγοντες για περαιτέρω μελέτη της. Χαρακτηριστικό της νόσου των τρωκτικών ήταν η παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού μονοπύρηνων λευκοκυττάρων στο αίμα. Εξαιτίας αυτού του χαρακτηριστικού ο παθογόνος μικροοργανισμός αρχικά ονομάστηκε *Bacterium monocytogenes* (Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, 1926). Το 1927, ο Pirie, απομόνωσε ένα Gram θετικό βακτήριο το οποίο ονόμασε *Listerella hepatolytica* 1, προς τιμήν του Άγγλου χειρουργού λόρδου Joseph Lister (1827-1912) (Pirie, 1927). Παρατήρηση των δυο μικροοργανισμών, *Bacterium monocytogenes* και *Listerella hepatolytica* 1, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα στελέχη ανήκαν στο ίδιο είδος βακτηρίου. Το 1940 η ονομασία του γένους *Listerella* άλλαξε για λόγους ταξινόμησης και ο μικροοργανισμός έλαβε το όνομα *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940).

Η ραγδαία αύξηση των κρουσμάτων της νόσου στον άνθρωπο, οφείλεται στη πρόοδο που σημείωσε η πρωτογενής παραγωγή τροφίμων, με την ανάπτυξη και εφαρμογή ηπιότερων μεθόδων επεξεργασίας, την εισαγωγή νέων τεχνολογιών και τη μακροχρόνια συντήρηση υπό θερμοκρασίες ψύξης αλλά και στην αλλαγή του τρόπου ζωής, η οποία συνοδεύτηκε από νέες διατροφικές συνήθειες και μία αυξανόμενη απαίτηση των καταναλωτών για προϊόντα που διατίθενται στο εμπόριο έτοιμα προς

κατανάλωση, έχουν παρασκευαστεί με ελάχιστη ή καθόλου επεξεργασία και παράλληλα διατηρούν τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες και τα φυσικά χαρακτηριστικά τους (Lianou And and Sofos, 2007).

Χαρακτηριστικά του Μικροοργανισμού

Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι θετικός κατά Gram και προαιρετικά αναερόβιος. Αν και θετικά κατά Gram ορισμένα βακτήρια του γένους, χάνουν την ικανότητα να διατηρούν τη χρώση Gram και περιστασιακά μπορεί να θεωρηθούν, λανθασμένα, ως *Hemophilus* (Rocourt, J., Buchrieser, 2007) (Wagner, M., McLauchlin, 2008). Ο μικροοργανισμός έχει σχήμα κόκκου ή βακίλλου διαστάσεων 0,4-0.5μm x 0,5-2,0μm. Τα κύτταρα εμφανίζονται συνήθως είτε σε μεμονωμένες μονάδες, είτε σε μικρές αλυσίδες, είτε διατάσσονται σε V, Y και πιο πολύπλοκους σχηματισμούς (palisades). Το γένος *Listeria* δεν παράγει σπόρια και δε δημιουργεί κάψες (Seeliger, H.P.R., 1968). Εμφανίζει κινητικότητα χάρη στα περίτριχα μαστίγια σε συνθήκες καλλιέργειας μεταξύ των 20°C και 25°C, ενώ στους 37°C παρουσιάζει μειωμένη ή και καθόλου κινητικότητα (Galsworthy, S.B., Girdler, S., 1990).

Μεταβολικά χαρακτηριστικά

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι θετικός στην αντίδραση της καταλάσης και αρνητικός στην αντίδραση της οξειδάσης (Rocourt, J., Buchrieser, 2007). Είναι ένας ομοζυμωτικός μικροοργανισμός που οξειδώνει τα ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης (Cotoni, 1942). Το βακτήριο είναι προαιρετικά αναερόβιο, έτσι υπό αναερόβιες συνθήκες επώασης, ως μεταβολικά υποστρώματα χρησιμοποιεί μόνο πεντόζες και εξόζες, ενώ υπό αερόβιες συνθήκες, χρησιμοποιεί, τη μαλτόζη και τη λακτόζη, αλλά, όχι τη σακχαρόζη. Αναπτύσσεται παρουσία γλυκόζης και υπό αερόβιες συνθήκες σχηματίζει γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ και ακετοΐνη ως κύρια τελικά προϊόντα (Pine *et al.*, 1989) προσδιόρισαν ποσοτικά τα τελικά προϊόντα του

μεταβολισμού της γλυκόζης από τον *Listeria monocytogenes*, κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Και τα δέκα στελέχη που μελετήθηκαν παρήγαγαν ακετοΐνη κάτω από αερόβιες, αλλά όχι κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Παρουσία οξυγόνου τα τελικά μεταβολικά προϊόντα ήταν γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ και ακετοΐνη, ενώ απουσία οξυγόνου γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, φορμικό οξύ, αιθανόλη και διοξειδίο του άνθρακα (Romick, Fleming and Mcfeeters, 1996).

Θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, όπως και όλα τα είδη του γένους *Listeria*, προϋποθέτει για την ανάπτυξή του πηγές άνθρακα και αζώτου (γλυκόζη και γλουταμίνη). Η βέλτιστη ανάπτυξη του βακτηρίου επιτυγχάνεται με την προσθήκη συγκεκριμένων αμινοξέων (κυστίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, αργινίνη, μεθειονίνη, βαλίνη, κυστεΐνη) και βιταμινών (ριβοφλαβίνη, βιοτίνη, θειαμίνη και θειοκτικό οξύ αλιποϊκό οξύ) (Welshimer, 2020) (Siddiqi R, 1989) (Premaratne, R.J., Lin, W.J., Johnson, 1991). Επιπρόσθετα, η αύξηση διεγείρεται από την ύπαρξη τρισθενούς σιδήρου και φαινυλαλανίνης στο θρεπτικό υπόστρωμα (Siddiqi R, 1989).

Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού υποστηρίζεται από έναν ευρύ αριθμό μη επιλεκτικών θρεπτικών μέσων. Μπορεί να αναπτυχθεί τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες σε μη επιλεκτικά τεχνητά μέσα όπως το θρεπτικό υλικό Tryptone Soy Broth (TSB) και Brain Heart Infusion (BHI), ενώ σε περίπτωση ανάπτυξής του σε BHI και επώασης στους 30°C, εισέρχεται στη στατική φάση έπειτα από 12 h (Wagner, M., McLaughlin, 2008). Για την απομόνωση των ειδών του γένους *Listeria spp* συνίσταται η χρήση επιλεκτικών στερεών και υγρών θρεπτικών μέσων. Τα επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα “agar Polymyxin Acriflavine Lithium Chloride Ceftazidone Aesculin Mannitol” (PALCAM) και OXFORD προτάθηκαν από τα ISO 11290-1:1996 και ISO 11290-2:1998 ως πρωταρχικά μέσα πίστρωσης για την ανίχνευση και αρίθμηση όλων των ειδών του γένους *Listeria spp*. Τα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα διαφοροποιούν τα είδη του γένους *Listeria* από τα υπόλοιπα βακτήρια στηριζόμενα στην υδρόλυση του γλυκοζίτη εσκουλίνη.

Επιπλέον, υπάρχουν επιλεκτικά θρεπτικά μέσα για την ανίχνευση του είδους *L.monocytogenes* με βάση χρωμογόνα υποστρώματα, όπως το *Listeria* άγαρ που περιγράφηκε από τους Ottaviani και Agosti (ALOA) (Ottaviani, F., Ottaviani, M., Agosti, 1997). Η γενική δυνατότητα διαφοροποίησης με τη χρήση του ALOA έγκειται στην παρουσία του χρωμογόνου συστατικού 5-βρωμο-4-γλωρο-3-ινδολλυλ-β-D-γλυκοκυρανοσίδιο που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό του ενζύμου β-D-γλυκοσιδάση, το οποίο παράγεται από όλα τα είδη του γένους *Listeria spp.* Αποτέλεσμα της αντίδρασης μεταξύ του ενζύμου και του χρωμογόνου συστατικού είναι η ανάπτυξη αποικιών χρώματος μπλε-τιρκουάζ στην επιφάνεια του άγαρ. Η ειδική δραστηριότητα διαφοροποίησης πραγματοποιείται χάρη στην παρουσία της L-α-φωσφατιδυλινοσιτόλης, η οποία υδρολύεται από την φωσφολιπάση C, έναν παράγοντα μολυσματικότητας που παράγεται από τα δύο παθογόνα είδη *L.monocytogenes* και *L.ivanovii*. Ο συνδυασμός των δύο αυτών συστατικών, επιτρέπει την διαφοροποίηση των αποικιών των βακτηρίων του γένους *Listeria spp.* που εμφανίζονται με μπλε-τιρκουάζ απόχρωση, από τις αποικίες των στελεχών της *L.monocytogenes* που εμφανίζονται με μπλε-τιρκουάζ απόχρωση περιβαλλόμενες από μία αδιαφανή άλω. Η χρήση επιλεκτικών χρωμογόνων θρεπτικών μέσων καλλιέργειας οδηγεί στην ανίχνευση υποθετικών στελεχών *L. monocytogenes* εντός 24 ή 48 h επώασης στους 37 °C. Ωστόσο, η επιβεβαίωση της ταυτότητας των απομονώσεων απαιτεί επιπλέον δοκιμές (Wagner, M., McLauchlin, 2008).

Ορολογική τυποποίηση

Ορισμένοι από τους πολλαπλούς δείκτες επιφάνειας που διαθέτουν τα είδη του γένους *Listeria* είναι τα σωματικά αντιγόνα O και τα αντιγόνα του μαστιγίου H, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στόχοι για την ορολογική τυποποίηση (Seeliger, H.P.R., Hohne, 1979). Τα σωματικά αντιγόνα O έχουν διαχωριστεί σε 15 υπο-τύπους (I-XV), ενώ τα αντιγόνα του μαστιγίου σε τέσσερις (A-D). Οι μοναδικοί συνδυασμοί των O και H αντιγόνων βοηθούν στην εξακρίβωση των μεμονωμένων στελεχών των βακτηρίων *Listeria spp.* Από το συνδυασμό αυτό έχουν διακριθεί τουλάχιστον δεκατρείς ορότυποι για το είδος *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e και 7) οι οποίοι εντάσσονται σε 4 εξελικτικές καταγωγές (lineages) (Ward *et al.*, 2008).

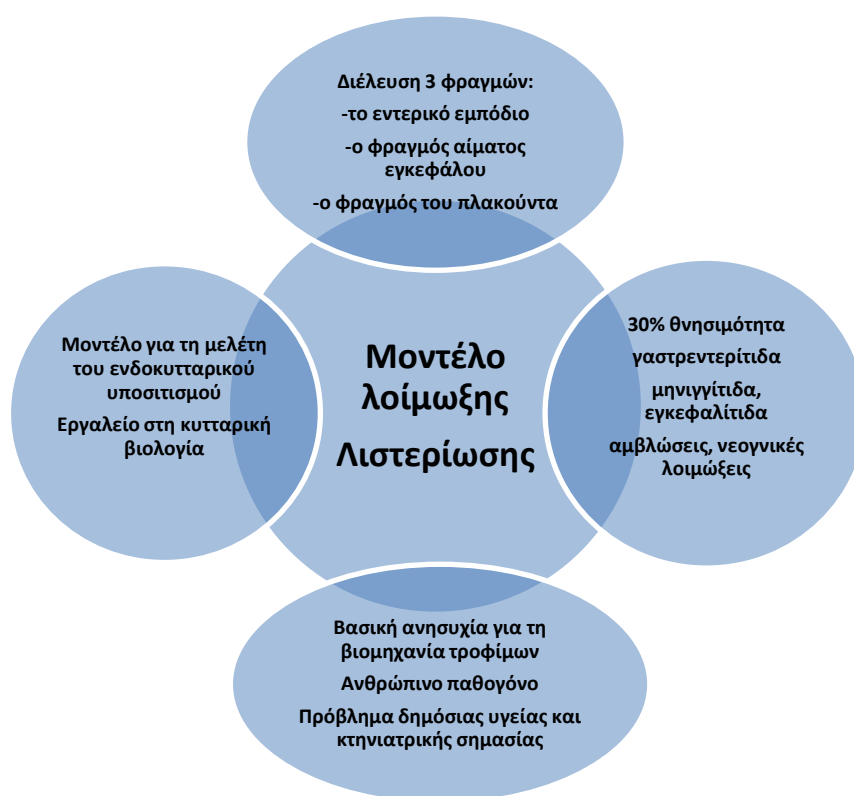
Πίνακας 1 Αποτύπωση των τριών εξελικτικών καταγωγών (lineages) και οροτύπων (serovars) του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* βάσει του συνδυασμού των σωματικών αντιγόνων (O antigen) και των αντιγόνων μαστιγίου (H antigens) (Gorski, 2008; Hyden και συν., 2016).

Εξελικτική καταγωγή	Ορότυπος	O-αντιγόνα	H-αντιγόνα
I	1/2b	I, II	A,B,C
	3b	II, IV	A,B,C
	4b	V, VI	A,B,C
	4d	(V) ^a , VI, VIII	A,B,C
	4e	V,VI,(VIII), (IX)	A,B,C
	7	XII, XIII	A,B,C
	1/2a	I,II	A,B
II	1/2c	I,II	B,D
	3a	II,IV	A,B
	3c	II,IV	B,D
	4a	(V),VII,IX	A,B,C
III	4b	V, VI	A,B,C
	4c	V,VII	A,B,C
	1/2a	I,II	A,B
IV	4a	(V), VII,IX	A,B,C
	4c	V,VII	A,B,C

Από τα έως τώρα αναγνωρισμένα είδη του γένους *Listeria spp.* μόνο τα *Listeria monocytogenes* και *Listeria ivanovii* έχουν χαρακτηριστεί ως παθογόνα (Wagner, M., McLauchlin, 2008). Σχεδόν όλες οι περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης έχουν αποδοθεί στον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, ωστόσο έχουν καταγραφεί και ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις οφειλόμενες στα είδη *L. ivanovii*

(Guillet *et al.*, 2010), *L. seeligeri* (Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, A., Malinverni, R., Bille, 1986) και *L. grayi* (Todeschini, G., Friso, S., Lombardi, S., Casaril, M., Fontana, R., Corrocher, 1998). Για την εκδήλωση ανθρώπινης λιστερίωσης έχουν ενοχοποιηθεί μόνο οι 4 ορότυποι (1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b) από τους 13 του είδους *L. monocytogenes*. Από τους συγκεκριμένους τέσσερις ορότυπους τα στελέχη που ανήκουν στα τρόφιμα και στο περιβάλλον ανήκουν στην εξελικτική καταγωγή II. Τα περισσότερα κρούσματα λιστερίωσης στον άνθρωπο σχετίζονται με στελέχη της εξελικτικής καταγωγής I (Orsi, Bakker and Wiedmann, 2011).

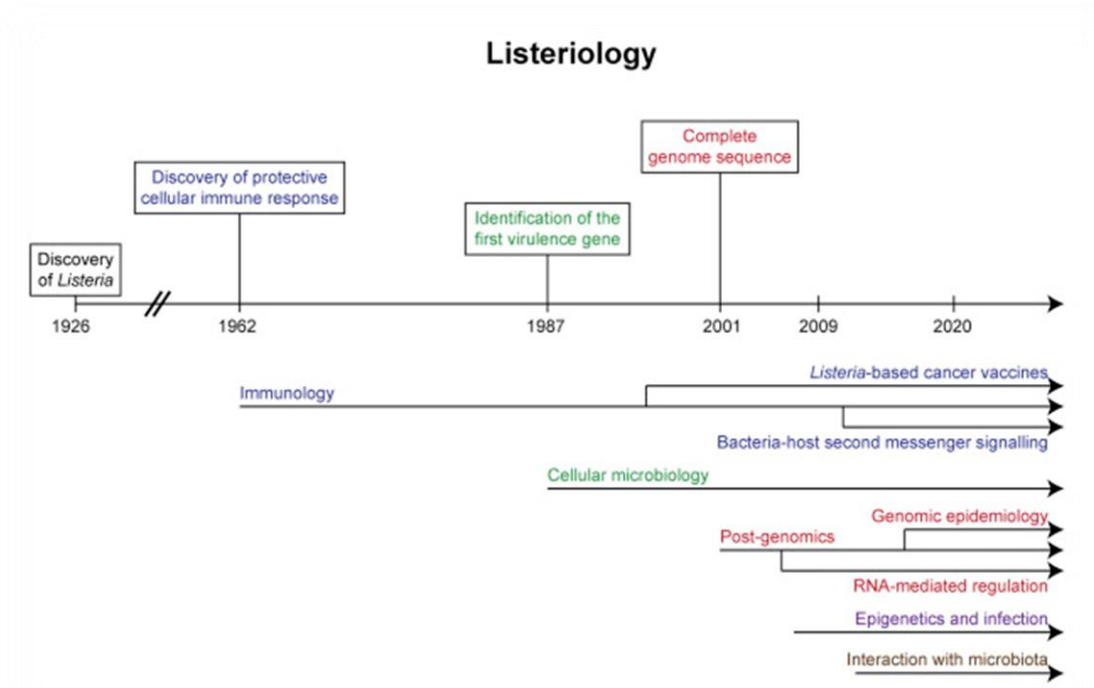
Λιστερίωση



Εικόνα 1 Μοντέλο λοίμωξης Λιστερίωσης

Λοιμογόνος παράγοντας

Πρόκειται για βακτηριακή λοίμωξη που προκαλείται από το θετικό κατά gram βακτήριο *Listeria monocytogenes*, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Listeriaceae*. Για την μόλυνση στον άνθρωπο ευθύνονται κυρίως οι ορότυποι 1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b (Heymann DL, 2008).



Εικόνα 2 Χρονοδιάγραμμα με τα σημαντικά γεγονότα κατά τη μελέτη της ασθένειας λιστερίωσης (Lebreton *et al.*, 2016).

Κλινικά Χαρακτηριστικά της νόσου

Η λιστερίωση προσβάλλει κυρίως ευαίσθητες πληθυσμιακές ομάδες όπως νεογέννητα βρέφη, ηλικιωμένους και ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά του νοσήματος είναι ο πυρετός, μυαλγίες και ενίοτε συμπτώματα από το γαστρεντερικό σύστημα, όπως ναυτία ή διάρροια. Σε περίπτωση που η λοίμωξη επεκταθεί στο νευρικό σύστημα εμφανίζονται συμπτώματα όπως κεφαλαλγία, δυσκαμψία του αυχένα, σύγχυση, έλλειψη ισορροπίας ή σπασμοί. Ένας ασθενής είναι πιθανό να εμφανίσει σηψαιμία ή μηνιγγίτιδα. Σε περίπτωση άμεσης επαφής με μολυσμένο υλικό μπορεί να εμφανιστούν βλατιδώδη εξανθήματα στα χέρια και τις παλάμες.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization) υπάρχουν δύο κύριοι τύποι λιστερίωσης: η μη επεμβατική μορφή και η επεμβατική μορφή. Η μη επεμβατική λιστερίωση (εμπύρετη γαστρεντερίτιδα) είναι μια ήπια μορφή της νόσου που προσβάλλει κυρίως τους υγιείς ανθρώπους. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν διάρροια, πυρετό, κεφαλαλγία και μυαλγία (μυϊκός πόνος). Η περίοδος επώασης είναι σύντομη (μερικές ημέρες). Τα κρούσματα αυτής της νόσου

έχουν γενικά αποδοθεί στην κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν υψηλές δόσεις *L.monocytogenes*. Η επεμβατική λιστερίωση είναι πιο σοβαρή μορφή της νόσου και επηρεάζει ορισμένες πληθυσμιακές ομάδες υψηλού κινδύνου. Αυτές περιλαμβάνουν έγκυες γυναίκες, ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία για καρκίνο, μεταμόσχευση οργάνων, ηλικιωμένους και βρέφη. Αυτή η μορφή ασθένειας χαρακτηρίζεται από σοβαρά συμπτώματα και υψηλό ποσοστό θνησιμότητας (20% -30%). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό, μυαλγία (μυϊκό πόνο), σηψαιμία, μηνιγγίτιδα. Η περίοδος επώασης είναι συνήθως μία έως δύο εβδομάδες, ωστόσο ενδέχεται να κυμανθεί μεταξύ μερικών ημερών έως 90 ημερών.

Οι έγκυες γυναίκες εμφανίζουν συνήθως μόνο ήπια συμπτώματα εμπύρετης γρίπης. Ανάλογα με το στάδιο της κύησης, η μόλυνση της μητέρας είναι δυνατό να οδηγήσει σε αποβολή, θνησιγένεια (γέννηση νεκρού νεογνού), πρόωρο τοκετό ή σε σοβαρή λοίμωξη του νεογνού (Samuel Baron., 1996) (*Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*).

Επιδημιολογικά Χαρακτηριστικά - Διάγνωση

Η λιστερίωση έχει χαμηλή συχνότητα εμφάνισης αλλά είναι δυνητικά θανατηφόρος ασθένεια. Η αρχική διάγνωση της λιστερίωσης γίνεται με βάση τα κλινικά συμπτώματα και την απομόνωση του παθογόνου στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), στο αίμα, στο αμνιακό υγρό, στο μηκόνιο, σε γαστρικό έκπλυμα και σε άλλα σημεία όπου μπορεί να αναπτυχθεί το παθογόνο. Η *L. monocytogenes* μπορεί να απομονωθεί εύκολα σε φυσιολογικά στείρα υλικά, αλλά θα πρέπει να δίνεται προσοχή στο διαχωρισμό του συγκεκριμένου παθογόνου από άλλα gram-θετικά βακτήρια, ιδιαίτερα τα διφθεροειδή. Ο μικροσκοπικός έλεγχος του ENY και του μηκωνίου θέτει την υποψία της λιστερίωσης, ενώ ο ορολογικός έλεγχος για την ταυτοποίηση του παθογόνου έχει χαμηλή αξιοπιστία (*Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*) (*Center for Food Safety and Public Health*)

Διάφορες μέθοδοι ανίχνευσης, συμπεριλαμβανομένης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), είναι διαθέσιμες για τη διάγνωση της λιστερίωσης σε ανθρώπους. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, οι καλλιέργειες αίματος και του πλακούντα είναι οι πιο αξιόπιστοι τρόποι να ανακαλυφθεί εάν τα συμπτώματα οφείλονται σε λιστερίωση.

Θεραπεία

Η θεραπευτική αντιμετώπιση της λιστερίωσης περιλαμβάνει τη χορήγηση αντιβιοτικών για διάστημα που εξαρτάται από την εντόπιση της νόσου. Φάρμακο εκλογής θεωρείται η αμπικιλίνη, ενώ συχνά στο θεραπευτικό σχήμα προστίθεται και η γενταμυκίνη. Όταν διαγνωστεί η λοίμωξη στη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η άμεση χορήγηση αντιβιοτικών στην έγκυο γυναίκα μπορεί να προλάβει τη λοίμωξη του εμβρύου ή του νεογνού. Τα νεογνά που νοσούν λαμβάνουν την ίδια αντιμικροβιακή αγωγή με τους ενήλικες.

Νομοθετική Ισχύς

Για την Ευρωπαϊκή Ένωση ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα ύστερα από την τελευταία τροποποίηση 28/2/2019 καθορίζει τα μικροβιολογικά κριτήρια για συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, όπως και για τη *Listeria monocytogenes*, και τους κανόνες εφαρμογής προς τους οποίους πρέπει να συμμορφώνονται οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων όταν εφαρμόζουν τα γενικά και ειδικά μέτρα υγιεινής που αναφέρονται στο άρθρο 4 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 852/2004. Πιο συγκεκριμένα, τα κριτήρια ασφαλείας σχετικά με τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2 Κριτήρια Ασφαλείας σχετικά με τον παθογόνο μικροοργανισμό *L.monocytogenes* (σύμφωνα με τον Κανονισμό 2073/2005).

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί/οι τοξίνες και οι μεταβολίτες τους	Πλάνο δειγματοληψίας		Όρια		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς)	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
		n	c	m	M		
1.1 Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Να μην ανιχνεύεται σε 25 g		EN/ISO 11290-1	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.2 Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g		EN/ISO 11290-2	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
		5	0	Να μην ανιχνεύεται σε 25 g		EN/ISO 11290-1	Πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης τροφίμων που το παράγαγε
1.3 Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g		EN/ISO 11290-2	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους

Για τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη *L. monocytogenes* πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπευθύνου της επιχείρησης τροφίμων που το παρήγαγε, εφόσον εκείνος δεν μπορεί να αποδείξει ότι το προϊόν δεν θα υπερβαίνει το όριο των 100 cfu/g καθ' όλη τη διάρκεια διατήρησής του, στα αποτελέσματα των δοκιμών πρέπει όλες οι τιμές που παρατηρούνται να υποδεικνύουν απουσία του βακτηρίου.

Απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης

Οι μικροοργανισμοί έρχονται αντιμέτωποι με πληθώρα υποθανάτιων καταπονήσεων στο περιβάλλον επεξεργασίας των τροφίμων ή και μέσα στο ίδιο το μικροπεριβάλλον του τροφίμου. Οι διαφορετικές καταπονήσεις ενεργοποιούν τους κατάλληλους μηχανισμούς έκφρασης γονιδίων με στόχο την αποκατάσταση της ομοιότητας (Aertsen and Michiels, 2002). Οι μεταγραφικές μεταβολές που συμβαίνουν ως αποτέλεσμα καταπόνησης αλλάζουν την φυσιολογία των κυττάρων. Το είδος και η ισχύ της καταπόνησης επηρεάζουν την ανθεκτικότητα ή την ευαισθησία του μικροοργανισμού σε επακόλουθες αντίστοιχες ή διαφορετικές καταπονήσεις. Η έκθεση σε υποθανάτιες καταπονήσεις μπορεί να προκαλέσει μία αντίδραση προσαρμογής, η οποία καθιστά τους παθογόνους μικροοργανισμούς περισσότερο ανθεκτικούς σε μετέπειτα έκθεσή τους σε θανατηφόρες συνθήκες, γεγονός που αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών (Yousef and Courtney, 2003).

Ο όρος της προσαρμογής (adaptation) αναφέρεται σε στην αντίδραση των μικροοργανισμών έπειτα από την έκθεση αυτών σε συνθήκες καταπόνησης. Η αντίδραση στην συγκεκριμένη περίπτωση έχει προστατευτικό ρόλο αυξάνοντας την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού σε παρόμοιες ή διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται ως αντίδραση προσαρμογής και επάγει την ανοχή, την εξοικείωση, τον εγκλιματισμό ή την σκληραγώγηση έναντι της καταπόνησης.

Ορισμένοι βασικοί ορισμοί που συνδέονται με την αντίδραση προσαρμογής παρατίθενται για λόγους διευκρίνησης παρακάτω:

Καταπόνηση (stress): αναφέρεται σε κάθε επιβλαβή παράγοντα ή κατάσταση που επηρεάζει αρνητικά μικροβιακή ανάπτυξη ή επιβίωση. Οι συνθήκες καταπόνησης που αντιμετωπίζουν οι μικροοργανισμοί ποικίλλουν ως προς την ένταση και το αποτέλεσμα και διακρίνονται σε ήπιες (mild), μέτριες (moderate) αλλά και ακραίες (extreme/severe). Ο όρος ήπια καταπόνηση περιγράφει υποθανάτια επίπεδα καταπόνησης που δεν οδηγούν σε απώλεια της βιωσιμότητας των κυττάρων αλλά σε μείωση ή συγκράτηση του ρυθμού ανάπτυξης. Με τον όρο μέτρια καταπόνηση περιγράφεται ένα επίπεδο καταπόνησης που όχι μόνο μειώνει τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων, παράλληλα προκαλεί απώλεια της βιωσιμότητας αυτών. Τέλος, ακραίο επίπεδο καταπόνησης χαρακτηρίζεται αυτό που έχει θανατηφόρο αποτέλεσμα και οδηγεί στο θάνατο της πλειοψηφίας του πληθυσμού.

Αντίδραση σε συνθήκες καταπόνησης (adaptive stress response): αναφέρεται στην διαφορετική απόκριση των μικροοργανισμών έπειτα από την αντίληψη της καταπόνησης. Τα βακτήρια σε κυτταρικό επίπεδο αντιλαμβάνονται καταπονήσεις οι οποίες μεταβάλουν την ρευστότητα της κυτταρικής τους μεμβράνης (ψυχρό σοκ), αλλοδομούν τις κυτταρικές πρωτεΐνες ή διασπών τα ριβοσώματα (θέρμανση). Σε μοριακό επίπεδο η αντίδραση στις συνθήκες καταπόνησης οδηγεί στην μεταγραφή και σύνθεση ρυθμιστικών πρωτεϊνών, που με την σειρά τους ενεργοποιούν την μεταγραφή πρωτεϊνών που σχετίζονται με την υφιστάμενη καταπόνηση. Η μικροβιακή απόκριση στην καταπόνηση οδηγεί σε:

- Παραγωγή πρωτεϊνών που αποκαθιστούν βλάβη, διατηρούν το κύτταρο ή εξαλείφουν τον παράγοντα καταπόνησης
- Μεταβατική αύξηση της αντοχής ή της ανοχής σε επιβλαβείς παράγοντες
- Μετασχηματισμό του κυττάρου σε αδρανή κατάσταση, δηλαδή σχηματισμό σπορίων ή διέλευση σε βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη φυσιολογική κατάσταση
- Παράκαμψη της άμυνας οργανισμού του ξενιστή
- Προσαρμοστικές μεταλλάξεις

Αντοχή (tolerance): κάθε μικροοργανισμός διαθέτει ενδογενή όρια ανοχής σε μία συγκεκριμένη συνθήκη καταπόνησης, αλλά ενδέχεται επιπλέον να προκληθεί μία προσαρμοστική ανοχή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα γαλακτικά βακτήρια είναι εγγενώς πιο ανεκτικά σε οξύ από πολλά άλλα βακτήρια, όμως μπορεί να γίνουν περισσότερο ανεκτικά ύστερα από μία αντίδραση προσαρμογής.

Τραυματισμός (injury): οποιαδήποτε φθορά των κυτταρικών συστατικών ως αποτέλεσμα καταπόνησης μπορεί είτε να μειώσει την ικανότητα διπλασιασμού των κυττάρων είτε να ευαισθητοποιήσει τα κύτταρα έναντι ηπιότερων επιβλαβών παραγόντων. Αυτές οι αλλαγές συνήθως περιγράφονται ως κυτταρικός τραυματισμός. Ο τραυματισμός είναι πιο αισθητός όταν τα κύτταρα που εκτίθενται στην καταπόνηση γίνονται ευαίσθητα σε εκλεκτικούς παράγοντες στους οποίους τα υγιή κύτταρα επιβιώνουν εύκολα. Τα τραυματισμένα κύτταρα ενδέχεται να ανακάμψουν ή να πεθάνουν.

Στοχαστική Συνύπαρξη Ζώντων αλλά Μη καλλιεργήσιμων (VBNC state-Viable But Non Culturable) και Ανθεκτικών κυττάρων (Persisters)

Δύο σαφώς καθορισμένες καταστάσεις ληθάργου έχουν περιγραφεί στα μη σπορογόνα βακτήρια: η κατάσταση VBNC (Viable But Non Culturable) και η ανθεκτικότητα έναντι των αντιβιοτικών (Persistence) (Li *et al.*, 2014) (Maisonneuve and Gerdes, 2014). Τα ανθεκτικά κύτταρα περιγράφονται ως βραδέως ή μη αναπτυσσόμενοι υποπληθυσμοί παρόντες σε μία αναπτυσσόμενη καλλιέργεια που είναι συνεπώς σε θέση να αντέξει πολλούς τύπους αντιβιοτικών (Lewis, 2010). Σε αντίθεση με την αντίσταση στα αντιβιοτικά (antibiotic resistance), τα ανθεκτικά κύτταρα πιστεύεται ότι είναι γενετικά ταυτόσημα με τα κύτταρα που δεν επιβιώνουν, αλλά παρουσιάζουν φαινότυπο ανθεκτικό σε φάρμακα. Ο φαινότυπος του υποπληθυσμού των ανθεκτικών κυττάρων έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει στοχαστικά μέσα στις αναπτυσσόμενες καλλιέργειες, αλλά μπορεί επίσης να είναι αποτέλεσμα κάποιας καταπόνησης, όπως ο λιμός, η οξειδωτική βλάβη, βλάβες στο DNA, η όξινη καταπόνηση (stressful pH) και αντιβιοτικά (Amato, Orman and Brynildsen, 2013)

(Vega *et al.*, 2012) (Wu *et al.*, 2012) (Bernier *et al.*, 2013) (Dörr, Vulić and Lewis, 2010). Επομένως, τα ανθεκτικά κύτταρα έχουν ιατρική σημασία λόγω της πιθανότητας να προκαλέσουν υποτροπιάζουσες βακτηριακές λοιμώξεις όπως αυτές που εκδηλώθηκαν από το *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*, παθογόνο *E. Coli* και *Staphylococcus aureus* (Fauvart, de Groote and Michiels, 2011).

Τουλάχιστον 85 είδη βακτηρίων έχουν βρεθεί να εισέρχονται σε μία κατάσταση ληθάργου, που αναφέρεται στο ως VBNC state (Li *et al.*, 2014). Αυτά τα κύτταρα αποδεικνύονται ότι είναι βιώσιμα λόγω των ακέραιων κυτταρικών μεμβρανών τους, της μεταβολικής δραστηριότητας χαμηλού επιπέδου και του συνεχιζόμενης γονιδιακής έκφρασης (6, 22). Ωστόσο, δεν διαιρούνται και, σε αντίθεση με τα ανθεκτικά κύτταρα, δεν μπορούν να αμέσως να ανακτήσουν την ικανότητα διαίρεσης όταν βρεθούν σε θρεπτικά υποστρώματα ρουτίνας (Li *et al.*, 2014). Η κατάσταση VBNC θεωρείται ότι είναι μια αποτελεσματική στρατηγική επιβίωσης για το βακτήριο, καθώς επιτρέπει στα κύτταρα να υποστούν δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και να ανακάμψουν σε μια αντιγραφική μορφή όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες βελτιωθούν. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι η κατάσταση VBNC επάγεται από μια ποικιλία σχετικών περιβαλλοντικών παραγόντων όπως ο λιμός, η υποξία, η θερμοκρασιακή καταπόνηση, η αλατότητα και το pH (23-26). Επιπλέον, ενώ βρίσκονται στην κατάσταση VBNC, τα κύτταρα έχει δειχθεί ότι ανέχονται τυπικά θανατηφόρους παράγοντες καταπόνησης, συμπεριλαμβανομένων αντιβιοτικών υψηλής δόσης (Nowakowska and Oliver, 2013). Είναι σημαντικό ότι τα κύτταρα VBNC είναι ικανά να ανακάμψουν *in vivo* και να επανακτήσουν τη μολυσματικότητα τους (Oliver and Bockian, 1995).

Υπάρχουν αναμφισβήτητα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι τα ανθεκτικά και τα VBNC κύτταρα σχετίζονται, ωστόσο, η σχέση αυτή σπάνια συζητείται στη βιβλιογραφία. Η σύνδεσή τους περιγράφηκε λεπτομερώς σε μια πρόσφατη ανασκόπηση, όπου προτάθηκε ότι τα κύτταρα VBNC και ανθεκτικά είναι μέρος μίας συνεχούς μεταβατικής κατάστασης ληθάργου (dormancy continuum), στην οποία μοιράζονται παρόμοιους μηχανισμούς αλλά βρίσκονται σε διαφορετικές φυσιολογικές θέσεις στο εύρος του λήθαργου (Ayrapetyan, Williams and Oliver, 2015). Το μοντέλο βασίζεται σε ένα μοριακό μηχανισμό του στοχαστικού σχηματισμού ανθεκτικών κυττάρων, ο οποίος βασίζεται στη δράση του συστήματος τοξίνης-αντιτοξίνης (TAS) (Maisonneuve and Gerdes, 2014). Τα TAS συστήματα υποδεικνύουν την επαγωγή της

μεταγραφής δύο γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνη τοξίνη και την συγγενή της αντιτοξίνη (Maisonneuve and Gerdes, 2014). Όταν οι κυτταρολυτικές συγκεντρώσεις των δύο συστατικών είναι αναλογικές, η σύζευξη με την αντιτοξίνη εξουδετερώνει την τοξίνη. Ορισμένες από αυτές τις τοξίνες συνεχίζουν να παρεμποδίζουν τη μετάφραση, και τελικά προκαλούν αναστολή ανάπτυξης (Maisonneuve and Gerdes, 2014).

Ζώντα αλλά Μη καλλιεργήσιμα (VBNC state-Viable But Non Culturable)

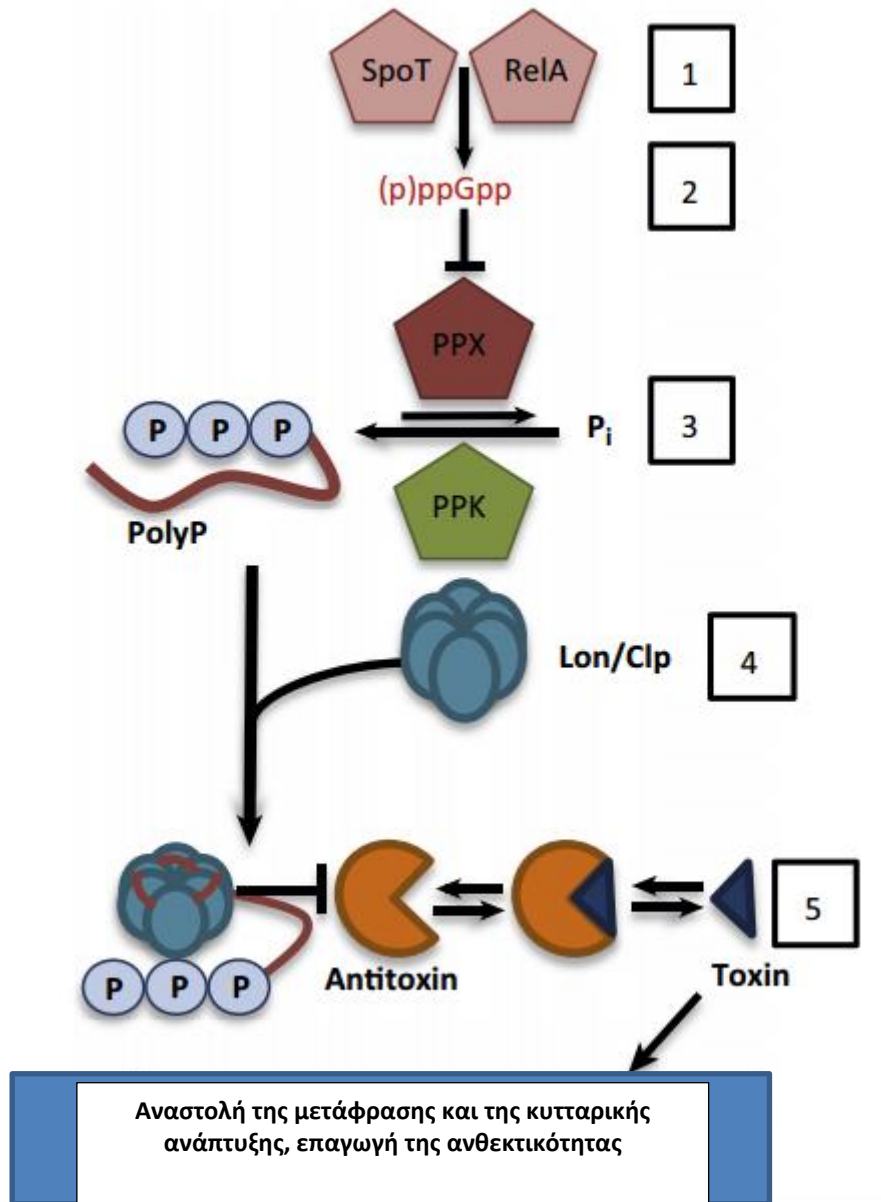
Πρόκειται για μία κατάσταση και στρατηγική επιβίωσης πολλών μικροοργανισμών στο περιβάλλον ως απάντηση σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε συνηθισμένα μικροβιολογικά μέσα (απώλεια καλλιεργησιμότητας), ωστόσο παραμένουν βιώσιμα και διατηρούν την μολυσματική τους ικανότητα. Έτσι τα κύτταρα αυτά είναι μεταβολικά ή φυσιολογικά ενεργά αλλά δεν μπορούν να καλλιεργηθούν σε συγκεκριμένα μέσα (VBNC state-Viable But Non Culturable) (Bogosian & Bourneuf, 2001). Επιπρόσθετα, έχουν την ικανότητα ανάκαμψης σε ευνοϊκές συνθήκες καλλιέργειας. Δεδομένου ότι διατηρούν την μολυσματικότητά τους και ταυτόχρονα είναι δύσκολο να ανιχνευτούν αποτελούν απειλή για την δημόσια υγεία και την ασφάλεια των τροφίμων.

Μία άλλη κατάσταση ληθάργου αποτελεί η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά που, όπως και η VBNC κατάσταση, οδηγεί στη δημιουργία ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηριακών πληθυσμών, ικανών να αντισταθούν σε εκτεταμένη έκθεση σε θανατηφόρες συνθήκες. Πρόκειται για δύο στενά συνδεδεμένα φαινόμενα που αποτελούν μέρος μιας κοινής συνεχούς περιόδου ληθάργου. Η κατάσταση VBNC χαρακτηρίζει έναν υποπληθυσμό γενετικά πανομοιότυπο με το συνολικό πληθυσμό, που εμφανίζει ένα φαινότυπο ανθεκτικότητας. Αναφέρεται δηλαδή σε κύτταρα που έχουν χάσει την ικανότητα να καλλιεργούνται σε θρεπτικά μέσα, ωστόσο παραμένουν ζωντανά. Η συγκεκριμένη κατάσταση επάγεται μέσω λιμού, θερμοκρασιών που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη, χαμηλού οξυγόνου, μη βέλτιστης αλατότητας και στρεσογόνου pH (Pinto *et al.*, 2011) (Wu *et al.*, 2012)(Dörr, Vulić and Lewis, 2010).

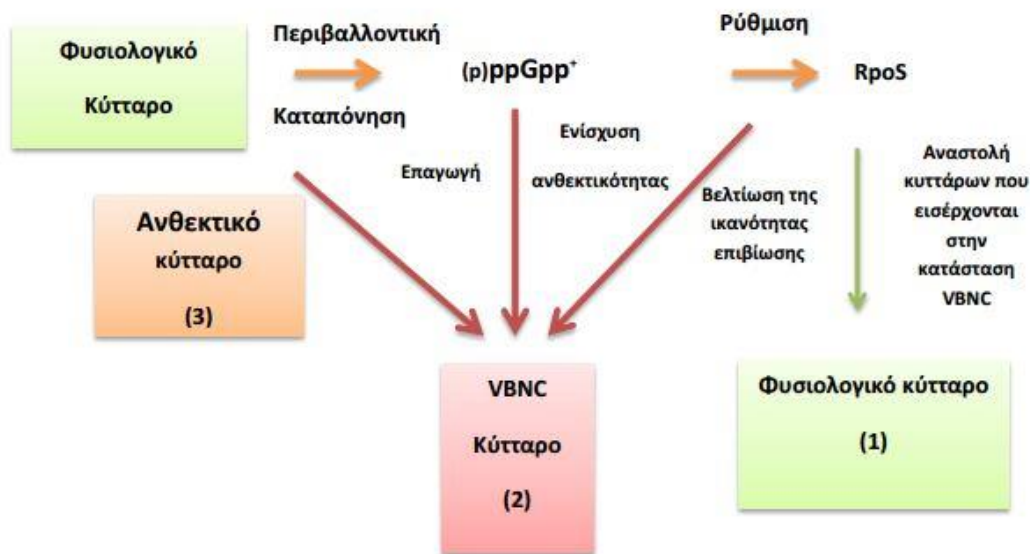
Το γεγονός ότι παρόμοιοι μηχανισμοί επάγουν και την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά ενδυναμώνει τον συσχετισμό των δύο φαινομένων (Amato, Orman and Brynildsen, 2013) (Nicole M Vega, Kyle R Allison, 2012).

Η περιβαλλοντική αστάθεια και οι στρεσογόνοι παράγοντες ευθύνονται για την ανάπτυξη στρατηγικών που επιτρέπουν την ανθεκτικότητα έναντι δυσμενών συνθηκών. Αποτέλεσμα της προσαρμογής είναι η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και της μεταβολικής δραστηριότητας. Οι ληθαργικοί υποπληθυσμοί μπορούν αργότερα να ανακάμψουν εφόσον ο παράγοντας καταπόνησης αφαιρεθεί ή τα κύτταρα λάβουν σήμα ευνοϊκών περιβαλλοντικών συνθηκών.

Οι μοριακοί μηχανισμοί που σχετίζονται με τα παραπάνω φαινόμενα είναι απόκριση stringent (stringent response), που επάγεται από την αλοορμόνη (p)ppGpp, η ενεργοποίηση των ενδομοριακών πρωτεασών και τα συστήματα TA. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των ομόλογων πρωτεϊνών SpsT και RelA οδηγεί στην αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της αλοορμόνης ppGpp. Το ppGpp αναστέλλει την δράση της εξωπολυφωσφατάσης (PPX) οδηγώντας σε συσσώρευση της poly-P, καθώς η πολυφωσφορική κινάση συνεχίζει να λειτουργεί συστηματικά. Το μόριο poly-P ενεργοποιεί την Lon πρωτεάση (Lon protease), η οποία ελέγχει την δραστηριότητα του συστήματος Toxin/Antitoxin. Η αποικοδόμηση των τοξινών οδηγεί σε ταυτόχρονη απελευθέρωση των τοξινών και επαγωγή της ανθεκτικότητας των κυττάρων (Maisonneuve and Gerdes, 2014).



Εικόνα 3 Μοριακός μηχανισμός σχηματισμού ανθεκτικών κυττάρων. Οι αριθμοί υποδεικνύουν την σειρά με την οποία συμβαίνουν τα γεγονότα (Maisonneuve and Gerdes, 2014).



Εικόνα 4 Διαφορετικές οπτικές όσον αφορά τον σχηματισμό των VBNC κυττάρων. (1) Οι πρωτεΐνες RpoS παρεμποδίζουν τον σχηματισμό των VBNC κυττάρων, ενώ παράλληλα ενισχύουν την ανθεκτικότητα. (2) Η αλορμόνη (p)rrpGpp ενδέχεται να λειτουργεί ως επαγωγέας της κατάστασης VBNC. (3) Το φυσιολογικό κύτταρο γίνεται ανθεκτικό πρώτου εισέλθει στη κατάσταση VBNC (Zhao *et al.*, 2017).

Listeria monocytogenes απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης

Όξινη καταπόνηση

Μία από τις πλέον κοινές μεθόδους συντήρησης των τροφίμων αποτελεί η αύξηση της οξύτητας ή αλλιώς οξίνιση, που μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ζύμωσης ή της προσθήκης ειδικών συντηρητικών στα τρόφιμα όπως το οξικό οξύ, το προπιονικό οξύ και το γαλακτικό οξύ. Τα ασθενή οξέα σε αδιάστατη μορφή εισέρχονται στα μικροβιακά κύτταρα, μειώνοντας το ενδοκυτταρικό pH και διαταράσσοντας τις μεταβολικές δραστηριότητες.

Η ικανότητα διατήρησης του ενδοκυτταρικού pH επιτυγχάνεται με την μεταφορά των πρωτονίων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης (μηχανισμός ομοιόστασης του pH). Στους αερόβιους οργανισμούς, η ενεργή μεταφορά των κατιόντων υδρογόνου H^+ συνδέεται με την μεταφορά ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Αντίθετα, τα

αναερόβια βακτήρια επιτυγχάνουν την μεταφορά των H^+ με την βοήθεια των μορίων H^+ -ATP άσης με ταυτόχρονη κατανάλωση ενέργειας από την υδρόλυση ATP.

Ο μικροοργανισμός *L.monocytogenes*, ως προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, μπορεί να χρησιμοποιήσει και τις δύο αυτές διαδικασίες προκειμένου να διατηρήσει σταθερό το pH. Η απόκριση των μικροοργανισμών στην όξινη καταπόνηση (Acid Tolerance Response,ATR) είναι ένα φαινόμενο κατά το οποίο η έκθεση σε μετρίως χαμηλά pH αυξάνει την σύνθεση πρωτεϊνών που βοηθούν την επιβίωση των μικροοργανισμών σε πολύ υψηλές οξύτητες (Yousef and Courtney, 2003). Η έκθεση του παθογόνου μικροοργανισμού *L.monocytogenes* σε ήπιες συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.5) επάγει την απόκριση ανοχής οξέος ATR (O'driscoll, Gahan and Hill, 1997). Επιπρόσθετα, στο μικροοργανισμό *L.monocytogenes* έχει ταυτοποιηθεί ένα ρυθμιστικό σύστημα αντίληψης των περιβαλλοντικών μεταβολών, όπως το χαμηλό pH, που βασίζεται στα γονίδια *lisR* και *lisK*. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν τον ρυθμιστικό παράγοντα σ^B και την ιστιδίνη-κινάση, αντίστοιχα (Gandhi and Chikindas, 2007).

Απολυμαντικά στη βιομηχανία τροφίμων

Υπεροξικό οξύ/ Peroxyacetic-Acid (PAA)

Το υπεροξικό οξύ αποτελεί ένα απολυμαντικό που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων λόγω της εύκολης χρήσης του, του μικρού του κόστους αλλά του μεγάλου εύρους μικροοργανισμών που μπορεί να αντιμετωπίσει ακόμα κι υπό την παρουσία οργανικών υπολειμμάτων (Lensing, H. H., and H. L. Oei. 1984; Malchesky, P.S.1993). Επιπρόσθετα, η απουσία υπολειμματικών ή μεταλλαξογόνων παραπροϊόντων (Van der Veen, Abee, 2011), τα οποία δεν χρειάζονται χλωρίωση, η μικρή εξάρτησή του στις τιμές του pH και τέλος ο μικρός χρόνος επαφής που απαιτείται για να δράσει αποτελούν σημαντικά πλεονεκτήματα.

Αν και το υπεροξικό οξύ (CH_3CO_3H) είναι ισχυρό οξειδωτικό, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που να αποδεικνύουν κάποια συσχέτιση με τερατογενέσεις ή καρκινογόνο δράση. Είναι ισχυρότερο βιοκτόνο από το υπεροξείδιο του υδρογόνου,

καθώς δρα ως σποριοκτόνο, βακτηριοκτόνο, ιοκτόνο και μυκητοκτόνο ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,3%) (Block S.S.et a.l, 1991). Τέλος, έχει την ικανότητα να μετουσιώνει πρωτεΐνες και ένζυμα αλλά και να αυξάνει την διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος μέσω διάρρηξης του σουλφυδριλίου (-SH) και των θειικών δεσμών (S-S) (Baldry, M.G.C., and J.A.L.Fraser. 1988; Block S.S.et a.l, 1991).

Προσαρμογή σε απολυμαντικά

Η χρήση απολυμαντικών αποτελεί ένα κοινό τρόπο αντιμετώπισης του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στη βιομηχανία τροφίμων. Ωστόσο, ο καθαρισμός και η απολύμανση των εγκαταστάσεων, του εξοπλισμού και των επιφανειών είναι άκρως απαιτητική διαδικασία λόγω της ικανότητας ορισμένων στελεχών του συγκεκριμένου μικροοργανισμού να παραμένουν ακόμη και μετά την διαδικασία της απολύμανσης προκαλώντας εκτεταμένη επιμόλυνση (Rørvik et al., 1995; Unnerstad et al., 1996; Autio et al., 1999; Miettinen et al., 1999). Η ικανότητα προσαρμογής του μικροοργανισμού (Aase et al., 2000) αλλά και η αντοχή του έναντι των απολυμαντικών ενισχύει την επιβίωσή του στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων (Lemaitre et al., 1998; Aase et al., 2000; Mereghetti et al.,2000).

Όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε πλακτονική μορφή η ανθεκτικότητά τους εξαρτάται από τις εγγενείς κυτταρικές ιδιότητες, οι οποίες εμφανίζουν μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών, και στην ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) ενός δεδομένου απολυμαντικού (Kastbjerg and Gram, 2012). Επιπλέον, μία προηγούμενη έκθεση του βακτηρίου σε ηπιότερη καταπόνηση παρέχει ανθεκτικότητα έναντι ισχυρότερων καταπονήσεων (Adriao et al., 2008; Bonnet & Montville, 2005; Lou & Yousef, 1997; Skandamis, Stopforth, Yoon, Kendall, & Sofos, 2009).

Ο δεύτερος παράγοντας που ευθύνεται για την επιβίωση των μικροοργανισμών στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων, η προσαρμοστικότητα σε ένα συγκεκριμένο απολυμαντικό, αποτελεί υπόβαθρο για την εκδήλωση του φαινομένου της διασταυρούμενης ανθεκτικότητας, δηλαδή την αντοχή του ίδιου βακτηρίου σε διαφορετικά απολυμαντικά (Jones et al., 1989; Gandhi et al., 1993).

Η έκθεση σε διάφορες υποθανάτιες καταπονήσεις ως αποτέλεσμα αναποτελεσματικού καθαρισμού ή ακατάλληλης χρήσης απολυμαντικού, σε λανθασμένη συγκέντρωση ή σε συγκέντρωση που μετέπειτα αραιώνεται, οδηγεί στη παραμονή στελεχών *L.monocytogenes* στον εξοπλισμό και γενικότερα στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων (Martínez-Suárez et al., 2016).

Υπόθεση εργασίας

Η συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη εστιάζει στην περιγραφή της απόκρισης των βιώσιμων βακτηριακών πληθυσμών της *Listeria monocytogenes* σε διάφορες συνθήκες καταπόνησης, που εντοπίζονται σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων. Η πειραματική έρευνα της επαγωγής των VBNC κυττάρων, σε συνδυασμό με την μεταβλητότητα που προκύπτει από το επίπεδο του πληθυσμού στο επίπεδο του ενός κυττάρου αποτελούν καινοτόμο στοιχείο μελέτης. Επιπρόσθετα, η περιγραφή των μηχανισμών της κινητικής των κυττάρων VBNC του τροφικού παθογόνου *Listeria monocytogenes* πρόκειται να επιτευχθεί για πρώτη φορά, συμβάλλοντας στην απάντηση θεμελιωδών ερωτημάτων που σχετίζονται με αυτό τον μηχανισμό. Στόχος είναι η αποκρυπτογράφηση των βασικών μηχανισμών επαγωγής και ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, συμβάλλοντας στη βασική έρευνα και αποκαλύπτοντας πιθανούς κινδύνους για τη δημόσια υγεία.

Για την επίτευξη των παραπάνω, δύο βακτηριακά στελέχη, το ScottA (ορότυπος 4b) και το EGD-e (ορότυπος 1/2a) υποβλήθηκαν σε όξινη καταπόνηση, σε καταπόνηση από το ευρέως χρησιμοποιούμενο απολυμαντικό, Peracetic Acid (PAA) και σε καταπόνηση λιμού σε συνδυασμό με προσθήκη αλατιού. Οι παράγοντες καταπόνησης διαλύθηκαν σε διάλυμα Ringer, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μέσης στατικής φάσης με τελικό πληθυσμό 10^9 CFU/ml, και οι θερμοκρασίες που μελετήθηκαν είναι 4 °C ή 20°C. Προκειμένου να διαφοροποιηθεί ο ανθεκτικός υποπληθυσμός από τον συνολικό, θρεπτικό μέσο Tryptic Soy Agar με 0.6% Yeast Extract (TSAYE) συμπληρωμένο ή όχι με 5% w/v NaCl χρησιμοποιήθηκε συγκριτικά.

Για την ανίχνευση της κατάστασης Ζώντα αλλά Μη Καλλιεργήσιμα χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα δύο διαφορετικές μέθοδοι και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν σε συνδυασμό. Με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης αξιολογήθηκε η ικανότητα διατήρησης της καλλιεργησιμότητας των κυττάρων, ενώ με τη Μικροσκοπία Φθορισμού έγινε εκτίμηση της φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων (ζωντανά, νεκρά, τραυματισμένα, VBNC). Τα κύτταρα VBNC προσδιορίστηκαν συγκρίνοντας αποτελέσματα από την μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης και της Μικροσκοπίας Φθορισμού, χρησιμοποιώντας συνδυασμό

κατάλληλων συγκεντρώσεων των φθοροφόρων cFDA και Ιωδιούχο Προπίδιο. Σε κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας αποτυπώθηκε και μία φωτογραφία από το Μικροσκόπιο Φθορισμού. Η ικανότητα της ανάκαμψης παρακολούθηθηκε επάνω σε TSAYE στους 37 °C.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά και Εξοπλισμός

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Σκανδάμη, στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Συνεπώς, για την εκτέλεση των πειραματικών διεργασιών χρησιμοποιήθηκε ο εξοπλισμός και τα αντιδραστήρια του συγκεκριμένου εργαστηρίου.

Α΄ ΜΕΡΟΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟ

Στελέχη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*

Για την εκπόνηση της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, το Scott A και το EGD-e . Τα συγκεκριμένα στελέχη ανήκουν στο εργαστήριο του Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το στέλεχος Scott A ανήκει στον ορότυπο 4b, ενώ το στέλεχος EGD-e ανήκει στον ορότυπο 1/2a.

Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων *L. monocytogenes*

Τα στελέχη *Listeria monocytogenes* που αναφέρθηκαν προηγουμένως φυλάσσονται σε θρεπτικό μέσο Tryptone Soy Broth ενισχυμένο με 0,6% Yeast Extract (TSB-YE) και 20% v/v γλυκερόλη στους -20°C (reference stock). Υπό ασηπτικές συνθήκες, 100μl από το reference stock μεταφέρονται σε 10ml αποστειρωμένου TSBYE και ακολουθεί καλή ανάδευση vortex και 24h επώαση στους 30°C (1^η Ανανέωση της καλλιέργειας). Έπειτα, όγκος 100μl από την 1^η Ανανέωση μεταφέρεται υπό ασηπτικές συνθήκες σε 10ml αποστειρωμένου TSBYE. Ακολουθεί καλή ανάδευση σε αναδευτήρα vortex και 18h επώαση στους 30°C (2^η Ανανέωση της καλλιέργειας). Μετά την 18ωρη επώαση, γίνεται γραμμική εξάπλωση (streaking) σε τρυβλία

Tryptone Soy Agar 0,6% Yeast Extract (TSAYE). Τα τρυβλία επωάζονται για δύο ημέρες στους 37°C. Έπειτα φυλάσσονται στους 4°C και μπορούν να χρησιμοποιηθούν το μέγιστο για τρεις εβδομάδες (stock).

Προετοιμασία εμβολίου

Για την προετοιμασία του εμβολίου προηγείται η διαδικασία της ανανέωσης της καλλιέργειας του μικροοργανισμού και ακολουθεί ο καθαρισμός του εμβολίου. Στόχος της ανανέωσης της καλλιέργειας είναι η ανάκτηση των κυττάρων και η απαλοιφή της καταπόνησης που δημιουργείται λόγω των συνθηκών κατάψυξης ή ψύξης. Η ανανέωση περιλαμβάνει δύο ανακαλλιέργειες για 24h και 18h αντίστοιχα, στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, με την βοήθεια κρίκου εμβολιασμού λαμβάνεται μονή βακτηριακή αποικία και υπό ασηπτικές συνθήκες μεταφέρεται σε 10ml αποστειρωμένου TSBYE Ακολουθεί καλή ανάδευση σε αναδευτήρα vortex και 24h επώαση στους 30°C (1^η Ανανέωση της καλλιέργειας). Στην συνέχεια, η 2^η Ανανέωση της καλλιέργειας γίνεται όπως περιγράφεται παραπάνω. Στο χρονικό διάστημα των 18 ωρών τα κύτταρα έχουν φτάσει στην μέση στατική φάση ανάπτυξης. Στο τέλος της επώασης ο τελικός πληθυσμός *L. monocytogenes* είναι 10⁹CFU/ml για το στέλεχος ScottA και 10⁸ log CFU/ml για το στέλεχος EGD-e.

Ο καθαρισμός του εμβολίου που ακολουθεί έχει σκοπό την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και όλων των μικροβιακών προϊόντων μεταβολισμού που υφίστανται στο μέσο ανάπτυξης. Ο καθαρισμός του εμβολίου περιλαμβάνει δυο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 3600 στροφές (rpm) για 10 λεπτά στους 4°C. Έπειτα, από κάθε φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απορίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 10ml ισότονου διαλύματος Ringer.

Θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης

Μη επιλεκτικά μέσα ανάπτυξης

Το κύριο μη επιλεκτικό μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε για επιφανειακή επίστρωση και γραμμική εξάπλωση των κυττάρων *L. monocytogenes*, είναι το Tryptone Soy Agar ενισχυμένο με 0.6% περιεκτικότητα Yeast Extract (TSAYE). Το θρεπτικό υπόστρωμα παρασκευάζεται σύμφωνα με τις αναγραφόμενες από την εταιρεία οδηγίες. Για ένα (1) λίτρο παρασκευάσματος ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας 40g TSA (Oxoid, CM0131). Σε αυτό προστίθενται 6g Yeast Extract (Oxoid, LP0021) και 1lt απιονισμένο νερό. Ακολουθεί έντονη ανάδευση ώσπου το μίγμα να ομογενοποιηθεί και αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά. Τα τρυβλία με το γενικό υπόστρωμα επωάζονται για δύο ημέρες (2d) στους 37°C, κατόπιν οι αποικίες μετρούνται και τα τρυβλία καταστρέφονται θερμικά στους 135°C για 15 λεπτά. Με ανάλογο τρόπο παρασκευάζεται και το Tryptone Soya Broth (Oxoid, CM0129) ενισχυμένο με 0.6% περιεκτικότητα Yeast Extract (TSBYE), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των διαδοχικών ανακαλλιιεργειών.

Επιλεκτικά μέσα ανάπτυξης

Για να διαφοροποιηθεί ο ανθεκτικός υποπληθυσμός από το σύνολο των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε TSAYE συμπληρωμένο με 5% w/v NaCl. Η παρασκευή του επιλεκτικού υποστρώματος έγινε με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε και στην περίπτωση του γενικού υποστρώματος με την διαφορά ότι μετά την ζύγιση του θρεπτικού υποστρώματος TSAYE, προστίθενται 50g NaCl ώστε να επιτευχθεί η τελική επιθυμητή συγκέντρωση. Ακολουθεί σταδιακή εισαγωγή απιονισμένου νερού και ανάδευση έως ότου το μείγμα να ομογενοποιηθεί. Το μείγμα ογκομετρείται (Vτελικό=1lt) και αποστειρώνεται στους 121 °C για 15 λεπτά. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση του επιλεκτικού υποστρώματος στοχεύει στην εκτίμηση του ποσοστού των

τραυματισμένων κυττάρων. Τα υγιή κύτταρα δίνουν ορατές αποικίες στο γενικό καθώς και στο επιλεκτικό υπόστρωμα, σε αντίθεση με τα τραυματισμένα τα οποία αναπτύσσονται μόνο στο γενικό υπόστρωμα. Η διαφορά των σχηματιζόμενων αποικιών δίνει το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων. Οι αποικίες των τρυβλίων με το επιλεκτικό υπόστρωμα καταμετρούνται στις 5 ημέρες (5d) παραμονής τους στους 37°C. Αυτή η τεχνική βοηθάει στην εξαγωγή συμπερασμάτων περί ανάκαμψης των υγιών κυττάρων. Η συγκέντρωση 5% NaCl έχει βρεθεί από προηγούμενα πειράματα ότι αποτελεί την μέγιστη συγκέντρωση άλατος, η οποία δεν δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη των υγιών κυττάρων (MNIC-Maximum Non Inhibitory Concentration), και παράλληλα δεν επιτρέπει την ανάπτυξη τραυματισμένων κυττάρων.

Επιπρόσθετα, για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκε επιλεκτικό χρωμογόνο μέσο καλλιέργειας ALOA (Oxoid, CM1084). Η παρασκευή του επιλεκτικού υποστρώματος έγινε με τον τρόπο που συνιστάται από την εταιρεία στις αναγραφόμενες οδηγίες. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά. Τα τρυβλία με το επιλεκτικό υπόστρωμα ALOA επωάζονται για δυο ημέρες (2d) στους 37°C.

Μετά το τέλος της καταμέτρησης, τα τρυβλία καταστρέφονται θερμικά στους 135°C για 15 λεπτά.

Πίνακας 3 Θρεπτικά Υποστρώματα Ανάπτυξης

Θρεπτικά Ανάπτυξης	Υποστρώματα	Χρόνος επώασης	Θερμοκρασία επώασης
Μη επιλεκτικά			
	TSA+ 0.6% Yeast extract	2 ημέρες	37°C
Επιλεκτικά			
	TSA+ 0.6% Yeast extract+ 5%NaCl	5 ημέρες	37°C
	ALOA	2 ημέρες	37°C

Χειρισμός και συντήρηση θρεπτικών μέσων ανάπτυξης

Μετά την αποστείρωση, τα θρεπτικά υλικά επιστρώνονται σε τρυβλία petri (12.5 ml/ τρυβλίο), υπό ασηπτικές συνθήκες, και αφήνονται να πήξουν για 25-30 λεπτά μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής. Εάν δεν χρησιμοποιηθούν άμεσα, αποθηκεύονται σε κλίβανο χαμηλής θερμοκρασίας (4-8°C).

Διαλύματα

Ο παράγοντας καταπόνησης (π.χ. απολυμαντικό) διαλύεται σε ισοτονικό διάλυμα Ringer ¼ strength. Το διάλυμα Ringer ¼ παρέχεται σε ταμπλέτες από την εταιρία Sigma-Aldrich και περιέχει άλατα τα οποία διατηρούν τα βακτήρια σε ωσμωτική ισορροπία. Μία ταμπλέτα διαλύεται υπό ανάδευση σε 500 ml απιονισμένο νερό και έπειτα αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά.

Παράγοντες καταπόνησης

Όξινη καταπόνηση

Οξικό οξύ (Acetic Acid-AA)

Για την παρασκευή οξικού διαλύματος 1M διαλύονται 2.87 ml πυκνού οξικού οξέος σε 50ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Έπειτα, ακολουθεί καλή ανάδευση και το ομογενοποιημένο διάλυμα αποτελεί το πυκνό stock solution (SS), το οποίο φυλάσσεται και επαναχρησιμοποιείται για διάστημα 15 ημερών. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την ρύθμιση του pH και προστίθεται σταδιακά σε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer 50ml. Παρουσία ηλεκτροδίου οι τιμές του pH καταγράφονται έως ότου επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα (pH 3).

Υδροχλωρικό οξύ (HCl)

Για την παρασκευή υδροχλωρικού διαλύματος 3N διαλύονται 12.5 ml πυκνού υδροχλωρικού οξέος (12N) σε 50ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Έπειτα,

ακολουθεί καλή ανάδευση και το ομογενοποιημένο διάλυμα αποτελεί το πυκνό stock solution (SS), το οποίο φυλάσσεται και επαναχρησιμοποιείται για διάστημα 15 ημερών. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την ρύθμιση του pH και προστίθεται σταδιακά σε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer 50ml. Παρουσία ηλεκτροδίου οι τιμές του pH καταγράφονται έως ότου επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα (pH 2.5).

Απολυμαντικό Peroxy-Acetic Acid (PAA)

Για την παρασκευή πυκνού διαλύματος (stock solution-SS) Peroxy-acetic Acid (PAA) 25ml διαλύονται σε 50ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Έπειτα, ακολουθεί καλή ανάδευση και το ομογενοποιημένο διάλυμα αποτελεί το πυκνό stock solution (SS) συγκέντρωσης 500 ppm. Το πυκνό αυτό διάλυμα αραιώνεται εκ νέου με προσθήκη διαλύματος Ringer έως ότου επιτευχθεί η τελική συγκέντρωση 10, 20, 30 και 40 ppm, αντίστοιχα (working solution-WS). Το διάλυμα μοιράζεται σε 2 πλαστικούς περιέκτες συνολικού όγκου 15ml (falcon tubes), με κάθε περιέκτη να περιέχει 10ml διαλύματος.

Στατιστική Ανάλυση

Κάθε συνθήκη καταπόνησης μελετήθηκε σε 3 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.

Κάθε βιολογική επανάληψη περιείχε δύο τεχνικές επαναλήψεις.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, σε κάθε δειγματοληψία, τα δείγματα επιστρώνονται σε επιλεκτικά και μη επιλεκτικά υποστρώματα. Τα δείγματα που επιστρώνονται σε επιλεκτικά υποστρώματα (TSAYE+ 5% w/v NaCl) επωάζονται στους 37°C για πέντε ημέρες, ενώ τα δείγματα των μη επιλεκτικών (TSAYE), επωάζονται για δύο ημέρες στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης γίνεται καταμέτρηση και καταγραφή του αριθμού των ορατών αποικιών. Σύμφωνα με τον αριθμό αυτό, εκτιμάται και ο πληθυσμός του δείγματος τη στιγμή της δειγματοληψίας.

Ο υπολογισμός του logCFU/ml αρχικού δείγματος γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\text{Log (CFU/ml)} = \text{Log [CFU} \cdot 10^{(\text{Dilution Factor}-1)\text{]}}$$

Εξίσωση 1

Από κάθε τεχνική επανάληψη υπολογίζεται ο μέσος όρος του εκτιμώμενου πληθυσμού ανά χρονικό σημείο. Ακολουθεί η κατασκευή ραβδογράμματος που αποτυπώνει το επίπεδο του συνολικού πληθυσμού αλλά και του ανθεκτικού υποπληθυσμού σε κάθε χρονική στιγμή. Στο διάγραμμα αποτυπώνεται και η τυπική απόκλιση.

Ο υπολογισμός του υποθανάτιου τραυματισμού εκτιμάται από την διαφορά των ορατών αποικιών στα μη επιλεκτικά υποστρώματα (συνολικός πληθυσμός) από τις ορατές αποικίες των επιλεκτικών υποστρωμάτων (ανθεκτικός υποπληθυσμός). Από τον μέσο όρο του πληθυσμού του τραυματισμού κάθε τεχνικής και βιολογικής επανάληψης βρίσκεται ο συνολικός πληθυσμός τραυματισμένων κυττάρων του δείγματος για το δεδομένο χρονικό σημείο. Αυτό επαναλαμβάνεται για όλα τα χρονικά σημεία και προκύπτει έτσι ανά πειραματική συνθήκη ο τραυματισμός για κάθε χρονική στιγμή. Ο υποθανάτιος τραυματισμός εκφράζεται ως ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων σε ένα δείγμα.

Για την αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού θέτουμε μία τιμή-όριο (threshold) κάτω από την οποία η διαφορά ανάμεσα στα επιλεκτικά και μη επιλεκτικά μέσα, θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα βιολογικής παραλλακτικότητας. Διαφορά μεγαλύτερη από αυτήν την τιμή, θεωρείται υποθανάτιος τραυματισμός.

Β' ΜΕΡΟΣ ΕΠΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΖΩΝΤΑ ΑΛΛΑ ΜΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΣΙΜΑ (VBNC state-Viable But Non Culturable) ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΠΟΛΥΜΑΝΤΙΚΟΥ Peroxy-Acetic Acid

Προετοιμασία εμβολίου

Για την προετοιμασία του εμβολίου έγινε διπλή ανανέωση της καλλιέργειας, επώαση για 24h στους 30 °C, μεταφορά 100μl σε 10ml TSB-Yeast και επώαση για 18h στους 30 °C, με στόχο την δημιουργία κυττάρων στατικής φάσης. Τα συγκεκριμένα κύτταρα είναι πιο ανθεκτικά, σε αντίθεση με τα κύτταρα εκθετικής φάσης που είναι πιο ευαίσθητα στο stress.

Καθαρισμός εμβολίου

Με το τέλος της επώασης (18h), η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 3600 στροφές (rpm) για 10 λεπτά στους 4 °C. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκείμενου και επαναιώρηση σε 10ml Ringer (3 Φυγοκεντρήσεις). Στο τέλος των φυγοκεντρήσεων, γίνεται επαναιώρηση σε 3ml του διαλύματος καταπόνησης (Stress Solution-SS). Η συμπύκνωση γίνεται προκειμένου ο πληθυσμός που εκτίθεται στις συνθήκες καταπόνησης να είναι αντίστοιχος με τον πληθυσμό που παρατηρώ στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Ανίχνευση της κατάστασης ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα με συνδυασμό κλασσικής μικροβιολογίας και μικροσκοπίας φθορισμού

Έλεγχος καλλιεργησιμότητας με τη μέθοδο της επίστρωσης

Εφόσον έχει ολοκληρωθεί ο καθαρισμός του εμβολίου και η επαναιώρηση στο διάλυμα καταπόνησης ξεκινά ο υπολογισμός του χρόνου έκθεσης στην εκάστοτε συγκέντρωση του απολυμαντικού. Σε κάθε βιολογική επανάληψη υπάρχουν δύο τεχνικές επαναλήψεις. Έτσι, το διάλυμα της καταπόνησης που εμπεριέχει τα κύτταρα χωρίζεται σε 2 erpendorff (τεχνική επανάληψη A+B), καθένα από τα οποία περιέχει 1,5ml από το διάλυμα καταπόνησης (Stress Solution-SS). Τα erpendorff φυλάσσονται στην θερμοκρασία καταπόνησης, 20 °C και 4 °C.

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα ελέγχεται η εξέλιξη του πληθυσμού (αύξηση, μείωση, σταθερός) κάνοντας δειγματοληψία. Πριν την επίστρωση 100μl καλλιέργειας σε κάθε τρυβλίο (TSAYE και TSAYE+ 5%NaCl) γίνονται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (100μl από το εμβόλιο με το stress προστίθενται σε 900μl διαλύματος Ringer). Τα τρυβλία τοποθετούνται στους 37 °C και ακολουθεί καταμέτρηση των ορατών αποικιών μετά από 2 (TSAYE) και 5 ημέρες (TSAYE+5%NaCl).

Διαλύματα Φθοροφόρων

Για την αξιολόγηση της μεταβολικής ενεργότητας / θανάτωσης έγινε χρήση δύο διαφορετικών φθοροφόρων του CFDA ($V_{\text{τελ}} = 100\mu\text{M}$), της εταιρείας Sigma Aldrich, και του PI ($V_{\text{τελ}} = 30\mu\text{M}$), από το Baclight/ Live Dead kit L7012. Για το CFDA τα 25mg σκόνης διαλύθηκαν σε 1 ml DMSO ($V = 54\text{mM}$, Stock Solution). Στην συνέχεια, όγκος 9.25 μl από το Stock Solution μεταφέρθηκε σε 1ml DMSO ($V = 500\mu\text{M}$, Working Solution). Κατά την διαδικασία της χρώσης 2μl από το Working Solution μεταφέρθηκαν σε 100μl καλλιέργειας ($V_{\text{τελ}} = 100\mu\text{M}$).

Για το PI αντίστοιχα, όγκος 100μl από το Stock ($V = 20\text{mM}$) μεταφέρθηκε σε 1230 μl DMSO ($V = 1.5\text{mM}$, Working Solution). Τέλος, όγκος 2μl από το Working Solution μεταφέρθηκε σε 100μl καλλιέργειας ($V_{\text{τελ}} = 30\mu\text{M}$).

Ανίχνευση μεταβολικής ενεργότητας με τη χρήση Μικροσκοπίας Φθορισμού

Η μικροσκοπία σε συνδυασμό με τα κατάλληλα φθοροφόρα επιτρέπει την αναγνώριση της φυσιολογικής κατάστασης ενός πληθυσμού στο επίπεδο ενός κυττάρου. Αυτή η ιδιότητα καθιστά τη μικροσκοπία φθορισμού πολύ καλό εργαλείο για την εκτίμηση των διαφορετικών φυσιολογικών αποκρίσεων ενός βακτηριακού πληθυσμού κατά τη διάρκεια ή μετά από την έκθεση σε μια συνθήκη καταπόνησης.

Η ταυτοποίηση των διαφορετικών κλασμάτων (ζωντανά, νεκρά, τραυματισμένα και VBNC κύτταρα) του πληθυσμού του *L. monocytogenes* βασίστηκε στην ταυτόχρονη χρήση δύο διαφορετικών μεθόδων: μέθοδος επίστρωσης/ καταμέτρηση αποικιών και μικροσκοπία φθορισμού. Ένα σύνολο πειραμάτων επικεντρώθηκε αποκλειστικά στη μέθοδο επίστρωσης, προκειμένου να επιλεγεί η κατάσταση που επάγει τον μέγιστο

τραυματισμό, κι έπειτα ακολούθησε συνδυασμός αυτής με την παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού προκειμένου να ανιχνευθεί η κατάσταση ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα (VBNC state).

Στόχος ήταν η απαρίθμηση του συνολικού βιώσιμου πληθυσμού (καλλιεργούμενος και μη καλλιεργούμενος) χρησιμοποιώντας χρησιμοποιώντας δύο φθορίζουσες χρωστικές ταυτόχρονα, SYTO 9 ή cFDA και ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide-PI). Τόσο το SYTO 9 όσο και το PI συνδέονται με το DNA αλλά με διαφορετική ικανότητα διείσδυσης στη κυτταρική μεμβράνη. Το SYTO 9 επισημαίνει κύτταρα με ανέπαφη ή κατεστραμμένη κυτταρική μεμβράνη, ενώ το ιωδιούχο προπίδιο εισχωρεί μόνο σε κύτταρα με κατεστραμμένες μεμβράνες. Το cFDA βάφει τα κύτταρα που είναι μεταβολικά ενεργά άρα και βιώσιμα, παράγοντας πράσινο φθορισμό. Αντίθετα, τα βαμμένα με PI κύτταρα παρουσιάζουν κόκκινο φθορισμό και θεωρούνται νεκρά.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα χρησιμοποιώντας SYTO 9 ως δείκτη σήμανσης των ζωντανών κυττάρων. Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση επανεξετάστηκε κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών. Η χρώση με SYTO 9 δείχνει ότι το κύτταρο έχει μια ακέραιη μεμβράνη, ενώ η χρώση με cFDA δείχνει ότι οι κυτταρικές εστεράσες είναι ενεργές και η μεμβράνη είναι άθικτη, αποτελώντας καλύτερη ένδειξη μεταβολικής ενεργότητας των κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, ένα κύτταρο που έχει χρωματιστεί από το PI μπορεί να οριστεί σαφώς ως "νεκρό", επειδή το PI εισέρχεται μόνο σε κύτταρα με μια κατεστραμμένη μεμβράνη. Για τους προαναφερθέντες λόγους, χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός cFDA / PI. Η διπλή χρώση cFDA /PI προσφέρει καλύτερη ένδειξη της κυτταρικής μεταβολικής δραστηριότητας και της ακεραιότητας της μεμβράνης. Έτσι, προκειμένου να ελεγχθεί η μεταβολική ενεργότητα των κυττάρων συνδυάστηκε η μέθοδος της επίστρωσης των τρυβλίων με μία ταχεία και πιο σύγχρονη μέθοδο αυτή της παρατήρησης των δειγμάτων στο Μικροσκόπιο Φθορισμού. Για να επιτευχθεί ο φθορισμός έγινε χρώση των δειγμάτων με κατάλληλες συγκεντρώσεις συνδυασμού χρωστικών cFDA ($C_{\text{τελ}}=100\mu\text{M}$) και PI ($C_{\text{τελ}}=30\mu\text{M}$). Σε κάθε χρονική στιγμή που πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία έγινε ταυτόχρονη παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Για την αξιολόγηση της λειτουργικότητας των χρωστικών χρησιμοποιήθηκαν δυο θετικά (positive) control, ένα για κάθε χρωστική, cFDA και PI αντίστοιχα. Για τη δημιουργία των control έγινε καθαρισμός της 2^{ης} ανανέωσης της καλλιέργειας, όπως περιγράφηκε παραπάνω, και επαναιώρηση του ιζήματος σε 10ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Για το θετικό cFDA control σε όγκο 100μl από την 18ωρη ανανέωση προστέθηκαν 2μl cFDA ($C_{\text{τελ}}=100\mu\text{M}$) και ακολούθησε 20 λεπτά επώαση. Έπειτα, έγινε φυγοκέντρηση στις 13300 στροφές (rpm) για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, μαζί με την περίσσεια της χρωστικής, και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 100μl αποστειρωμένου Ringer. Ακολούθησε ήπια ανάδευση, μεταφορά όγκου 10 μl σε αντικειμενοφόρο πλάκα και παρατήρηση του δείγματος στο μικροσκόπιο φθορισμού. Για το θετικό cFDA control αναμένεται πράσινος φθορισμός. Όσον αφορά, το θετικό PI control όγκος 100μl από την 18ωρη ανανέωση φυγοκεντρήθηκε στις 13.300 στροφές (rpm) για 2 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και έγινε προσθήκη 100μl αιθανόλης 70% v/v. Ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 13.300 στροφές (rpm) για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, μαζί με την περίσσεια της χρωστικής, και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 100μl αποστειρωμένου Ringer. Τέλος, έγινε ήπια ανάδευση και μεταφορά όγκου 10 μl σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Το δείγμα παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο φθορισμού και αναμένεται κόκκινος φθορισμός.

Η διαδικασία δημιουργίας του διαλύματος καταπόνησης είναι αυτή που περιγράφηκε παραπάνω. Με το πέρας των 18 ωρών επώασης, η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 3600 στροφές (rpm) για 10 λεπτά στους 4 °C. Ακολούθησε απόρριψη του υπερκείμενου και επαναιώρηση σε 10ml Ringer (3 Φυγοκεντρήσεις). Στο τέλος των φυγοκεντρήσεων, έγινε επαναιώρηση σε 3ml του διαλύματος καταπόνησης (Stress Solution-SS). Η συμπύκνωση έγινε προκειμένου ο πληθυσμός που εκτίθεται στις συνθήκες καταπόνησης να είναι αντίστοιχος με τον πληθυσμό που παρατηρείται στο μικροσκόπιο φθορισμού. Όγκος 100μl από το Stress Solution φυγοκεντρήθηκε στις 13.300 στροφές (rpm) για 2 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίφθηκε, με αυτό τον τρόπο σταμάτησε η επίδραση του διαλύματος καταπόνησης στα κύτταρα (διακοπή του χρόνου έκθεσης στην καταπόνηση) και αποφεύχθηκε η οποιαδήποτε ανάμειξη του PAA με τα φθοροφόρα. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100μl αποστειρωμένου Ringer. Ακολούθησε ήπια ανάδευση και προστέθηκαν 2μl cFDA ($C_{\text{τελ}}=100\mu\text{M}$) και 2

μl PI ($C_{\text{τελ}}=30\mu\text{M}$). Έπειτα, έγινε επώαση για 20 λεπτά και φυγοκέντρωση στις 13.300 στροφές (rpm) για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, μαζί με την περίσσεια των φθοροφόρων, και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100μl Ringer. 10 μl μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και έγινε παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Πίνακας 4 Φθοροφόρα που χρησιμοποιήθηκαν

Φθοροφόρο / Τρόπος λειτουργίας	CFDA / Ανίχνευση μεταβολικής ενεργότητας	Propidium Iodide/ Διάτρηση κυτταρικής μεμβράνης, θανάτωση
Εταιρεία	Sigma Aldrich	BacLight™ kit , ThermoFisher SCIENTIFIC
Τελική συγκέντρωση	100μM	30μM

Παρακολούθηση της ικανότητας ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων με βιντεομικροσκοπία

Στο τέλος του συνολικού χρόνου έκθεσης των κυττάρων στο διάλυμα της καταπόνησης, όγκος 100μl από το Stress Solution (απευθείας, χωρίς αραιώση) φυγοκεντρήθηκε στις 13.300 στροφές (rpm) για 2 λεπτά. Ακολούθησε απόρριψη του υπερκείμενου κι επαναιώρηση σε 100μl αποστειρωμένου Ringer . Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε 900 μl αποστειρωμένου Ringer (αραιώση 1:10). Έπειτα, από τρυβλίο TSAYE με οδηγό μία καλυπτρίδα απομακρύνθηκε ένα κομμάτι άγαρ 22 x 22 mm το οποίο μεταφέρθηκε επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα υπό ασηπτικές συνθήκες. Όγκος 10μl από το διάλυμα Ringer με τα κύτταρα μεταφέρθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες και απλώθηκε με την μέθοδο της επίστρωσης επάνω στο κομμάτι άγαρ. Για την επίτευξη της επίστρωσης χρησιμοποιήθηκε κρίκος εμβολιασμού. Προκειμένου να απορροφηθεί η περίσσεια του υγρού από το άγαρ, το παρασκεύασμα παρέμεινε για 15 λεπτά μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής χωρίς επικάλυψη. Στο τέλος της επώασης, το παρασκεύασμα επικαλύφθηκε με καλυπτρίδα και σφραγίστηκε ερμητικά περιφερειακά με σιλικόνη. Η ικανότητα ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων

παρακολουθήθηκε με την χρήση βιντεομικροσκοπίας. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν για τουλάχιστον 6 ώρες και τα δείγματα φωτογραφίζονταν ύστερα από 12 ώρες παραμονής τους στο άγαρ (συνολικός χρόνος παραμονής στο άγαρ 18 ώρες).

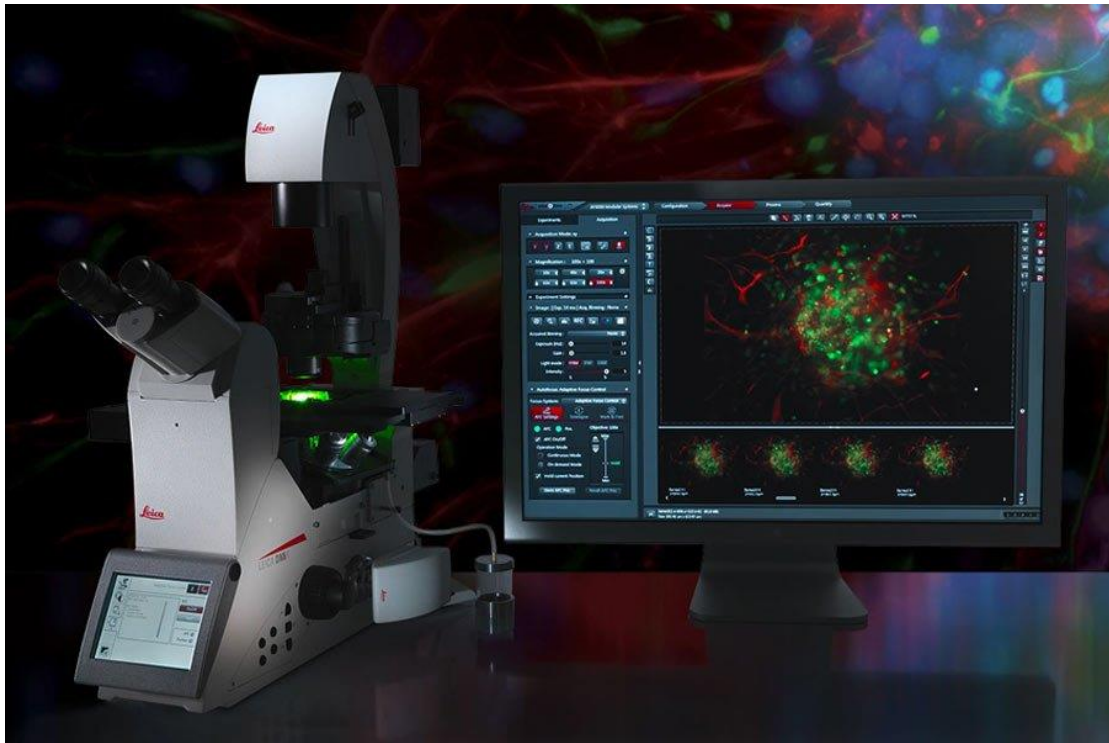
Image Analysis

Οι εικόνες που έχουν ληφθεί έχουν υποβληθεί σε επεξεργασία και αναλύονται από ένα συνδυασμό τεχνικών επεξεργασίας εικόνας και μηχανικής μάθησης με στόχο την ποσοτικοποίηση κυττάρων ζωντανών (πράσινου φθορισμού, CFDA+/PI-) τραυματισμένων (CFDA+/PI+) και νεκρών (κόκκινου φθορισμού, CFDA-/PI+), μαζί με τα βιοφυσικά χαρακτηριστικά τους σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Ως βάση αυτής της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν αλγόριθμοι τροποποιημένοι αναλόγως για την επεξεργασία του συγκεκριμένου τύπου εικόνων και τις ανάγκες του μικροπεριβάλλοντος, όπως π.χ. παρουσία θορύβου, υπολειμμάτων νεκρών κυττάρων κλπ. Ο ανεπτυγμένος και για τους σκοπούς μας τροποποιημένος αλγόριθμος επιτρέπει την υψηλή εκτίμηση των ιδιοτήτων ενός κυττάρου, την ζωντανή / νεκρή απαρίθμηση και ποσοτικοποίηση, την επεξεργασία με χρονική υστέρηση, με δυνατότητες εντοπισμού κυττάρων, και τον υπολογισμό των χρόνων διαίρεσης στη φάση ανάκαμψης των κυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψη μόνο την καταμέτρηση του ζωντανού / νεκρού πληθυσμού, η αναπτυγμένη μεθοδολογία χωρίζει τα κύτταρα στις εικόνες και ποσοτικοποιεί τις βιοφυσικές τους ιδιότητες και τις εντάσεις φθορισμού (πράσινο / κόκκινο), αποκαλύπτοντας το ζωντανό και το νεκρό πληθυσμιακό κλάσμα και παρέχοντας δεδομένα για την αξιολόγηση του ληθάργου (Balomenos *et al.*, 2017).

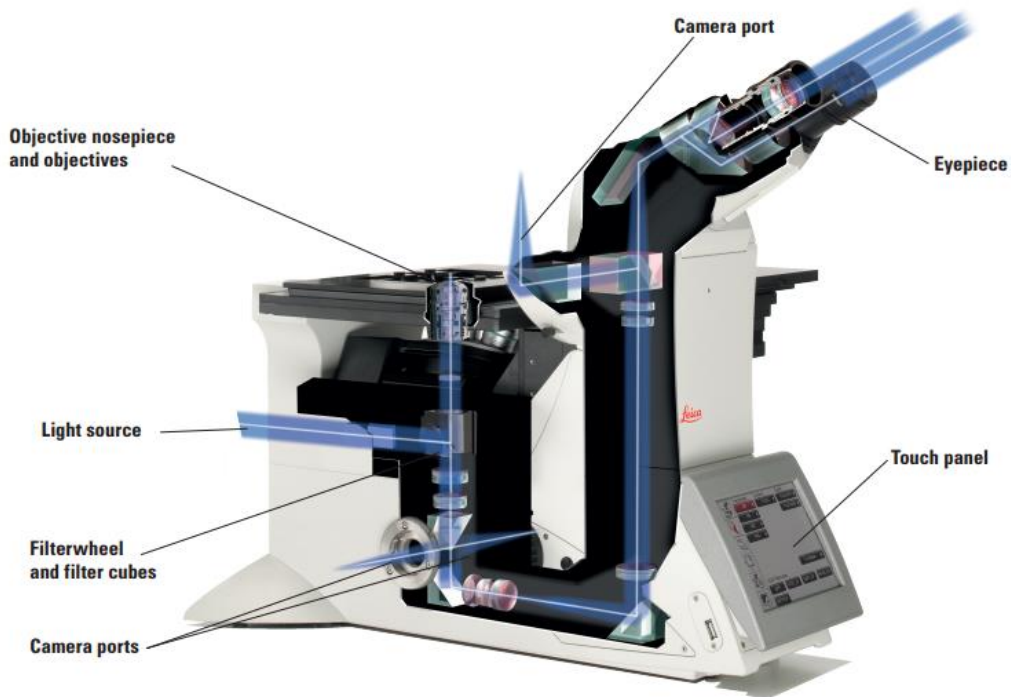
Στατιστική Ανάλυση

Κάθε συνθήκη καταπόνησης μελετήθηκε σε 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Κάθε βιολογική επανάληψη περιείχε δύο τεχνικές επαναλήψεις για την μέθοδο της επίστρωσης. Όσον αφορά τα δείγματα της μικροσκοπίας φθορισμού, σε κάθε χρονική στιγμή αποτυπώνονταν με τυχαία επιλογή τέσσερα διαφορετικά οπτικά πεδία από το ίδιο παρασκεύασμα.

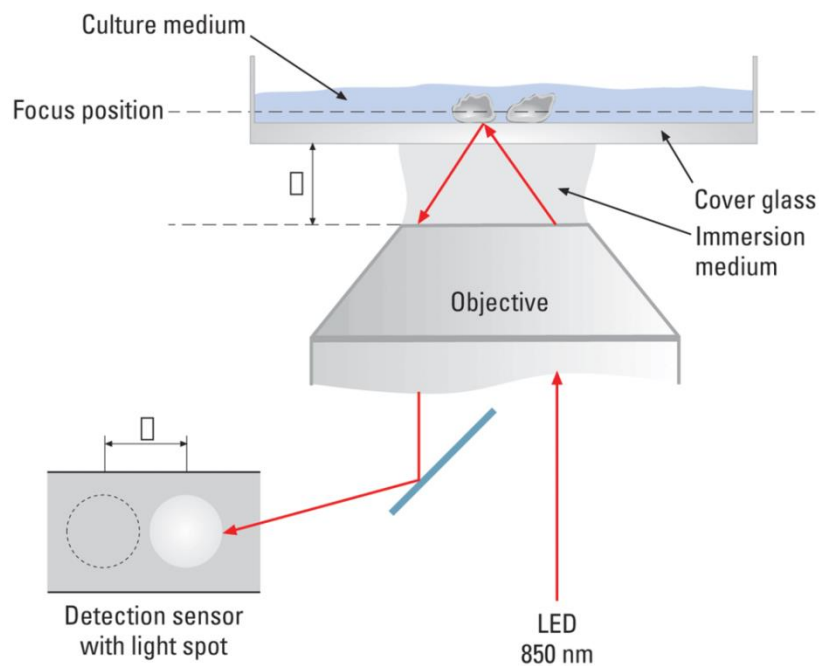
Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε το Ανάστροφο Μικροσκόπιο Φθορισμού Leica DMi8 (Εικόνα 4,5) με αντίθεση φάσης (phase contrast). Η συλλογή των εικόνων φθορισμού έγινε από μία κάμερα DFC 7000 T, με διαθέσιμη την δυνατότητα αυτόματης εστίασης. Χρησιμοποιήθηκε αντικειμενικός φακός εμβάπτισης σε λάδι (emersion oil) 100x, με αριθμητικό άνοιγμα $NA=1.25$. Για την απομόνωση ακτινοβολιών συγκεκριμένου μήκους κύματος χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα φίλτρα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.



Εικόνα 5 Μικροσκόπιο DMi8.



Εικόνα 6 Στοιχεία ανεστραμμένου Μικροσκοπίου Φθορισμού Leica DMi8.



Εικόνα 7 Διάγραμμα της διάταξης της πορείας των φωτεινών ακτίνων στο Ανάστροφο Μικροσκόπιο Φθορισμού Leica DMi8.

Πίνακας 5 Φάσματα απορρόφησης/ εκπομπής φίλτρων.

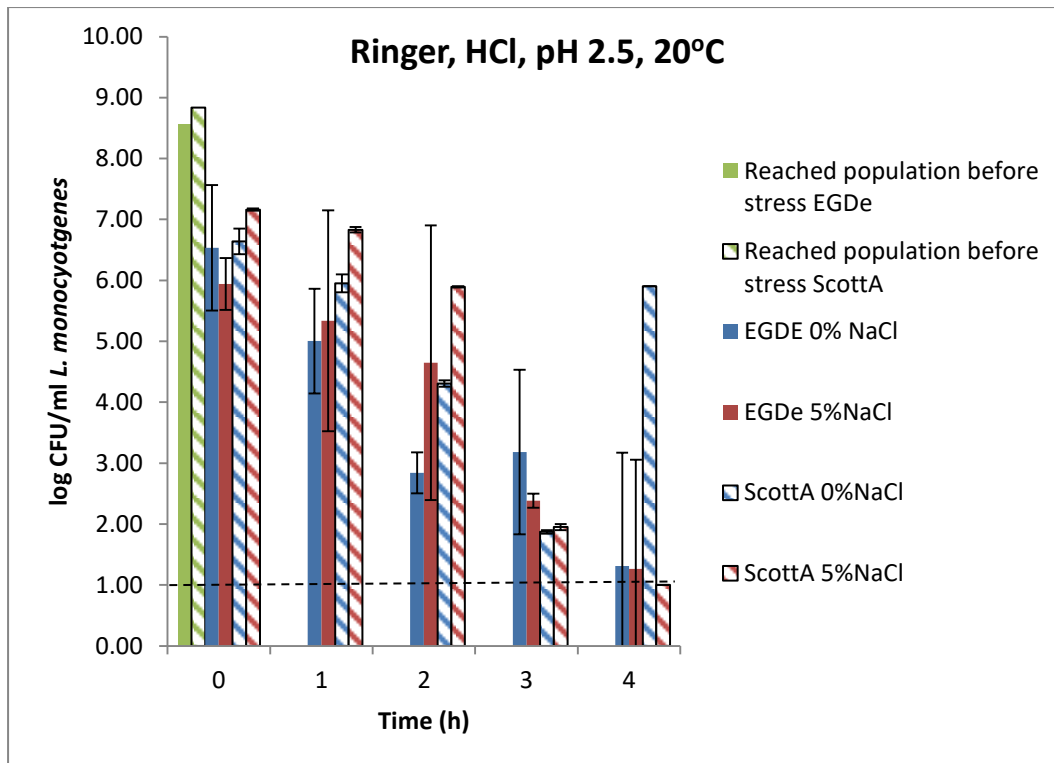
Φίλτρο	GFP	Y3
Excitation	450-490 nm	532-558nm
Emission	500-550nm	570-640nm
DC	495nm	565nm

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση υδροχλωρικού οξέος (pH 2.5) σε θερμοκρασία 20°C

Τα κύτταρα στατικής φάσης *L. monocytogenes* εμβολιάζονται σε 2 falcons όγκου 15 ml τα οποία περιέχουν από 10 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer, ρυθμισμένο σε pH 2.5 χρησιμοποιώντας υδροχλωρικό διάλυμα συγκέντρωσης 3N. Οι δειγματοληψίες γίνονται ανά μία ώρα και ο συνολικός χρόνος έκθεσης στο διάλυμα της καταπόνησης είναι 5 ώρες, στους 20°C.

Όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 1**, η έκθεση των κυττάρων σε Ringer, pH 2.5, ρυθμισμένο με HCl, στους 20°C προκάλεσε σημαντική μείωση στο συνολικό πληθυσμό στο στέλεχος EGDc. Τόσο ο συνολικός πληθυσμός, όσο και ο ανθεκτικός υποπληθυσμός φαίνεται να μειώνονται περίπου $\sim 5 \log$ CFU/ml, αντίστοιχα, έπειτα από τέσσερις ώρες επώασης. Όσον αφορά την έκθεση του στελέχους Scott A στην ίδια καταπόνηση (Ringer, pH 2.5, HCl, 20 °C) φαίνεται ότι μετά από 3 ώρες επώασης ο συνολικός πληθυσμός έχει μειωθεί περίπου $\sim 5 \log$ CFU/ml. Κατά την 4^η ώρα επώασης υπήρξε σημαντική μείωση του ανθεκτικού υποπληθυσμού, συγκριτικά με τον συνολικό πληθυσμό. (**Σχήμα 1**).



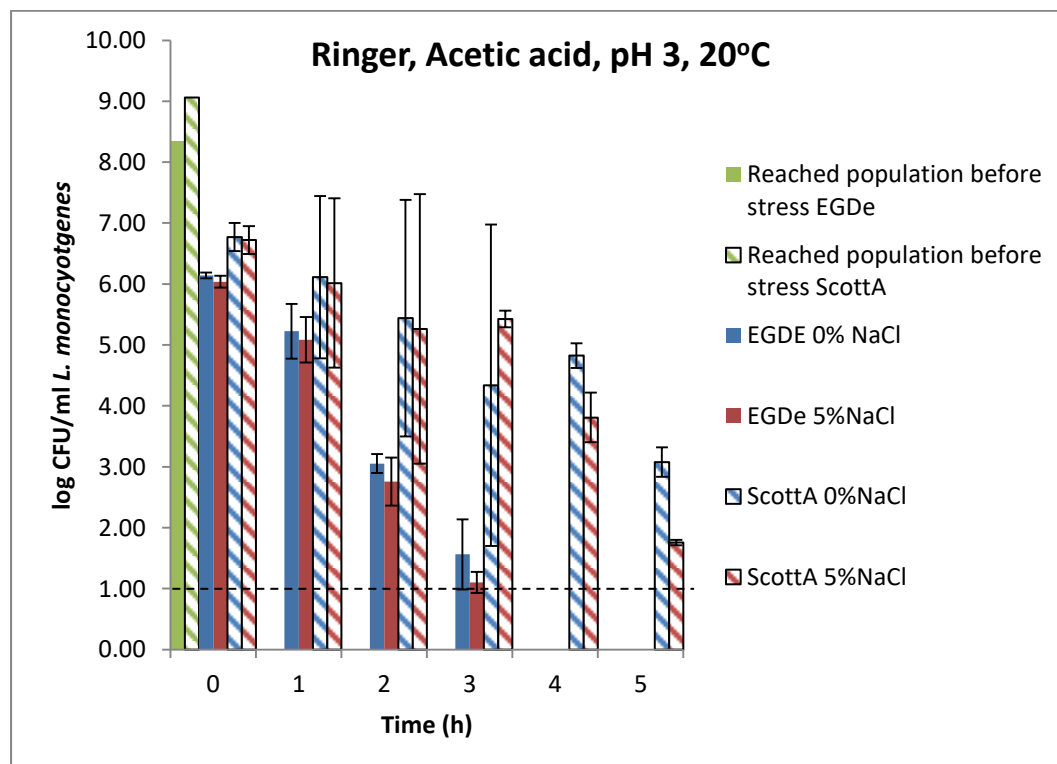
Σχήμα 1 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος EGDe (συμπαγείς ράβδοι) και ScottA (ράβδοι με μοτίβο), ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3 και 4 ώρες στους 20 °C σε διάλυμα Ringer, pH 2.5 (ρυθμισμένο με HCl 3N). Ο πληθυσμός του καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Ye με 0% NaCl (μπλε ράβδοι), και για 5 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Ye με 5% NaCl (κόκκινες ράβδοι). Στο διάγραμμα αποτυπώνεται και το επίπεδο του πληθυσμού πριν την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης (πράσινη ράβδος). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το όριο καταμέτρησης της μεθόδου (ο.κ.= 10 CFU / ml).

Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση οξικού οξέος (pH 3) σε θερμοκρασία 20°C

Προκειμένου να ελεγχθεί η απόκριση του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* έναντι χαμηλού pH παρουσία ασθενών οξέων, εξετάσαμε την αντίδραση κάθε στελέχους ύστερα από επώαση για 0,1,2,3,4 και 5 ώρες στους 20 °C σε διάλυμα Ringer, pH 3 ρυθμισμένο χρησιμοποιώντας οξικό οξύ 1M.. Όσον αφορά το στέλεχος EGDe, το επίπεδο του πληθυσμού πριν την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης είναι περίπου ~8 log CFU/ml. Κατά την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης, μηδενική στιγμή, ο πληθυσμός μειώνεται κατά περίπου 2 log CFU/ml. Έτσι, το επίπεδο του πληθυσμού που εκτίθεται στην μετέπειτα καταπόνηση είναι πλέον 10^6 CFU/ml. Ύστερα από μία

ώρα επώασης τόσο ο συνολικός όσο και ο ανθεκτικός υποπληθυσμός έχουν μειωθεί κατά περίπου ~ 1 log CFU/ml. Την 2^η ώρα επώασης ακολουθεί περαιτέρω μείωση του πληθυσμού (συνολικού και ανθεκτικού), συγκριτικά με το αρχικό επίπεδο, της τάξης των 3 log CFU/ml. Κατά την 3^η ώρα επώασης το επίπεδο του συνολικού πληθυσμού μειώνεται κατά περίπου ~ 4 log CFU/ml και ταυτόχρονα παρατηρείται διαφορά μεταξύ του συνολικού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού. Τις επόμενες ώρες έκθεσης δεν παρατηρείται καμία ανάπτυξη (Σχήμα 2).

Για το στέλεχος Scott A, το επίπεδο του πληθυσμού πριν την έκθεση στο παράγοντα καταπόνησης είναι περίπου 10^9 CFU/ml. Εκθέτοντας το στέλεχος Scott A στην ίδια καταπόνηση, ο πληθυσμός φαίνεται να μειώνεται κατά περίπου ~ 2 log CFU/ml, την μηδενική στιγμή, και παραμένει σχεδόν σταθερός έως την 1^η ώρα επώασης. Ο συνολικός πληθυσμός μειώνεται ύστερα από 2 ώρες επώασης, κατά περίπου 2 log CFU/ml χωρίς ωστόσο να σημειώνεται παράλληλη μείωση του ανθεκτικού υποπληθυσμού, αφού η ανάπτυξη τόσο στο γενικό μέσο (TSAYe) όσο και στο επιλεκτικό (TSAYe + 5% NaCl) φαίνεται να είναι σχεδόν ίση. Από την 3^η ώρα έκθεσης κι έπειτα, παρατηρείται διαφορά των δύο πληθυσμών, 0%NaCl και 5%NaCl (Σχήμα 2).



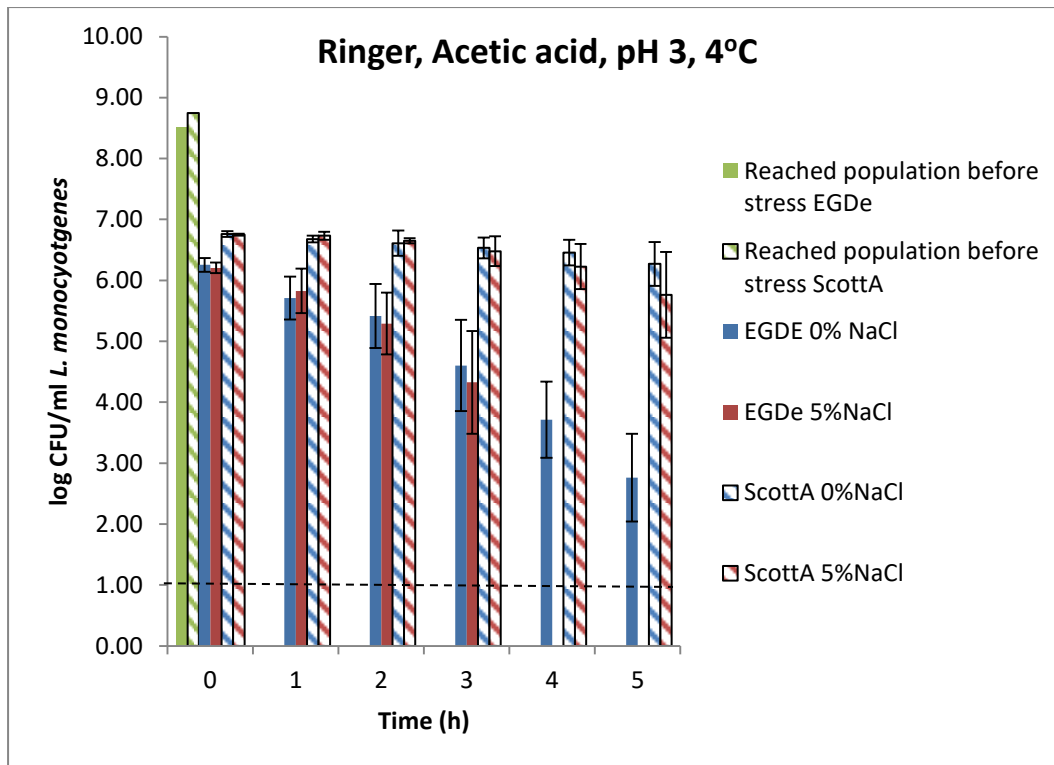
Σχήμα 2 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος EGDe (συμπαγείς ράβδοι) και

ScottA (ράβδοι με μοτίβο) ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3, 4 και 5 ώρες στους 20 °C σε διάλυμα Ringer, pH 3 (ρυθμισμένο με CH₃COOH 1M). Ο πληθυσμός καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Ye με 0% NaCl (μπλε ράβδοι), και για 5 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Ye με 5% NaCl (κόκκινες ράβδοι). Στο διάγραμμα αποτυπώνεται και το επίπεδο του πληθυσμού πριν την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης (πράσινη ράβδος). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το όριο καταμέτρησης της μεθόδου (ο.κ.= 10 CFU / ml).

Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση οξικού οξέος (pH 3) σε θερμοκρασία 4°C

Το στέλεχος EGDe φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητο κατά την έκθεση σε διάλυμα Ringer ρυθμισμένο με pH 3 με οξικό οξύ στους 4 °C, συγκριτικά με το Scott A, καθώς ο συνολικός πληθυσμός του ύστερα από 5 ώρες επώασης φαίνεται να μειώνεται ~3 log CFU/ml (**Σχήμα 3**). Πιο συγκριμένα, παρατηρείται ότι έως την 3^η ώρα επώασης των κυττάρων στο διάλυμα καταπόνησης, ο συνολικός πληθυσμός παραμένει σχεδόν σταθερός με μία ελάχιστη μείωση της τάξης του ~0.5 log CFU/ml. Την 3^η ώρα έκθεσης σε διάλυμα οξικού οξέος (pH 3), στους 4 °C, το επίπεδο του πληθυσμού μειώνεται κατά περίπου ~ 1 log CFU/ml, ενώ ύστερα από 4 ώρες παραμονής των κυττάρων στο διάλυμα του στρες παρατηρείται διαφορά μεταξύ του συνολικού και του ανθεκτικού πληθυσμού κατά περίπου ~ 0.5 log CFU/ml.

Αντίθετα, ο πληθυσμός του στελέχους Scott A φαίνεται να παραμένει σχεδόν σταθερός καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης (**Σχήμα 3**). Ωστόσο, σημαντική είναι η μείωση που παρατηρείται στο επίπεδο του πληθυσμού κατά την πρώτη του επαφή με το διάλυμα καταπόνησης, δηλαδή τη μηδενική στιγμή της έκθεσης. Φαίνεται ότι ο συνολικός και ο ανθεκτικός πληθυσμός μειώνονται περίπου ~2 log CFU/ml την μηδενική στιγμή της έκθεσης στο διάλυμα του στρες σε σχέση με το επίπεδο του πληθυσμού του εμβολίου. αφού ύστερα από 18 ώρες παραμονής στους 30°C, ο τελικός πληθυσμός του στελέχους Scott A είναι περίπου 10⁹ CFU/ml και την μηδενική στιγμή καταμετρούνται περίπου 10⁷ CFU/ml. Τέλος, ύστερα από 4 ώρες επώασης των κυττάρων σε διάλυμα οξικού οξέος (pH 3), στους 4 °C, παρατηρείται μία μικρή διαφορά μεταξύ του συνολικού και του ανθεκτικού πληθυσμού (μικρότερη του 0.5 log CFU/ml). Το ίδιο συμβαίνει και κατά την 5^η ώρα έκθεσης.



Σχήμα 3 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος EGDe (συμπαγείς ράβδοι) και ScottA (ράβδοι με μοτίβο), ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3, 4 και 5 ώρες στους 4 °C σε διάλυμα Ringer, pH 3 (ρυθμισμένο με CH₃COOH 1M). Ο πληθυσμός καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Ye με 0% NaCl (μπλε ράβδοι), και για 5 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Ye με 5% NaCl (κόκκινες ράβδοι). Στο διάγραμμα αποτυπώνεται και το επίπεδο του πληθυσμού πριν την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης (πράσινη ράβδος). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το όριο καταμέτρησης της μεθόδου (ο.κ.= 10 CFU / ml).

Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση με απολυμαντικό Peroxy- Acid (PAA) συγκέντρωσης 10, 20 και 30 ppm σε θερμοκρασία 20°C

Μία ακόμη συνθήκη καταπόνησης που αξιολογήθηκε ήταν η έκθεση των κυττάρων μέσης στατικής φάσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA), στους 20 °C και στους 4 °C. Κύτταρα στατικής φάσης *L.monocytogenes* εμβολιάζονται σε 2 falcons όγκου 15 ml τα οποία περιέχουν από 10ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer με την κατάλληλη συγκέντρωση PAA. Οι δειγματοληψίες γίνονται ανά 15 λεπτά και ο συνολικός χρόνος έκθεσης στο διάλυμα της καταπόνησης είναι 90 λεπτά.

Όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 4**, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ήδη από την μηδενική στιγμή έκθεσης στο διάλυμα της καταπόνησης το επίπεδο του πληθυσμού (συνολικού και ανθεκτικού) μειώνεται κατά περίπου $\sim 2 \log \text{CFU/ml}$ σε σχέση με το αρχικό εμβόλιο. Μετά από 15 λεπτά επώασης ο συνολικός πληθυσμός παραμένει σχεδόν σταθερός, με τον ανθεκτικό να εμφανίζει μείωση της τάξης του $\sim 1 \log \text{CFU/ml}$. Μετά από 30 λεπτά έκθεσης σε 10ppm PAA ο ανθεκτικός υποπληθυσμός εμφανίζει σημαντική μείωση $\sim 5 \log \text{CFU/ml}$, για το στέλεχος EGDe. Επιπρόσθετα, την ίδια χρονική στιγμή σημαντική είναι η διαφορά του υποπληθυσμού από το συνολικό πληθυσμό. Ο συνολικός βιώσιμος πληθυσμός φαίνεται να μηδενίζεται μετά από 60 λεπτά έκθεσης στο διάλυμα καταπόνησης.

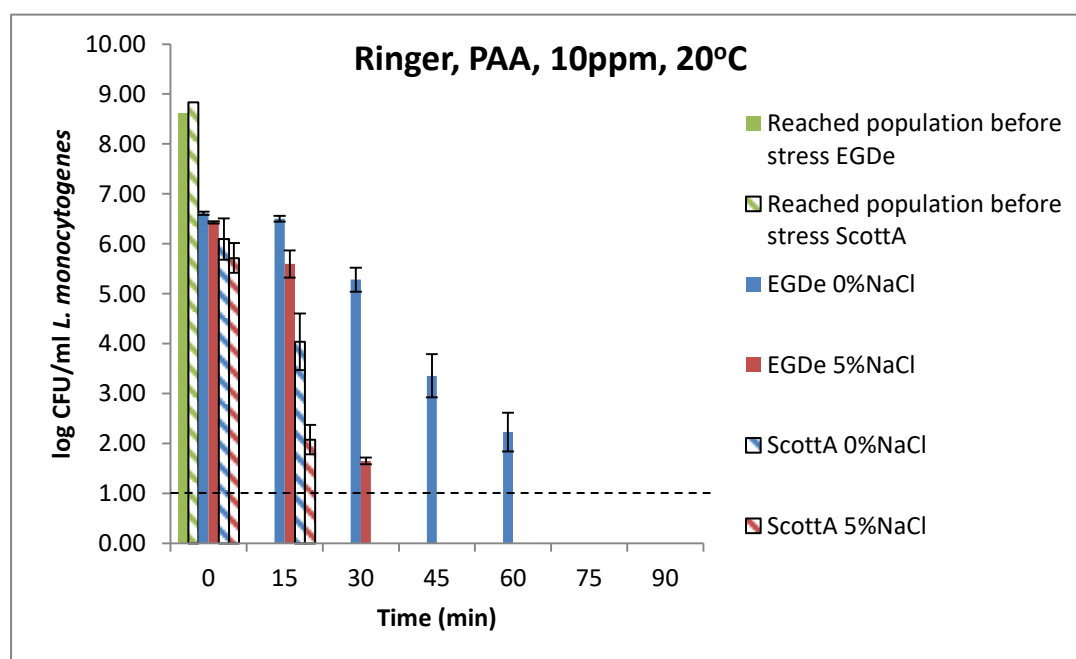
Όταν η ένταση της καταπόνησης αυξάνεται από τα 10 στα 20ppm του απολυμαντικού PAA, **Σχήμα 5**, παρατηρείται και πάλι η αρχική μείωση του πληθυσμού κατά περίπου $\sim 2 \log \text{CFU/ml}$, την μηδενική στιγμή της έκθεσης. Μετά από 15 λεπτά επώασης ο συνολικός πληθυσμός μειώνεται κατά περίπου $\sim 1 \log \text{CFU/ml}$, ενώ ο ανθεκτικός υποπληθυσμός υφίσταται μείωση της τάξης των $4 \log \text{CFU/ml}$. Επομένως, η διαφορά μεταξύ των κυττάρων που καταμετρούνται στο 0% NaCl και στο 5% NaCl είναι σημαντική. Ύστερα, από 30 λεπτά επώασης καταγράφονται μετρήσεις μόνο στο 0% NaCl, ενώ η ανάπτυξη στο 5% NaCl είναι μηδενική.

Η μέγιστη ισχύς καταπόνησης που εφαρμόστηκε στα κύτταρα του στελέχους EGDe, όσον αφορά την έκθεση στο απολυμαντικό PAA, στους 20°C , ήταν η συγκέντρωση των 30ppm. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 6**, ύστερα από 15 λεπτά επώασης καταμετρούνται αποικίες μόνο στο 0% NaCl. Ο ανθεκτικός υποπληθυσμός καταμετρείται μόνο κατά την μηδενική στιγμή της έκθεσης και είναι της τάξης των περίπου $\sim 5.5 \log \text{CFU/ml}$. Την ίδια χρονική στιγμή ο συνολικός πληθυσμός προσεγγίζει τους περίπου $\sim 6 \log \text{CFU/ml}$.

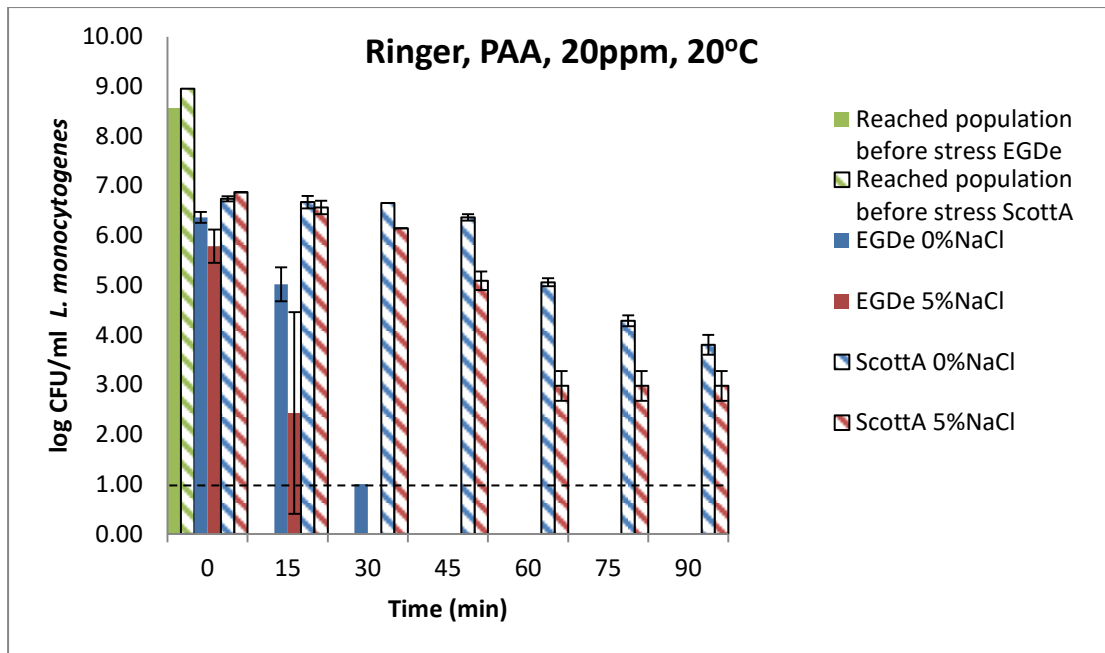
Όσον αφορά το στέλεχος Scott A, κατά την έκθεση σε 10 ppm PAA, στους 20°C (**Σχήμα 4**) το επίπεδο του αρχικού εμβολίου ύστερα από 18 ώρες επώασης στους 30°C είναι της τάξης των $\sim 9 \log \text{CFU/ml}$. Φαίνεται ότι κατά τη μηδενική στιγμή της έκθεσης στο συγκεκριμένο παράγοντα καταπόνησης, τόσο ο συνολικός όσο και ο ανθεκτικός υποπληθυσμός μειώνονται κατά περίπου $\sim 3 \log \text{CFU/ml}$. Ύστερα από 15 λεπτά της επώασης, παρατηρείται διαφορά μεταξύ του συνολικού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού της τάξης των $\sim 2 \log \text{CFU/ml}$. Την ίδια χρονική στιγμή, ο συνολικός

πληθυσμός έχει μειωθεί κατά περίπου $\sim 2 \log$ CFU/ml σε σχέση με την μηδενική στιγμή.

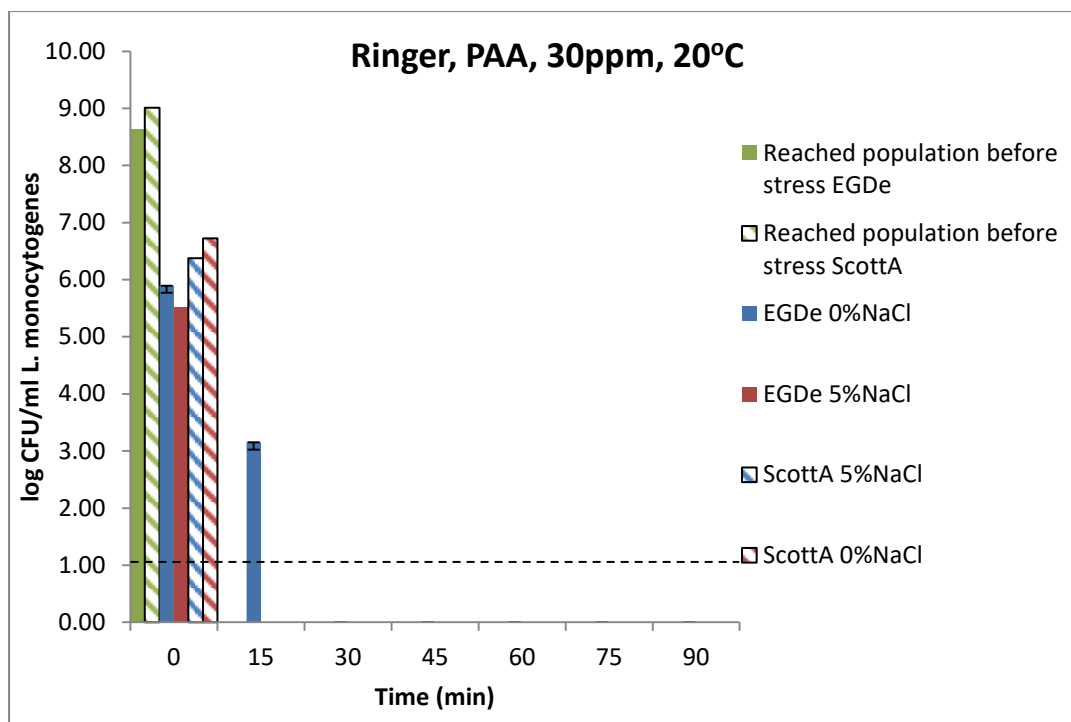
Τέλος, η έκθεση σε 30ppm PAA υποδεικνύει απώλεια βιωσιμότητας μετά από 15 λεπτά επώασης. Διαφορά μεταξύ του συνολικού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού εντοπίζεται ήδη από την μηδενική στιγμή (περίπου $0.5 \log$ CFU/ml). Αυξάνοντας την ισχύ της καταπόνησης σε 30ppm από την μηδενική στιγμή και έπειτα παρατηρείται πλήρης απώλεια της βιωσιμότητας (**Σχήμα 6**).



Σχήμα 4 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (\log CFU/ml), στέλεχος EGDe (συμπαγείς ράβδοι) και ScottA (ράβδοι με μοτίβο), ύστερα από επώαση για 0, 30, 60 και 90 στους 20°C σε διάλυμα Ringer με 10ppm του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA). Ο πληθυσμός καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37°C , σε TSA-Υε με 0% NaCl (μπλε ράβδοι), και για 5 ημέρες στους 37°C , σε TSA-Υε με 5% NaCl (κόκκινες ράβδοι). Στο διάγραμμα αποτυπώνεται και το επίπεδο του πληθυσμού πριν την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης (πράσινη ράβδος). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το όριο καταμέτρησης της μεθόδου (ο.κ.= 10 CFU / ml).



Σχήμα 5 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος EGDe, ύστερα από επώαση για 0, 30, 60 και 90 στους 20°C σε διάλυμα Ringer με 20ppm του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA). Ο πληθυσμός του στελέχους EGDe καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Υε με 0% NaCl (μπλε ράβδοι), και για 5 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Υε με 5% NaCl (κόκκινες ράβδοι). Στο διάγραμμα αποτυπώνεται και το επίπεδο του πληθυσμού πριν την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης (πράσινη ράβδος). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το όριο καταμέτρησης της μεθόδου (ο.κ.= 10 CFU / ml).



Σχήμα 6 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στελέχος EGDe, ύστερα από επώαση για 0, 30, 60 και 90 στους 20°C σε διάλυμα Ringer με 30ppm του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA). Ο πληθυσμός του στελέχους EGDe καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Ye με 0% NaCl (μπλε ράβδοι), και για 5 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Ye με 5% NaCl (κόκκινες ράβδοι). Στο διάγραμμα αποτυπώνεται και το επίπεδο του πληθυσμού πριν την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης (πράσινη ράβδος). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το όριο καταμέτρησης της μεθόδου (ο.κ.= 10 CFU / ml).

Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση με απολυμαντικό Peroxy- Acid (PAA) συγκέντρωσης 10, 20 και 30 ppm σε θερμοκρασία 4°C

Παράλληλα, εξετάστηκε η απόκριση των στελεχών Scott A και EGDe στις συγκεντρώσεις 10, 20 και 30 ppm PAA στους 4 ° C. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 7, ο πληθυσμός (log CFU/ml) του στελέχους EGDe, συνολικός και ανθεκτικός, παραμένει σχεδόν σταθερός, μετά από επώαση 90 λεπτών σε 10 ppm PAA, στους 4 °C . Το επίπεδο του πληθυσμού είναι περίπου 10⁶ log CFU/ml. Ωστόσο, κατά την πρώτη επαφή των κυττάρων με το διάλυμα καταπόνησης σημειώνεται σημαντική μείωση της τάξης των περίπου ~2 log CFU/ml, σε σχέση με το αρχικό επίπεδο του εμβολίου.

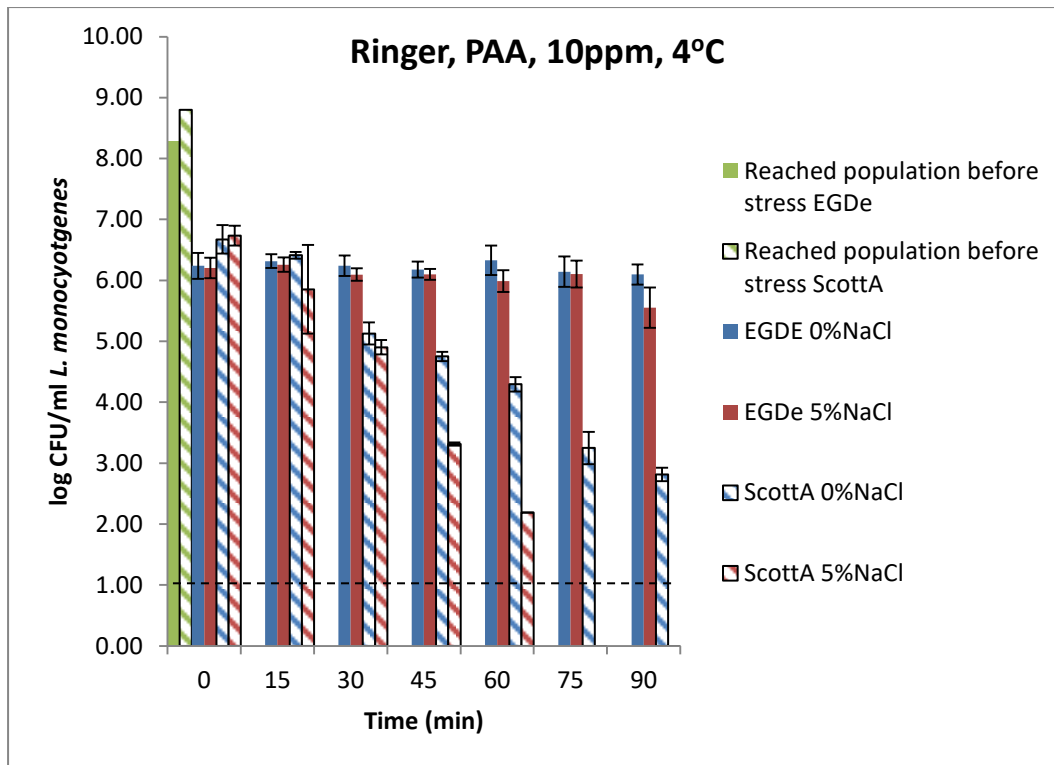
Όταν τα κύτταρα του στελέχους EGDe εκτίθενται σε 20ppm PAA, παρατηρείται διαφορά μεταξύ του συνολικού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού της τάξης του περίπου ~ 3 log CFU/ml (**Σχήμα 8**). Τα αποτελέσματα μετά από 15 λεπτά έκθεσης.

δείχνουν πλήρη απώλεια της βιωσιμότητας, τόσο του συνολικού όσο και του ανθεκτικού υποπληθυσμού. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούνται κατά την έκθεση σε 30ppm PAA (Σχήμα 9), με την μόνη διαφορά ότι ύστερα από 15 έκθεσης στον παράγοντα καταπόνησης η διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών (συνολικού και ανθεκτικού) υπολογίζεται να είναι περίπου $\sim 1 \log$ CFU/ml.

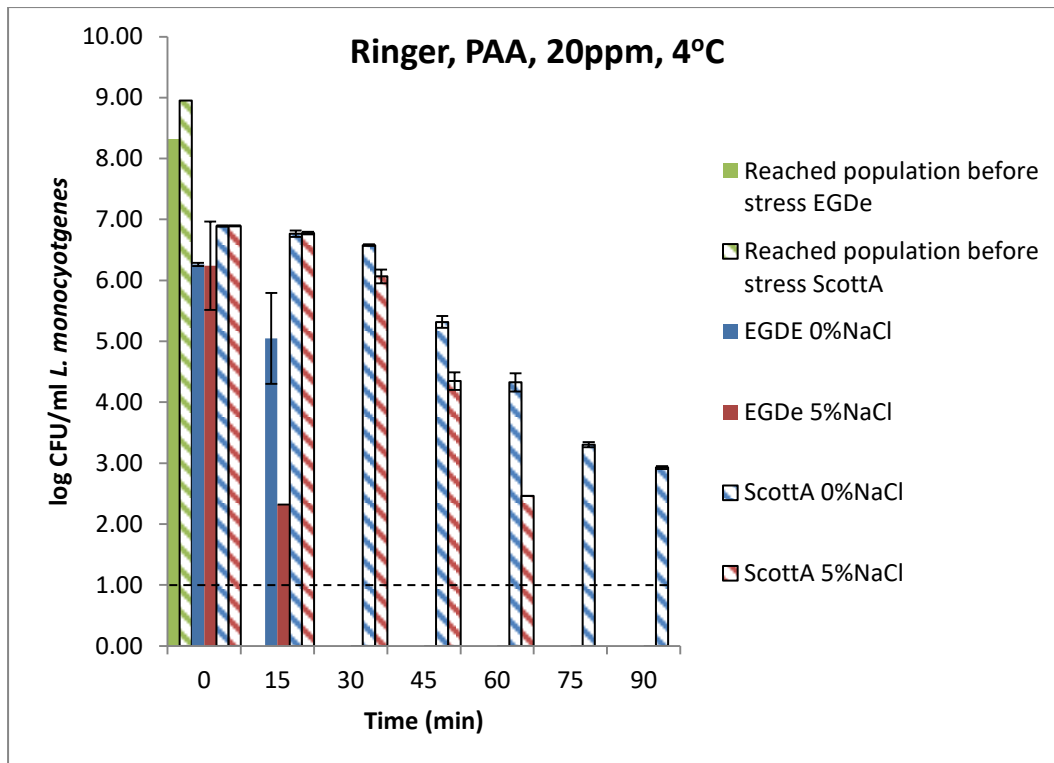
Όσον αφορά το στέλεχος Scott A, κατά την έκθεση σε 10ppm PAA, στους 4°C (Σχήμα 7) έπειτα από 30 λεπτά παραμονής των κυττάρων στο διάλυμα καταπόνησης ο συνολικός πληθυσμός φαίνεται να παραμένει σχεδόν σταθερός και είναι της τάξης των 6.8 log CFU/ml. Ύστερα, από 30 λεπτά επώασης το επίπεδο του πληθυσμού έχει μειωθεί κατά περίπου $\sim 1 \log$ CFU/ml. Στα 45 λεπτά διακρίνεται μία διαφορά μεταξύ του συνολικού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού, γεγονός που παρατηρείται και έπειτα από 60 λεπτά επώασης. Τέλος, στα 75 και 90 λεπτά της έκθεσης των κυττάρων του στελέχους Scott A σε 10ppm PAA, στους 4°C καταμετρούνται αποικίες μόνο στο 0% NaCl και ο συνολικός πληθυσμός προσεγγίζει τους περίπου $\sim 3 \log$ CFU/ml.

Αυξανόμενη της έντασης της καταπόνησης από τα 10 στα 20ppm PAA, στους 4°C (Σχήμα 8) για το στέλεχος Scott A τόσο ο συνολικός όσο και ο ανθεκτικός υποπληθυσμός παραμένει σχεδόν σταθερός στους $\sim 7 \log$ CFU/ml ύστερα από 30 λεπτά επώασης. Ύστερα από 45 λεπτά έκθεσης παρατηρείται μία πρώτη διαφορά μεταξύ του συνολικού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού, η οποία στα 60 λεπτά προσεγγίζει περίπου τους $\sim 2 \log$ CFU/ml. Στα 75 και 90 λεπτά της επώασης ο ανθεκτικός υποπληθυσμός έχει υποστεί πλήρη θανάτωση, ενώ το επίπεδο του συνολικού πληθυσμού είναι της τάξης των περίπου $\sim 3 \log$ CFU/ml.

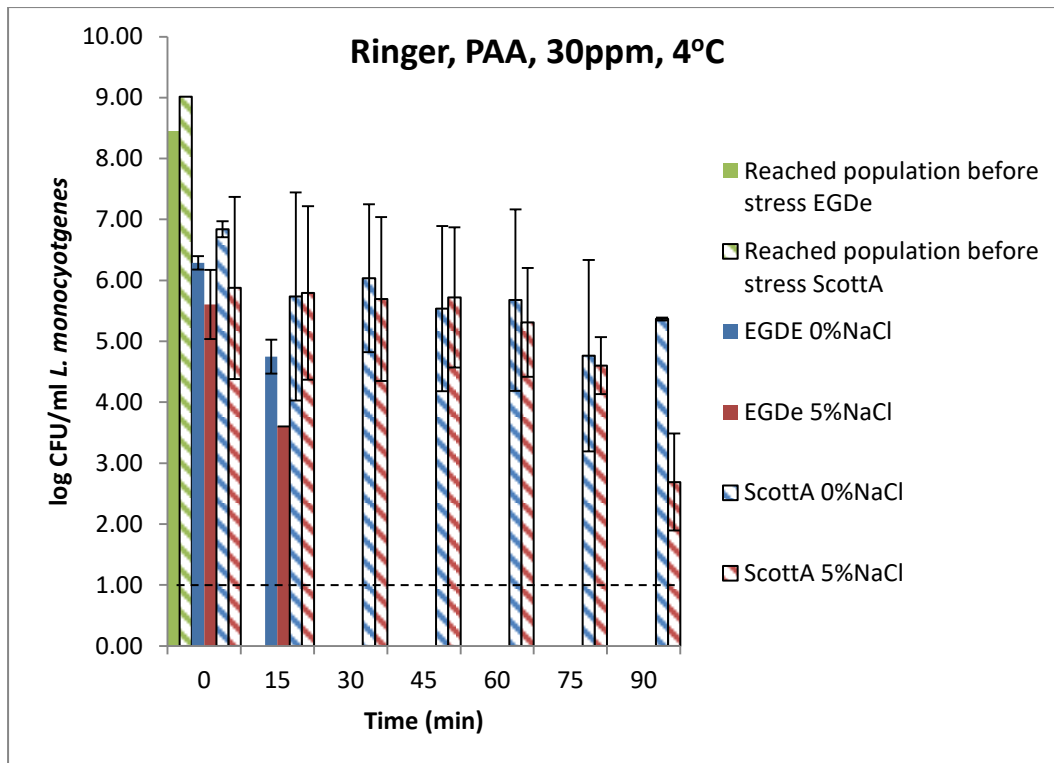
Κλείνοντας, κατά την έκθεση των κυττάρων του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, στέλεχος Scott A, σε 30 ppm PAA, στους 4°C (Σχήμα 9) ο συνολικός πληθυσμός προσεγγίζει περίπου τους $\sim 7 \log$ CFU/ml τη μηδενική στιγμή. Έπειτα, μειώνεται κατά περίπου $\sim 1 \log$ CFU/ml και παραμένει σχεδόν σταθερός μέχρι τα 60 λεπτά της επώασης. Στα 75 λεπτά παρατηρείται μία μείωση κατά περίπου $\sim 1 \log$ CFU/ml, ενώ στα 90 λεπτά η διαφορά μεταξύ συνολικού και ανθεκτικού υποπληθυσμού είναι περίπου $\sim 3 \log$ CFU/ml.



Σχήμα 7 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος EGDe (συμπαγείς ράβδοι) και ScottA (ράβδοι με μοτίβο), ύστερα από επώαση για 0, 30, 60 και 90 στους 4°C σε διάλυμα Ringer με 10ppm του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA). Ο πληθυσμός καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Υε με 0% NaCl (μπλε ράβδοι), και για 5 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Υε με 5% NaCl (κόκκινες ράβδοι). Στο διάγραμμα αποτυπώνεται και το επίπεδο του πληθυσμού πριν την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης (πράσινη ράβδος). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το όριο καταμέτρησης της μεθόδου (ο.κ.= 10 CFU / ml).



Σχήμα 8 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος EGDe (συμπαγείς ράβδοι) και ScottA (ράβδοι με μοτίβο), ύστερα από επώαση για 0, 30, 60 και 90 στους 4°C σε διάλυμα Ringer με 20ppm του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA). Ο πληθυσμός καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37°C, σε TSA-Ye με 0% NaCl (μπλε ράβδοι), και για 5 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Ye με 5% NaCl (κόκκινες ράβδοι). Στο διάγραμμα αποτυπώνεται και το επίπεδο του πληθυσμού πριν την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης (πράσινη ράβδος). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το όριο καταμέτρησης της μεθόδου (ο.κ.= 10 CFU / ml).

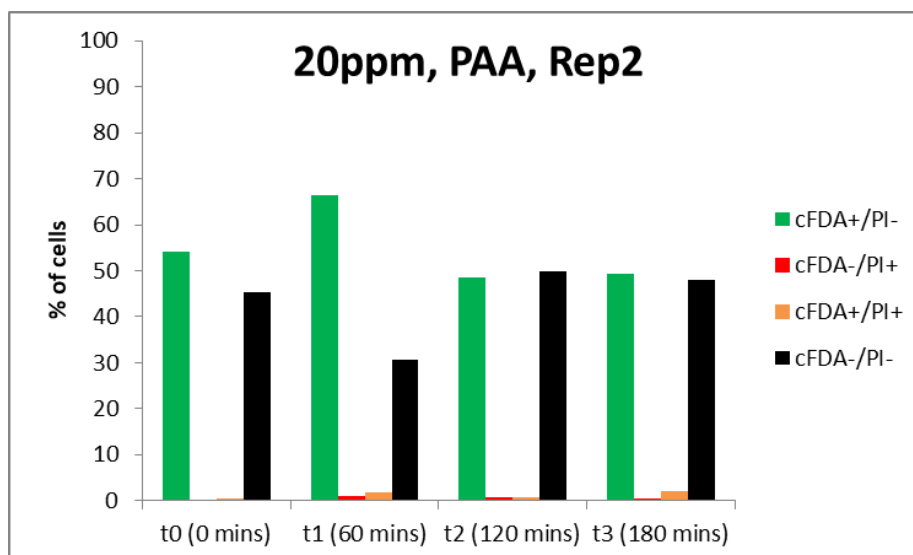
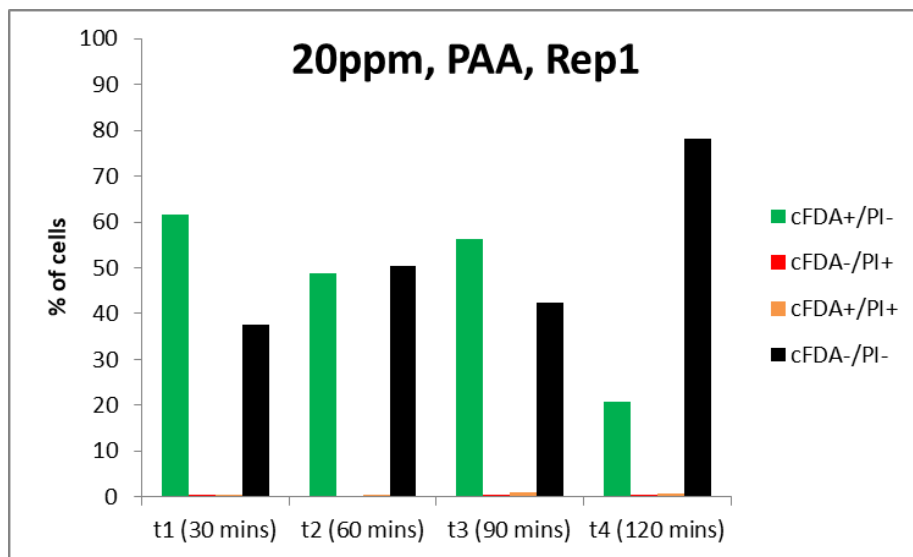


Σχήμα 9 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος EGDe (συμπαγείς ράβδοι) και ScottA (ράβδοι με μοτίβο), ύστερα από επώαση για 0, 30, 60 και 90 στους 4°C σε διάλυμα Ringer με 30ppm του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA). Ο πληθυσμός καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Υε με 0% NaCl (μπλε ράβδοι), και για 5 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Υε με 5% NaCl (κόκκινες ράβδοι). Στο διάγραμμα αποτυπώνεται και το επίπεδο του πληθυσμού πριν την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης (πράσινη ράβδος). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το όριο καταμέτρησης της μεθόδου (ο.κ.= 10 CFU / ml).

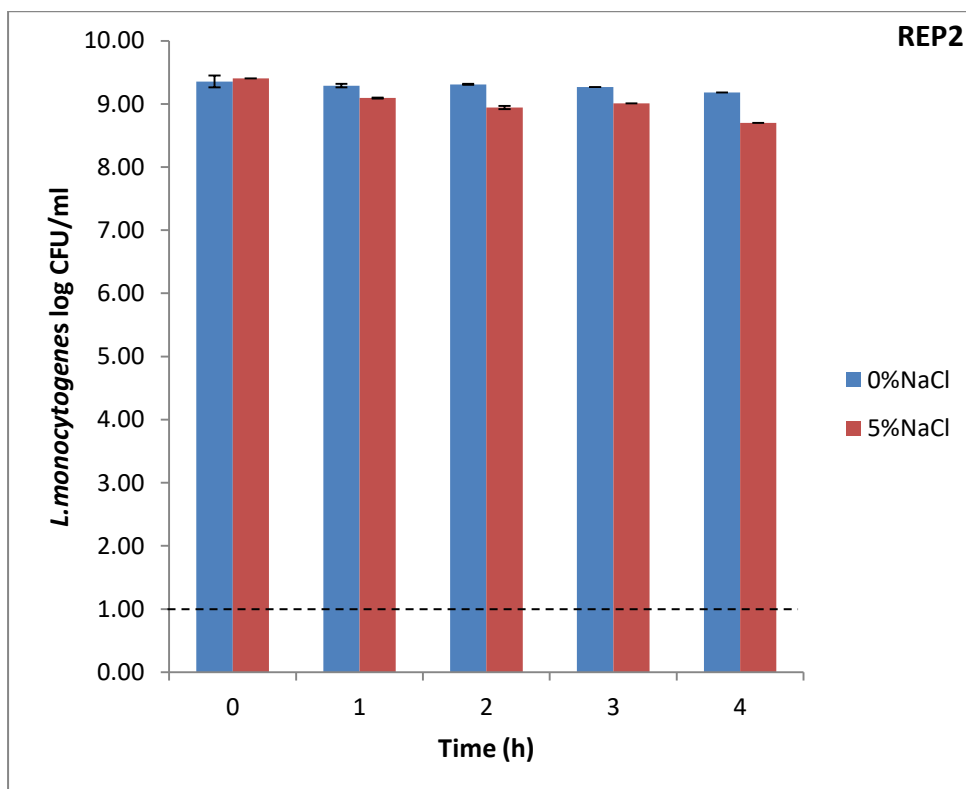
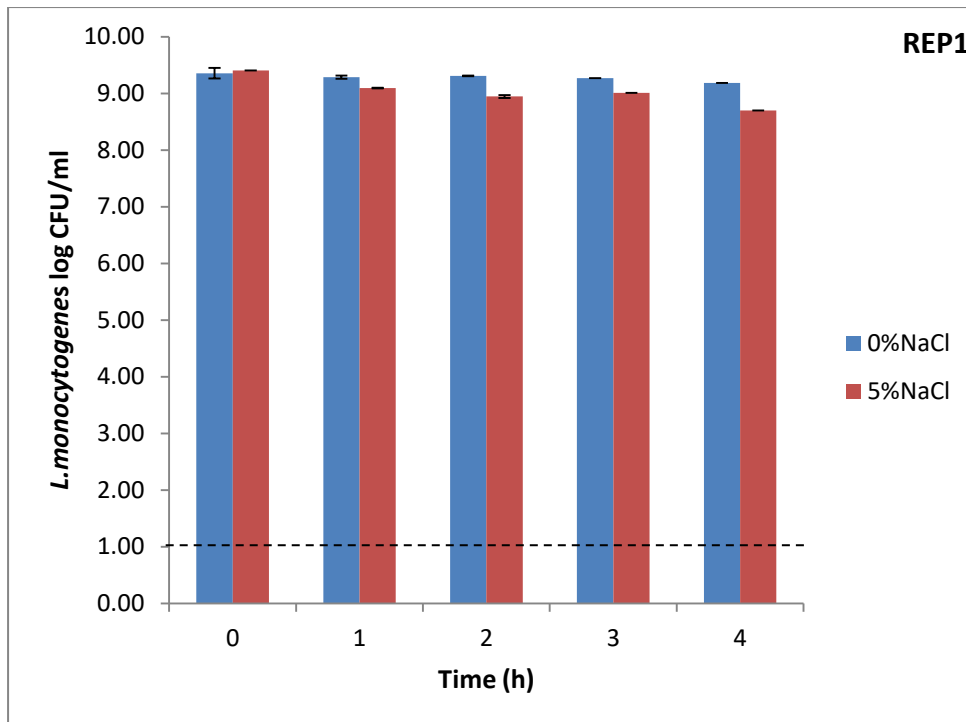
Εκτίμηση της ικανότητας επαγωγής της κατάστασης Ζώντα αλλά μη Καλλιεργήσιμα (Viable But Non Culturable, VBNC state) με την χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων (20ppm, 30ppm, 40ppm) του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA) σε θερμοκρασία καταπόνησης 20°C

Η καταπόνηση των κυττάρων με το απολυμαντικό Paracetic acid δίνει αξιοσημείωτα αποτελέσματα όσον αφορά τον υποθανάτιο τραυματισμό. Τα αποτελέσματα του φθορισμού σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη εκτίμηση της καλλιεργησιμότητας μας επιτρέπουν να ανιχνεύσουμε την επαγωγή της κατάστασης VBNC, έπειτα από την έκθεση του μικροοργανισμού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (20, 30 και 40ppm) του απολυμαντικού PAA.

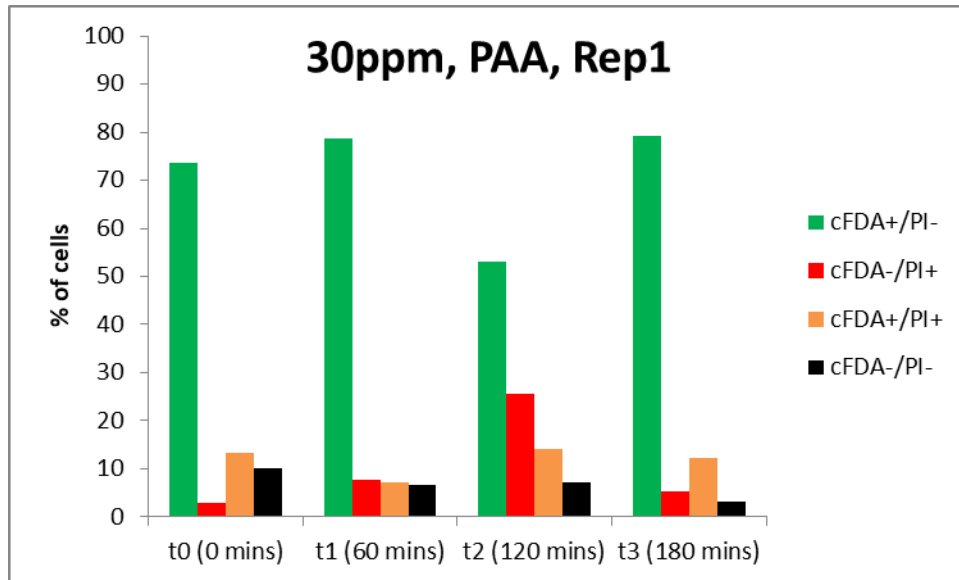
Ύστερα από την επώαση του μικροοργανισμού σε Ringer με 20ppm Paracetic Acid στους 20°C παρατηρείται υψηλό ποσοστό ζωντανών CFDA+/PI- κυττάρων καθ' όλη την διάρκεια της έκθεσης στο απολυμαντικό. Παράλληλα, το ποσοστό των CFDA-/PI+ νεκρών κυττάρων είναι ιδιαίτερα χαμηλό. Σημαντικό είναι το ποσοστό των άβαφων κυττάρων CFDA-/PI- (**Σχήμα 10**). Τα αποτελέσματα συμφωνούν και για τις δύο βιολογικές επαναλήψεις. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 11**, τα κύτταρα διατηρούν την καλλιεργησιμότητά τους. Αναφορικά με την έκθεση των κυττάρων σε διάλυμα Ringer με 30ppm PAA, σημαντικό είναι ότι το ποσοστό των νεκρών CFDA-/PI+, αλλά και των τραυματισμένων κυττάρων CFDA+/PI+ είναι υψηλότερο συγκριτικά με τα 20ppm. Επιπρόσθετα, το ποσοστό των ζωντανών CFDA+/PI- κυττάρων παραμένει σχεδόν στα ίδια επίπεδα (**Σχήμα 12**). Τα δεδομένα αυτά, συνδυάζονται με τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των τρυβλίων, αφού τα κύτταρα μετά από την έκθεση σε 30ppm του απολυμαντικού φαίνεται να διατηρούν την καλλιεργησιμότητά τους ξεκινώντας από έναν πληθυσμό της τάξης των 9 log CFU/ml την μηδενική χρονική στιγμή και στην πορεία ο πληθυσμός τους μειώνεται κατά ένα λογάριθμο παραμένοντας σε υψηλά επίπεδα, της τάξης των 8 log CFU/ml (**Σχήμα 13**). Η έκθεση σε 40ppm του απολυμαντικού υποδεικνύει υψηλότερο ποσοστό τραυματισμένων CFDA+/PI+ αλλά και νεκρών κυττάρων CFDA-/PI+. Τα επίπεδα του κόκκινου φθορισμού φαίνεται να είναι αρκετά υψηλά ήδη από την πρώτη ώρα έκθεσης στην καταπόνηση και αυξάνονται με το πέρασμα του χρόνου, αποδίδοντας το μέγιστο στις 3 ώρες έκθεσης. Αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές στην πρώτη βιολογική επανάληψη (**Σχήμα 14**). Το σημαντικό εύρημα στις συγκεκριμένες συνθήκες καταπόνησης (Ringer, 40ppm PAA, T20°C) είναι ότι τα κύτταρα χάνουν την καλλιεργησιμότητά τους ήδη από την πρώτη ώρα έκθεσης στα 40ppm του απολυμαντικού (**Σχήμα 15**). Ταυτόχρονα, ωστόσο διατηρούν την ζωτικότητα τους, παρουσιάζοντας μετρήσιμα ποσοστά πράσινου φθορισμού καθ' όλη την διάρκεια έκθεσης στην καταπόνηση. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την επαγωγή της κατάστασης VBNC.



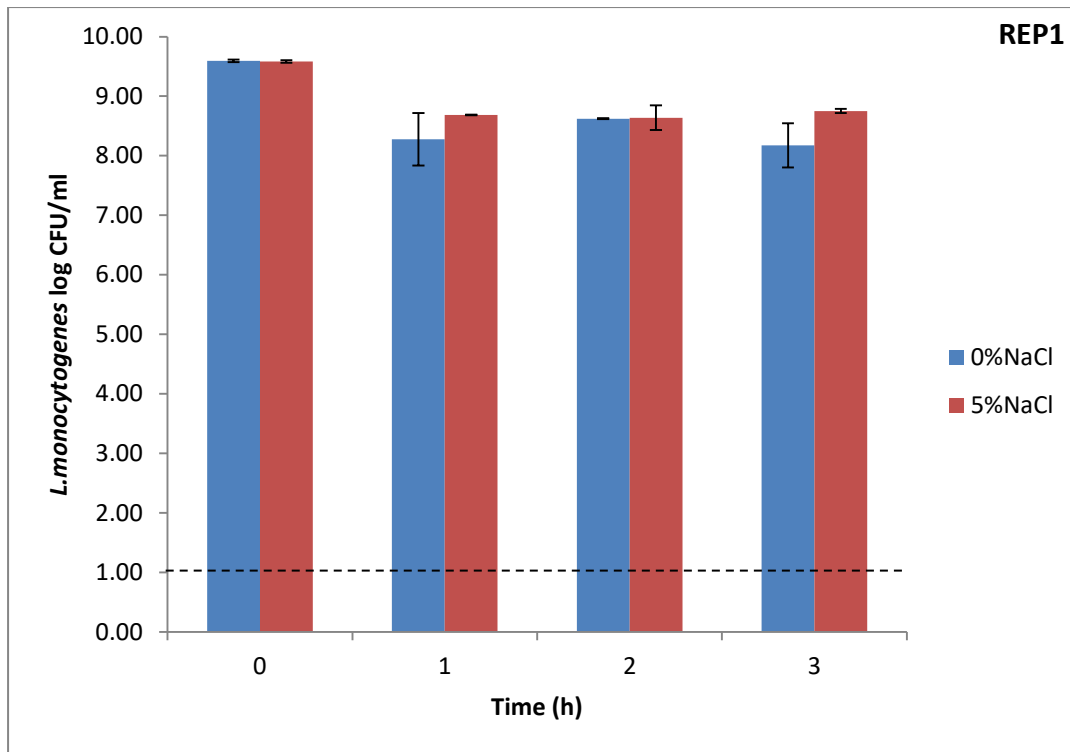
Σχήμα 10 Αποτελέσματα απαρίθμησης των διαφορετικών χρώσεων κυττάρων του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (%κυττάρων ανά οπτικό πεδίο), στέλεχος Scott A, ύστερα από επώαση για 120 λεπτά στους 20°C σε διάλυμα Ringer με 20ppm του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA). Για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας αποτυπώθηκαν 4 διαφορετικά οπτικά πεδία. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν τις τυπικές αποκλίσεις. Τα διαγράμματα a και b αντιστοιχούν σε 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.



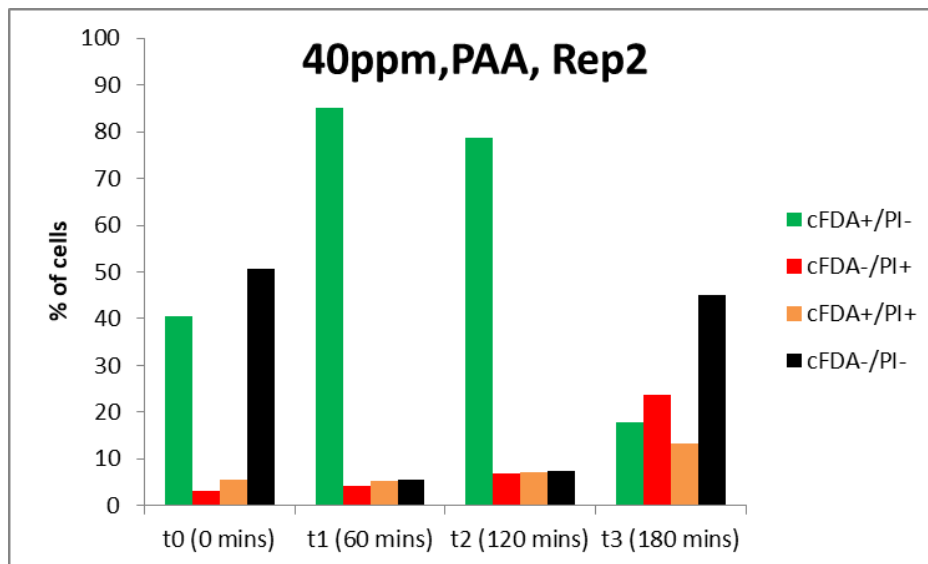
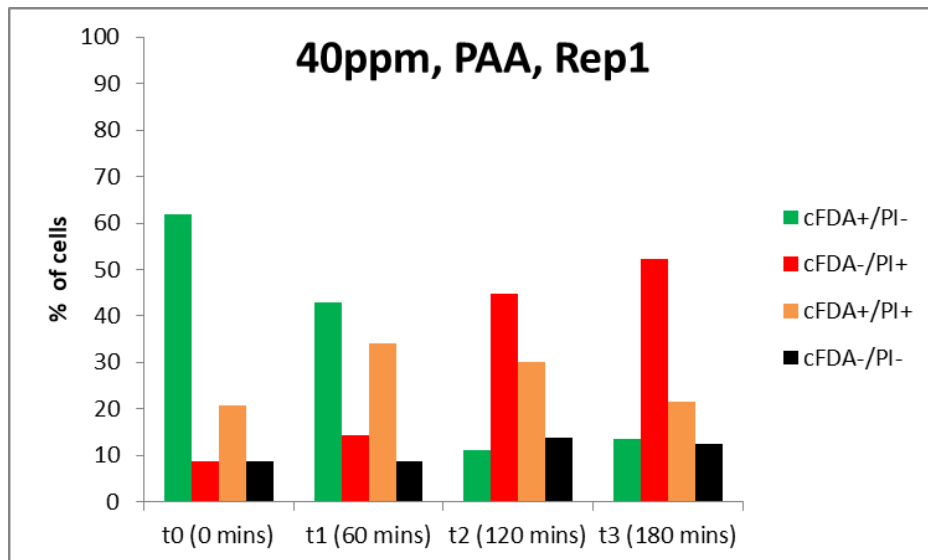
Σχήμα 11 Αξιολόγηση της καλλιεργησιμότητας του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος Scott A, ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3 και 4 στους 20°C σε διάλυμα Ringer με 20ppm του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA). Ο πληθυσμός του στελέχους Scott A καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Ye με 0% NaCl (μπλε ράβδοι), και για 5 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Ye με 5% NaCl (κόκκινες ράβδοι). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το όριο καταμέτρησης της μεθόδου (ο.κ.= 10 CFU / ml). Τα διαγράμματα αντιστοιχούν σε 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.



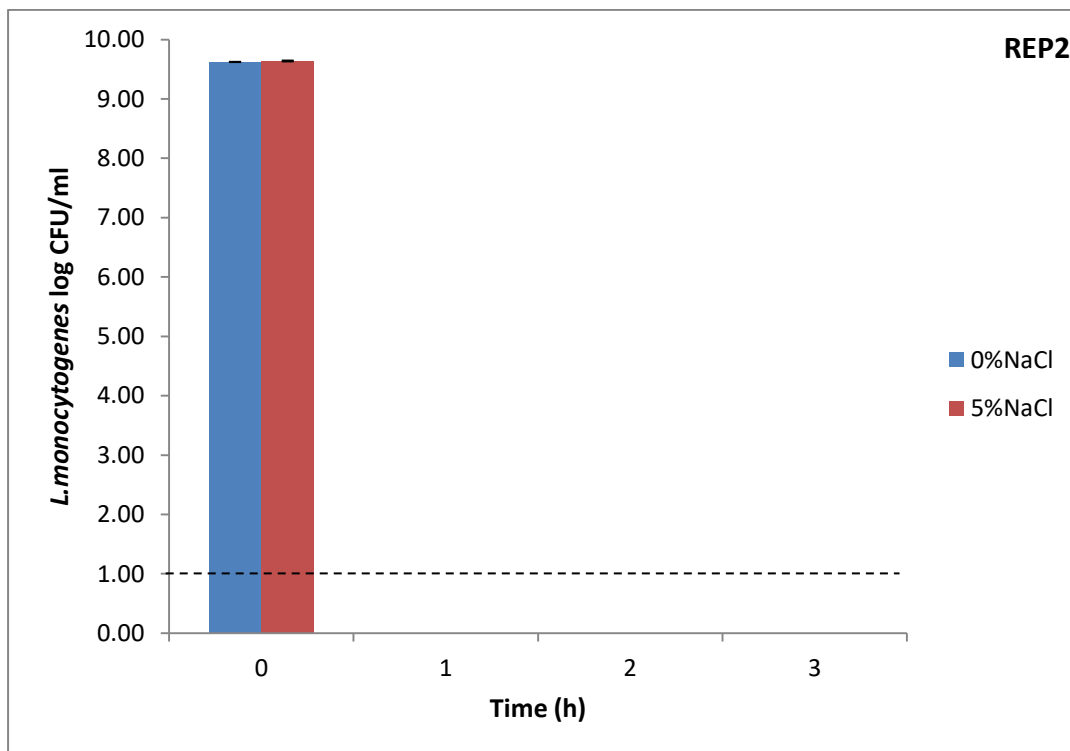
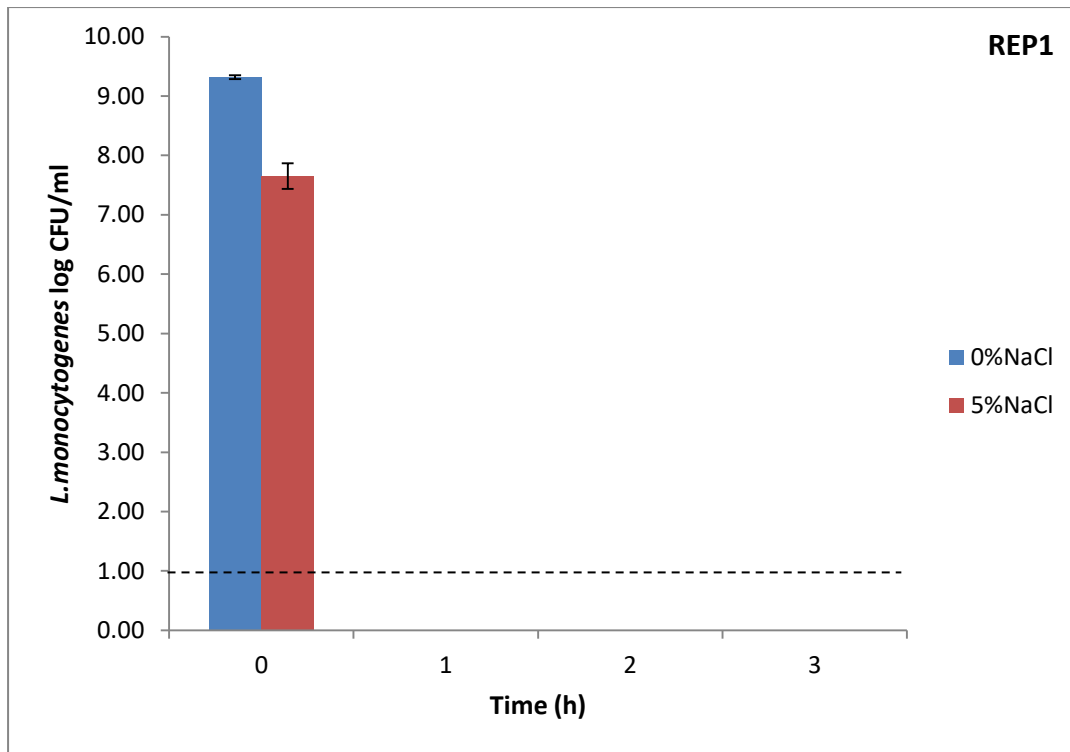
Σχήμα 12 Αποτελέσματα απαρίθμησης των διαφορετικών χρώσεων κυττάρων του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (%κυττάρων ανά οπτικό πεδίο), στέλεχος Scott A, ύστερα από επώαση για 180 λεπτά στους 20°C σε διάλυμα Ringer με 30ppm του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA). Για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας αποτυπώθηκαν 4 διαφορετικά οπτικά πεδία. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν τις τυπικές αποκλίσεις.



Σχήμα 13 Αξιολόγηση της καλλιεργησιμότητας του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος Scott A, ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3 και 4 στους 20°C σε διάλυμα Ringer με 30ppm του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA). Ο πληθυσμός του στελέχους Scott A καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Ye με 0% NaCl (μπλε ράβδοι), και για 5 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Ye με 5% NaCl (κόκκινες ράβδοι). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το όριο καταμέτρησης της μεθόδου (ο.κ.= 10 CFU / ml).

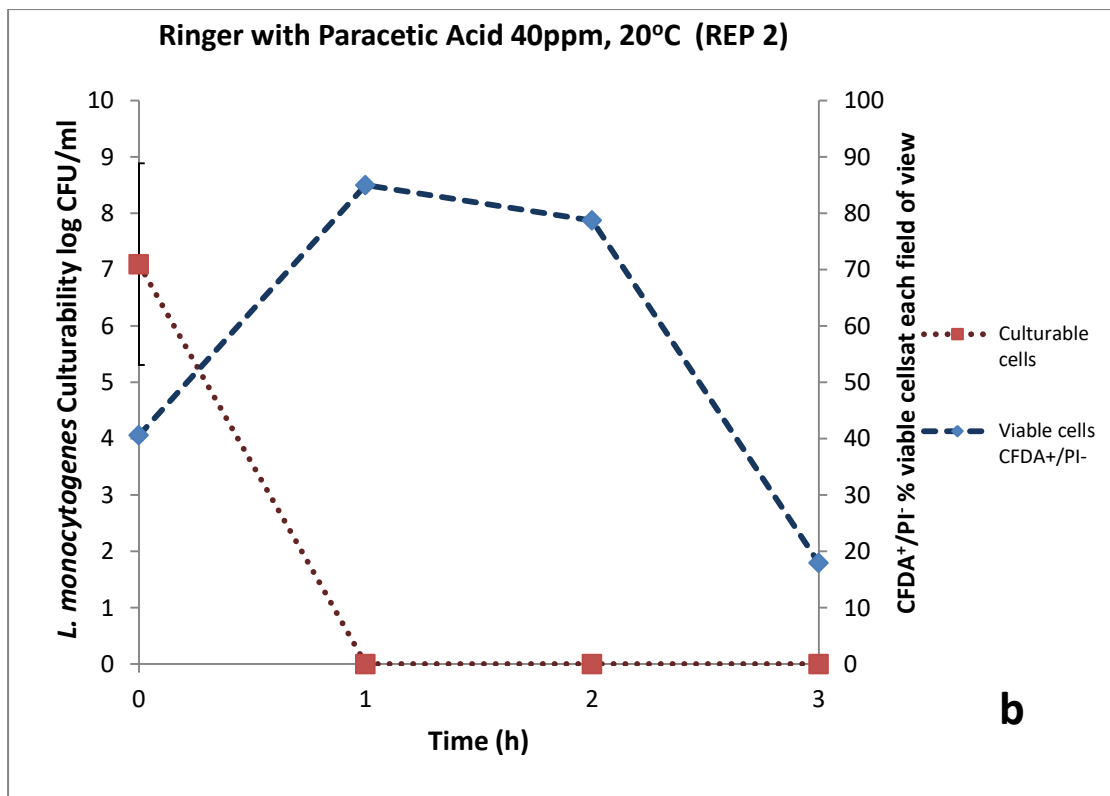
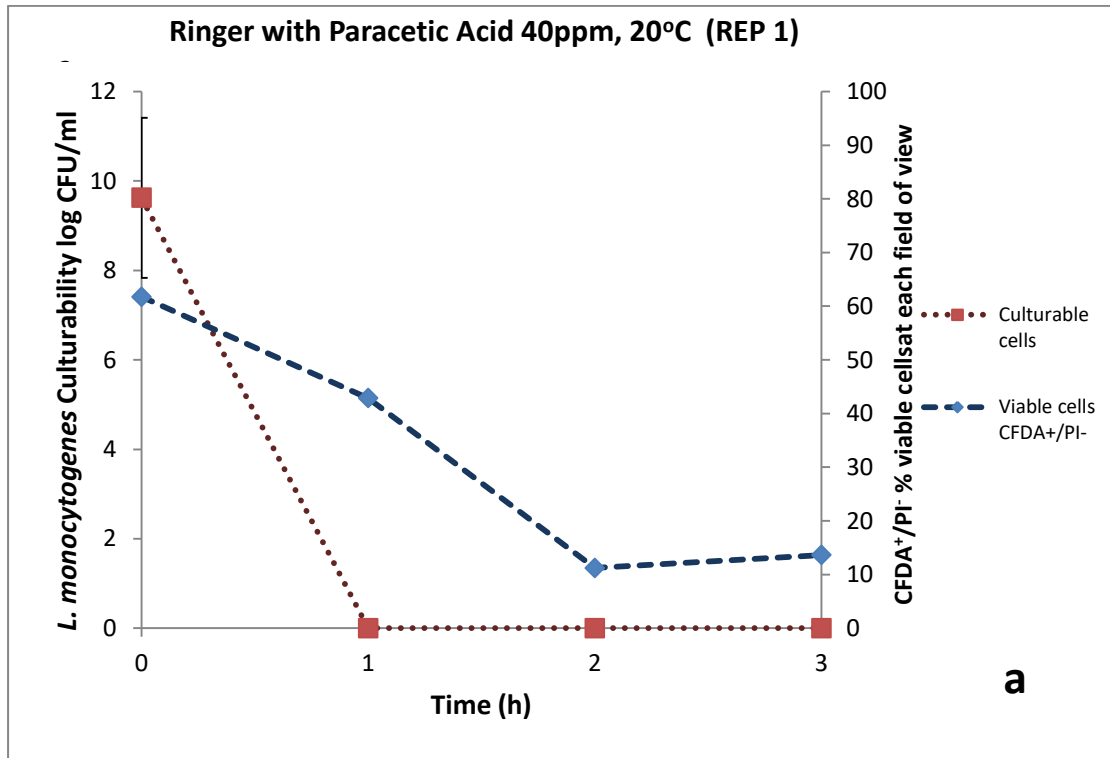


Σχήμα 14 Αποτελέσματα απαρίθμησης των διαφορετικών χρώσεων κυττάρων του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (%κυττάρων ανά οπτικό πεδίο), στέλεχος Scott A, ύστερα από επώαση για 180 λεπτά στους 20°C σε διάλυμα Ringer με 40ppm του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA). Για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας αποτυπώθηκαν 4 διαφορετικά οπτικά πεδία. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν τις τυπικές αποκλίσεις. Τα διαγράμματα a και b αντιστοιχούν σε 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.



Σχήμα 15 Αξιολόγηση της καλλιεργησιμότητας του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος Scott A, ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3 και 4 στους 20°C σε διάλυμα Ringer με 40ppm του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA). Ο πληθυσμός του στελέχους Scott A καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Ye με 0% NaCl (μπλε ράβδοι), και για 5 ημέρες στους 37 °C, σε TSA-Ye με 5% NaCl (κόκκινες ράβδοι). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το όριο καταμέτρησης της μεθόδου

(ο.κ.= 10 CFU / ml). Τα διαγράμματα αντιστοιχούν σε 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις

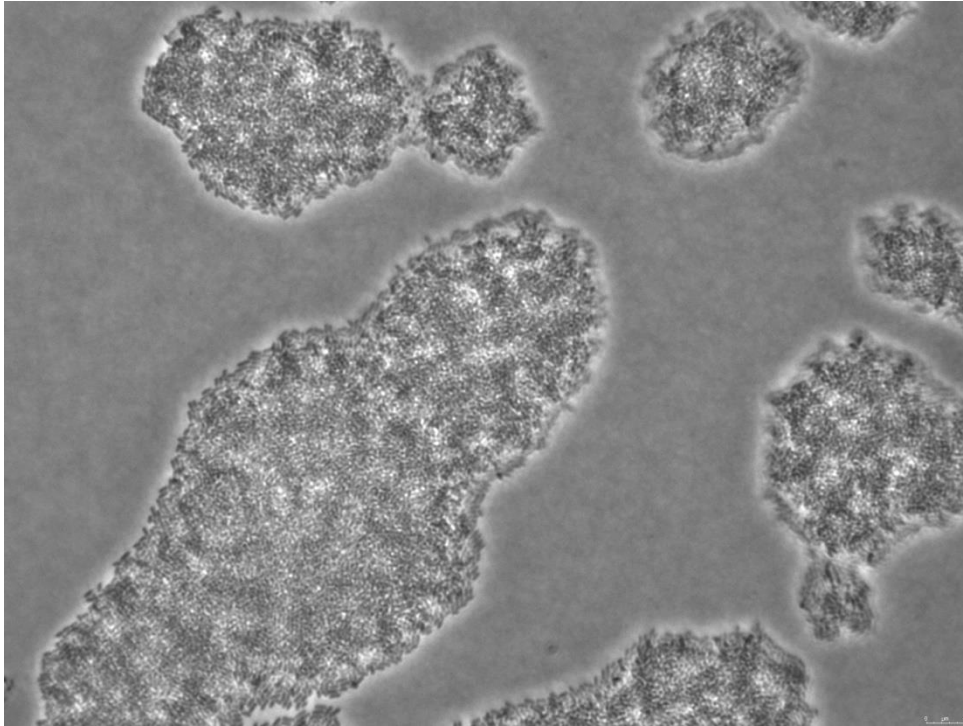


Σχήμα 16 Αποτύπωση της διαφοράς μεταξύ των ζωντανών (CFDA⁺/PI⁻) και των καλλιεργήσιμων κυττάρων του μικροοργανισμού *L.monocytogenes*, στέλεχος Scott A, ύστερα

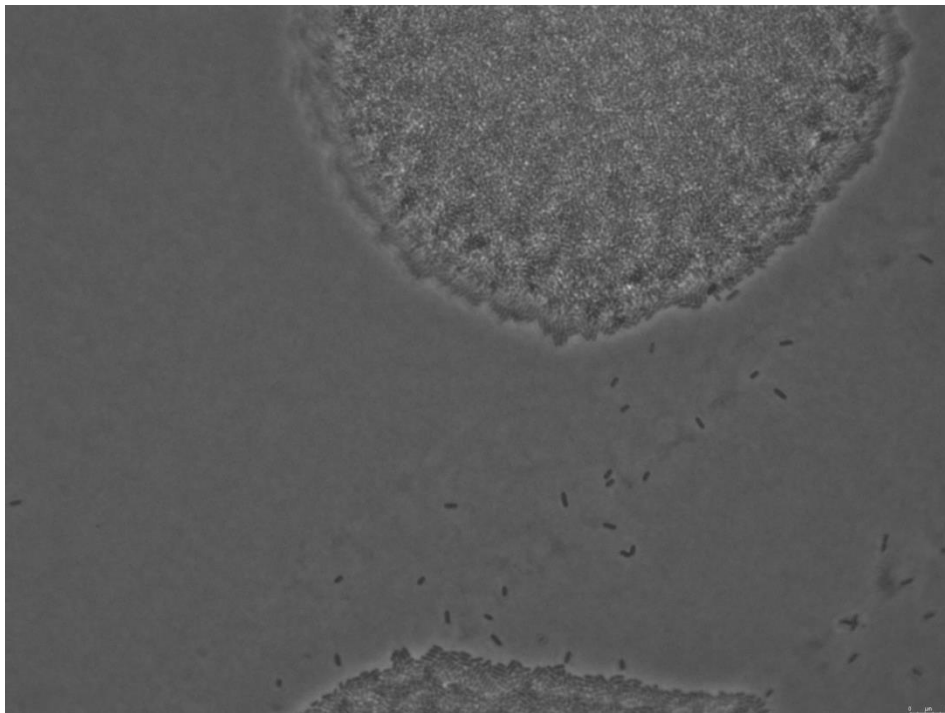
από επώαση για 180 λεπτά στους 20°C σε διάλυμα Ringer με 40ppm του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA). Τα διαγράμματα α και β παρουσιάζουν δύο ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις, αντίστοιχα.

Αξιολόγηση της ικανότητας ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων σε άγαρ ύστερα από έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (20ppm, 30ppm, 40ppm) του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA) στους 37°C

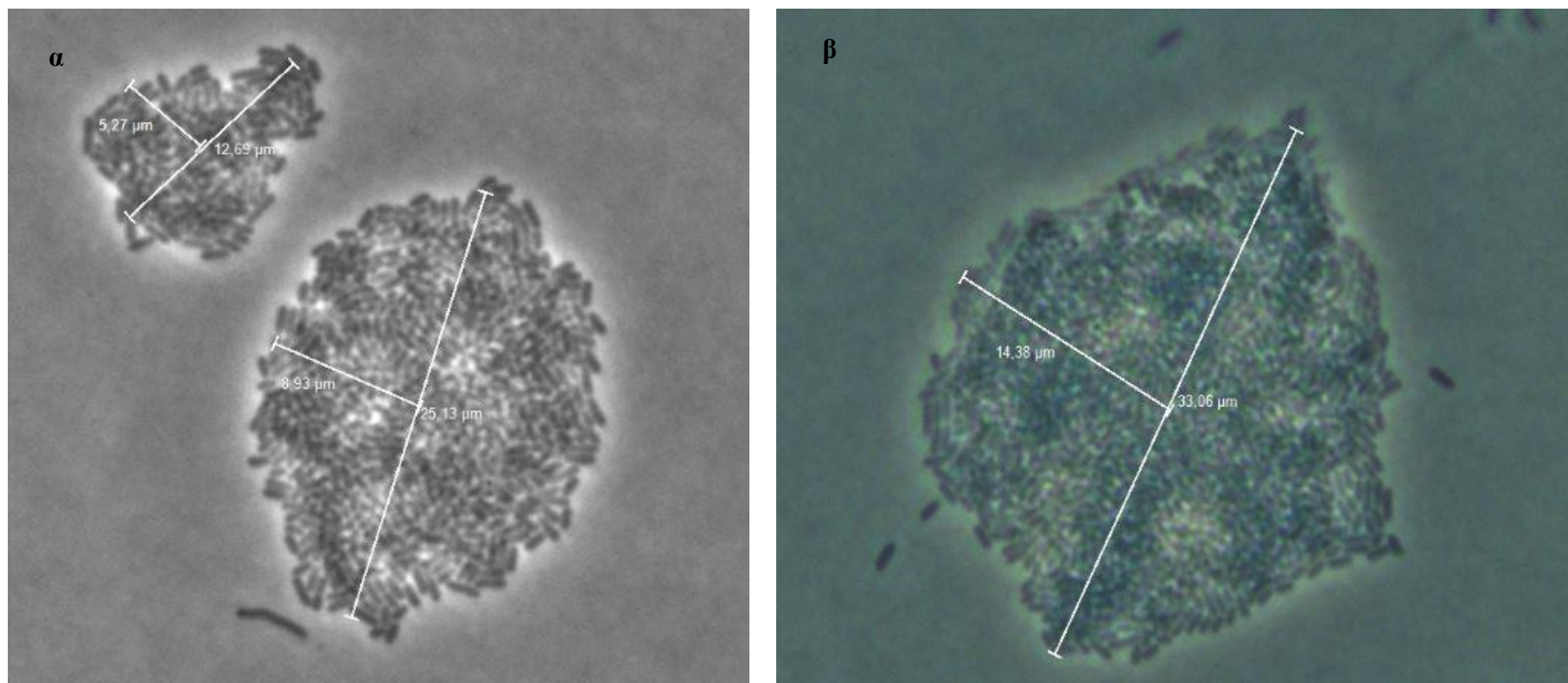
Η ικανότητα ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων έγινε με την χρήση βιντεομικροσκοπίας, Η παρακολούθηση των κυττάρων μας έδωσε την δυνατότητα αξιολόγησης σε πραγματικό χρόνο του χρόνου γενεάς, ύστερα από την έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (20ppm, 30ppm, 40ppm) του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ύστερα από την έκθεση σε 40ppm του απολυμαντικού δεν παρατηρείται ικανότητα ανάκαμψης των κυττάρων, καθώς τα κύτταρα παραμένουν μεμονωμένα κι αδιαίρετα καθ' όλη την παραμονή τους στο TSAYe. Υστερά από έκθεση σε 20 και 30 ppm PAA ο χρόνος γενεάς φαίνεται ότι επιμηκώνεται (150 ± 30 λεπτά) συγκριτικά με μη καταπονημένα κύτταρα, που λειτουργούν ως μάρτυρες (40 ± 15 λεπτά). Εικόνες μικροσκοπίας μετά από 18 ώρες παρακολούθησης, δείχνουν διακύμανση της δυνατότητας ανάκαμψης των κύτταρων που έχουν εκτεθεί σε 30ppm PAA αποτυπώνοντας μεμονωμένα κύτταρα, που δεν έχουν διαιρεθεί, ανάμεσα σε μικρο-αποικίες με μεταβλητούς αριθμούς κυττάρων (**Εικόνα 8,9**). Στην **Εικόνα 10**, αποτυπώνεται το διαφορετικό μέγεθος των μικρο-αποικιών του *L. monocytogenes*, στέλεχος Scott A, που έχουν εκτεθεί για 3 ώρες σε Ringer με 20ppm (α) και 30ppm (β) PAA, στους 20°C, μετά από 18 ώρες παραμονής τους σε TSAYe, στους 37°C. Στην **Εικόνα 10 (α)**, παρατηρείται ο σχηματισμός δύο μικρο-αποικιών διαμέτρου 25,13 και 12,69 μm, αντίστοιχα. Στην **Εικόνα 10 (β)** φαίνεται ότι μετά από 18 ώρες παραμονής στο άγαρ, στους 37°C έχει σχηματιστεί μία αποικία διαμέτρου 33,06 μm. Τέλος, στην **Εικόνα 8** παρατηρείται η σταδιακή ανάκαμψη των κυττάρων ύστερα από επώαση για 3 ώρες σε Ringer με 30ppm PAA, στους 20°C, τη μηδενική στιγμή (α), μετά από 1ώρα και 34 λεπτά (β), μετά από 3 ώρες και 34 λεπτά (γ) και μετά από 4 ώρες και 47 λεπτά (δ) παραμονής τους σε TSAYe, στους 37°C.



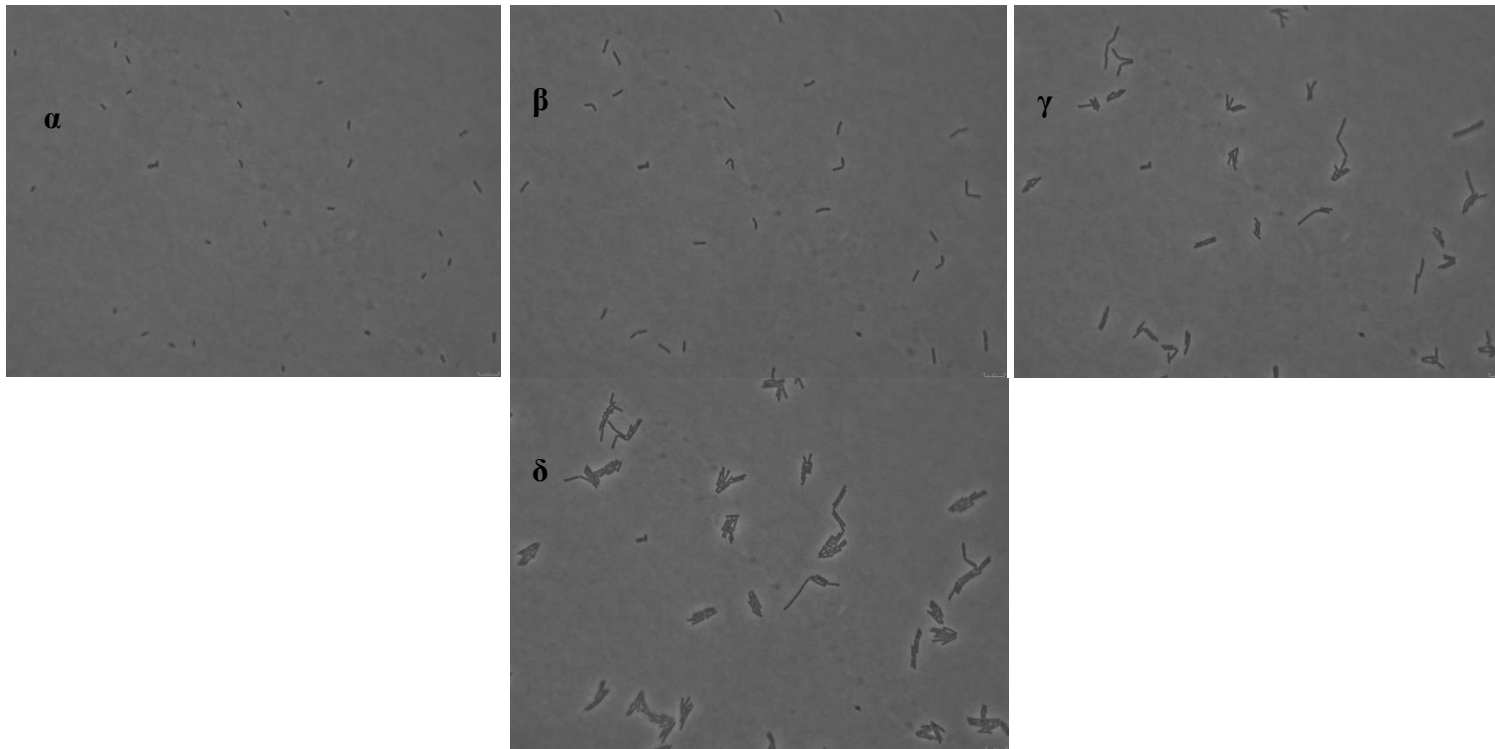
Εικόνα 9 Αποτύπωση ανάκαμψης κυττάρων *L. monocytogenes*, στέλεχος Scott A, που έχουν εκτεθεί για 3 ώρες σε Ringer με 20ppm PAA, στους 20°C μετά από 18 ώρες παραμονής τους σε TSAYE , στους 37°C.



Εικόνα 10 Αποτύπωση ανάκαμψης κυττάρων *L. monocytogenes*, στέλεχος Scott A, που έχουν εκτεθεί για 3 ώρες σε Ringer με 30 ppm PAA, στους 20°C μετά από 18 ώρες παραμονής τους σε TSAYE , στους 37°C.



Εικόνα 11 Αποτύπωση του μεγέθους των μικρο-αποικιών του *L. monocytogenes*, στέλεχος Scott A, που έχουν εκτεθεί για 3 ώρες σε Ringer με 20ppm (α) και 30ppm (β) PAA, στους 20°C, μετά από 18 ώρες παραμονής τους σε TSAYE, στους 37°C.



Εικόνα 12 Αποτύπωση της σταδιακής ανάκαμψης κυττάρων του *L. monocytogenes*, στέλεχος Scott A, ύστερα από επώαση για 3 ώρες σε Ringer με 30ppm PAA, στους 20°C, τη μηδενική στιγμή (α), μετά από 1ώρα και 34 λεπτά (β), μετά από 3 ώρες και 34 λεπτά (γ) και μετά από 4 ώρες και 47 λεπτά (δ) παραμονής τους σε TSAYE, στους 37°C.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι μικροοργανισμοί στο φυσικό περιβάλλον, δεδομένης της αστάθειας των περιβαλλοντικών συνθηκών, οφείλουν να αναπτύξουν στρατηγικές επιβίωσης προκειμένου να ανταπεξέλθουν. Για να επιτευχθεί αυτό πολλά βακτήρια εισέρχονται σε μία μεταβατική κατάσταση ληθάργου, που χαρακτηρίζεται από μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης και μεταβολικής δραστηριότητας. Ωστόσο, η απόκριση των μεμονωμένων κυττάρων ενός μικροβιακού πληθυσμού σε μία καταπόνηση ενδέχεται να είναι ετερογενής. Ένα μέρος των κυττάρων μπορεί να θανατωθεί, ένα άλλο θα υποστεί βλάβη και ορισμένα κύτταρα μπορεί να μην παρουσιάζουν καμία ανιχνεύσιμη φαινοτυπική αλλαγή (Karpelyants, A. S et al., 1993). Συνδυαστικά, τα παραπάνω δεδομένα οδήγησαν στην ανάγκη: (i) διερεύνησης των συνθηκών επαγωγής, σε επίπεδο πληθυσμού αλλά και ενός κυττάρου, της κατάστασης Ζώντα αλλά Μη Καλλιεργήσιμα στον μικροοργανισμό *L.monocytogenes*, (ii) περιγραφής της κατανομής των καλλιεργήσιμων, VBNC και νεκρών κυττάρων κατά την έκθεση σε συνθήκες καταπόνησης και (iii) παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο της ικανότητας ανάκαμψης αυτών των κυττάρων.

Για να επιτευχθεί αυτό, κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* εκτέθηκαν σε υδροχλωρικό οξύ (pH 2.5), οξικό οξύ (pH 3) και στο απολυμαντικό Paracetic Acid (10, 20, 30 και 40ppm) στους 20°C και στους 4°C. Από τις παραπάνω συνθήκες καταπόνησης, κατά την έκθεση στο απολυμαντικό Paracetic Acid παρατηρήθηκε υψηλότερο επίπεδο υποθανάτιου τραυματισμού. Έτσι, η συγκεκριμένη καταπόνηση επιλέχθηκε ως πιθανή συνθήκη επαγωγής της κατάστασης VBNC. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την αρχική υπόθεση, καθώς επώαση των κυττάρων σε Ringer με 40ppm PAA, για 3 ώρες, στους 20°C απέδειξε ότι τα κύτταρα χάνουν την καλλιεργησιμότητά τους ήδη από την πρώτη ώρα επώασης, ενώ ταυτόχρονα, διατηρούν την ζωτικότητα τους, παρουσιάζοντας μετρήσιμα ποσοστά πράσινου φθορισμού. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την επαγωγή της κατάστασης VBNC.

Πιο αναλυτικά, από τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση υδροχλωρικού οξέος (pH 2.5) σε θερμοκρασία 20°C φαίνεται ότι η καταπόνηση επιδρά με τον ίδιο τρόπο στον συνολικό πληθυσμό και

των δύο στελεχών, EGDe και Scott A, μειώνοντάς τον κατά περίπου 4 log CFU/ml μετά από 4 ώρες επώασης. Όσον αφορά την έκθεση του στελέχους Scott A στην ίδια καταπόνηση (Ringer, pH 2.5, HCl, 20 °C) φαίνεται ότι την 5^η ώρα επώασης υπήρξε σημαντική μείωση του ανθεκτικού υποπληθυσμού, συγκριτικά με τον συνολικό πληθυσμό, υποδεικνύοντας αυξημένο τραυματισμό (**Σχήμα 1**).

Κατά την έκθεση των κυττάρων σε οξικό οξύ (pH 3) σε θερμοκρασία 20 °C παρατηρείται παραλλακτικότητα μεταξύ των δύο στελεχών *L. monocytogenes*. Στην συγκεκριμένη μελέτη, το στέλεχος EGDe παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία στις συγκεκριμένες συνθήκες καταπόνησης, συγκριτικά με το Scott A, αφού ήδη έπειτα από την 3^η ώρα επώασης παρατηρείται τραυματισμός και στην συνέχεια πλήρης θανάτωση. Αντίθετα, το στέλεχος Scott A φαίνεται να ανθίσταται στην καταπόνηση παρουσιάζοντας εμφανή υποθανάτιο τραυματισμό κατά την 4^η και 5^η ώρα επώασης και όχι πλήρη θανάτωση (**Σχήμα 2**). Στοιχεία από παλαιότερες έρευνες, επιβεβαιώνουν τα παραπάνω αποτελέσματα, υποδεικνύοντας ότι διαφορετικά στελέχη του *L. monocytogenes* παρουσιάζουν διαφορά στην αντοχή τους στη θερμική και στην όξινη καταπόνηση (Mackey *et al.*, 1990) (Faleiro, Andrew and Power, 2003) (Francis and O'Beirne, 2005) (Lianou *et al.*, 2006).

Η θερμοκρασία επώασης των 20°C αποδείχθηκε ότι καταπονεί περισσότερο τα κύτταρα όταν εκτίθενται σε Ringer, οξικό οξύ, pH 3, απ' ότι η θερμοκρασία των 4°C, γεγονός που επιβεβαιώνεται και για τα δυο στελέχη. Στο Σχήμα 5 είναι ευδιάκριτο ότι ο συνολικός πληθυσμός του στελέχους EGDe παραμένει βιώσιμος έως την 5^η ώρα έκθεσης και μειώνεται περίπου 3 log CFU/ml συγκριτικά με την μηδενική στιγμή. Ο πληθυσμός του στελέχους Scott A παραμένει σχεδόν σταθερός καθ' όλη την διάρκεια της επώασης, στους 4 °C (**Σχήμα 3**). Αντίστοιχα, οι Normah Ahamad και Elmer H. Marth, το 1990 (Ahamad and Marth, 1990) παρατήρησαν ότι η επώαση κυττάρων *L. monocytogenes* στους 13°C δεν προκαλεί σημαντική αύξηση της θανάτωσης ή του τραυματισμού λόγω όξινης καταπόνησης συγκριτικά με την επώαση στους 35°C και ότι οι τραυματισμένοι όσο και οι μη τραυματισμένοι οργανισμοί παραμένουν βιώσιμοι για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα στη χαμηλή θερμοκρασία (περίπου εννέα φορές περισσότερο στους 13 °C από τους 35 °C).

Προηγούμενες ερευνητικές μελέτες του εργαστηρίου αποδείκνυαν υψηλό επίπεδο υποθανάτιου τραυματισμού, ειδικά για το στέλεχος EGDe, κατά την έκθεση σε 5rpm PAA, για 90 λεπτά, στους 20°C. Έτσι, εκτός από την όξινη καταπόνηση τα δύο

στελέχη, Scott A και EGDe, εκτέθηκαν και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του απολυμαντικού PAA. Η αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού συνεχίστηκε με έκθεση των κυττάρων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (10, 20 και 30 ppm) του απολυμαντικού PAA, στους 20°C. Όντως, αποδείχθηκε ότι αυξανόμενης της έντασης της καταπόνησης αυξάνεται το ποσοστό του υποθανάτιου τραυματισμού και για τα δύο στελέχη, παρουσιάζοντας πλήρη θανάτωση ήδη από τα πρώτα 15 λεπτά επώασης σε διάλυμα καταπόνησης 30ppm PAA (**Σχήματα 4, 5, 6**). Φαίνεται ότι η θερμοκρασία επώασης επηρεάζει την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στην καταπόνηση, αφού κατά την έκθεση του στελέχους Scott A σε διάλυμα 10, 20 και 30ppm PAA στους 4°C (**Σχήματα 7, 8, 9**), ο συνολικός πληθυσμός παραμένει αρκετά υψηλός ύστερα από 90 λεπτά επώασης, παρουσιάζοντας τραυματισμό ύστερα από 60 λεπτά.

Ύστερα από τις παραπάνω δοκιμές διαλογής συνθηκών που επάγουν τον υποθανάτιο τραυματισμό, ακολούθησαν πειράματα με σκοπό την τυποποίηση ενός πειραματικού πρωτοκόλλου για την χρήση του Μικροσκοπίου Φθορισμού. Τεχνικές λεπτομέρειες όπως η έκθεση στη καταπόνηση ενός επιπέδου πληθυσμού που παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης παρατήρησης ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων στο Μικροσκόπιο Φθορισμού, λειτούργησαν παρεμποδιστικά. Ως βέλτιστη λύση αποδείχθηκε η συμπύκνωση του αρχικού εμβολίου σε 3ml διαλύματος καταπόνησης, προκειμένου ο πληθυσμός που καταπονείται να επιτρέπει παράλληλα την παρατήρηση ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων ανά οπτικό πεδίο στο Μικροσκόπιο Φθορισμού. Το γεγονός αυτό υπήρξε καθοριστικής σημασίας καθώς ο αριθμός των κυττάρων ανά οπτικό πεδίο και τα πολλαπλά οπτικά πεδία συνολικά, επρόκειτο να αναλυθούν στατιστικά, μέσω αλγορίθμων.

Όσον αφορά την εκτίμηση της ικανότητας επαγωγής της κατάστασης Ζώντα αλλά μη Καλλιεργήσιμα (Viable But Non Culturable, VBNC state) χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις (20ppm, 30ppm, 40ppm) του απολυμαντικού Paracetic Acid (PAA) σε θερμοκρασία καταπόνησης 20°C. Προκειμένου να ανιχνευθεί η επαγωγή της κατάστασης VBNC τα αποτελέσματα του φθορισμού αξιολογήθηκαν σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη εκτίμηση διατήρησης της καλλιεργησιμότητας των κυττάρων. Το πιο σημαντικό εύρημα στις συγκεκριμένες συνθήκες καταπόνησης είναι ότι τα κύτταρα χάνουν την καλλιεργησιμότητά τους ήδη από την πρώτη ώρα έκθεσης στα 40ppm του απολυμαντικού. Ταυτόχρονα, ωστόσο διατηρούν την

ζωτικότητα τους, παρουσιάζοντας μετρήσιμα ποσοστά πράσινου φθορισμού καθ' όλη την διάρκεια έκθεσης στην καταπόνηση. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την επαγωγή της κατάστασης VBNC. Επιπρόσθετα, όπως φαίνεται από τα **Σχήματα 12** και **14**, κατά την έκθεση σε 30 και 40 ppm PAA, το ποσοστό των CFDA+/PI+ κυττάρων είναι σημαντικό, υποδεικνύοντας μία ενδιάμεση κατάσταση τραυματισμού, κι επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη μίας συνεχούς μεταβατικής κατάστασης ληθάργου (dormancy continuum) (Ayrapetyan, Williams and Oliver, 2015).

Το ποσοστό των άβαφων κυττάρων φαίνεται ιδιαίτερα υψηλό κατά την έκθεση σε 20ppm PAA (**Σχήμα 10**). Μία υπόθεση μπορεί να είναι ότι στον συγκεκριμένο υποπληθυσμό κυττάρων η καταπόνηση επιδρά στην λειτουργία των εστερασών, μειώνοντας τη μεταβολική τους δραστηριότητα, χωρίς ωστόσο να διαρρηγνύεται η κυτταρική μεμβράνη. Έτσι, ο συγκεκριμένος υποπληθυσμός παραμένει CFDA-/PI-. Σύμφωνα με την Christine Bunthof συν. υπ. (Bunthof *et al.*, 2000) τα επισημασμένα με CFDA κύτταρα του θετικού κατά gram *Lactococcus lactis* εξωθούν γρήγορα το cF ύστερα από προσθήκη λακτόζης. Δεδομένου ότι τα κύτταρα ως αποτέλεσμα της προσθήκης λακτόζης παράγουν ATP, προτείνεται ότι η εξώθηση πιθανότατα προκαλείται από ένα σύστημα μεταφοράς με κατανάλωση ATP. Παρόμοιος μηχανισμός εξώθησης προτείνεται από τον Molenaar για το 2,9-bis-(2-carboxyethyl)-carboxyfluorescein (BCECF) (Molenaar *et al.*, 1992).

Τα δεδομένα της ανάκαμψης υποδεικνύουν ότι ύστερα από έκθεση σε 20 και 30 ppm PAA ο χρόνος γενεάς φαίνεται ότι επιμηκύνεται (150 ± 30 λεπτά) συγκριτικά με μη καταπονημένα κύτταρα (40 ± 15 λεπτά). Αποτύπωση εικόνων μετά από 18 ώρες παρακολούθησης, δείχνουν διακύμανση της δυνατότητας ανάκαμψης των κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε 30ppm PAA (**Εικόνα 9**). Στην **Εικόνα 10**, αποτυπώνεται το διαφορετικό μέγεθος των μικρο-αποικιών του *L. monocytogenes*, στέλεχος Scott A, που έχουν εκτεθεί για 3 ώρες σε Ringer με 20ppm (α) και 30ppm (β) PAA, στους 20°C, μετά από 18 ώρες παραμονής τους σε TSAYE, στους 37°C. Στην **Εικόνα 10 (α)**, παρατηρείται ο σχηματισμός δύο μικρο-αποικιών διαμέτρου 25,13 και 12,69 μm, αντίστοιχα. Στην **Εικόνα 10 (β)** φαίνεται ότι μετά από 18 ώρες παραμονής στο άγαρ, στους 37°C έχει σχηματιστεί μία αποικία διαμέτρου 33,06 μm. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την στοχαστικότητα του φαινομένου και ταυτόχρονα την ετερογένεια απόκρισης στην καταπόνηση και στην ανάκαμψη, των μεμονωμένων κυττάρων. Τέλος, στην **Εικόνα 13** παρατηρείται η σταδιακή ανάκαμψη των κυττάρων ύστερα

από επώαση για 3 ώρες σε Ringer με 30ppm PAA, στους 20°C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων στο οπτικό πεδίο τη μηδενική στιγμή (α), μετά από 1 ώρα και 34 λεπτά (β), μετά από 3 ώρες και 34 λεπτά (γ) και μετά από 4 ώρες και 47 λεπτά (δ) παραμονής τους σε TSAYE, στους 37°C.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι μεμονωμένα κύτταρα παρουσιάζουν ετερογένεια στον τρόπο αντιμετώπισης του στρες στο ίδιο περιβάλλον (Lianou et al., 2006, Métris et al., 2008, Muñoz-Cuevas et al., 2013). Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχουν εκτεταμένες διακυμάνσεις στην συμπεριφορά ανάπτυξης, στην επιβίωση, στο χρόνο υστέρησης (lag time) και στο μέγιστο ρυθμό αύξησης ύστερα από έκθεση δύο διαφορετικών στελεχών του *Lactobacillus brevis* στο απολυμαντικό PAA. Αυτή η βιολογική μεταβλητότητα μπορεί να οφείλεται στη γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των στελεχών, αλλά οι μεγάλες διακυμάνσεις στο λ και μ_{max} των HF01 και JK09, ειδικά μετά από έκθεση σε PAA, είναι μια φαινοτυπική ποικιλομορφία που δεν μπορεί να εξηγηθεί πλήρως από την παρουσία γονιδίων, καθώς όλα τα μεμονωμένα κύτταρα ενός στελέχους μπορούν να θεωρηθούν ως ένας κλώνος (Zhao, Knöchel and Siegmundfeldt, 2014).

Η καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας των μικροβιακών κοινοτήτων αποτελεί ένα δύσκολο και κρίσιμο ζήτημα στον τομέα της μικροβιολογίας τροφίμων, καθώς αποτελεί προϋπόθεση για τη κατανόηση της λειτουργίας του μικροβιακού πληθυσμού, καθώς και για τον καλύτερο έλεγχο της μόλυνσης των τροφίμων από παθογόνα. Η ετερογένεια εμφανίζεται ως εγγενές χαρακτηριστικό των μικροβιακών πληθυσμών και αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τις ωφέλιμες ή επιζήμιες λειτουργικές ιδιότητές τους. Η κατανόηση του μοριακού και κυτταρικού μηχανισμού πίσω από τη συμπεριφορά των βακτηρίων στις μικροβιακές κοινότητες απαιτεί παρατηρήσεις στο επίπεδο ενός κυττάρου, προκειμένου να ξεπεραστούν τα αποτελέσματα "μέσης τιμής" που ενυπάρχουν στις παραδοσιακές παγκόσμιες προσεγγίσεις. Οι πρόσφατες εξελίξεις στην ανάπτυξη φθορισμομετρικών τεχνικών για την μελέτη σε επίπεδο ενός κυττάρου παρέχουν λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη δομή των κυττάρων, τη μεταβολική δραστηριότητα και τις βακτηριακές αλληλεπιδράσεις (Bridier et al., 2015).

Σημαντική κρίνεται η συνεισφορά της συγκεκριμένης μελέτης στην αναγνώριση και την καλύτερη κατανόηση των κινδύνων που ενέχει ο υποθανάτιος τραυματισμός και η συνεχής μεταβατική κατάσταση ληθάργου για την ασφάλεια τροφίμων. Η

ενδεχόμενη κατανάλωση τροφίμων που εμπεριέχουν κύτταρα σε κατάσταση ληθάργου αποτελεί σημαντική απειλή, αφού τα κύτταρα εφόσον βρεθούν σε ευνοϊκές συνθήκες μπορούν να ανακάμψουν διατηρώντας την μολυσματικότητά τους. Επιπρόσθετα, η εύρεση συνδυαστικών, γρήγορων μεθόδων ανίχνευσης της κατάστασης VBNC συμβάλλει στην πιστοποίηση της ασφάλειας των τροφίμων, προσφέροντας νέα δεδομένα στη Βιομηχανία, δεδομένου ότι οι κλασσικές μέθοδοι μικροβιολογίας είναι ανεπαρκείς.

Εκτός από την φαινοτυπική και μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων, η αποκρυπτογράφηση των μοριακών μηχανισμών που συμμετέχουν στην επαγωγή της κατάστασης VBNC κρίνεται απαραίτητη μελλοντικά. Σε επόμενο στάδιο, ιδιαίτερη συνεισφορά θα είχε ο εντοπισμός μοριακών δεικτών που θα σηματοδοτούν την επαγωγή της κατάστασης δίνοντας στην Βιομηχανία Τροφίμων την δυνατότητα ταχείας ανίχνευσης των VBNC κυττάρων, αποτρέποντας την πιθανή αποδέσμευση στην αγορά τροφίμων που εμπεριέχουν κύτταρα σε κατάσταση ληθάργου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahamad, N. and Marth, E. H. (1990) 'Acid-injury of *Listeria monocytogenes*', *Journal of Food Protection*, 53(1), pp. 26–29. doi: 10.4315/0362-028X-53.1.26.
- Amato, S. M., Orman, M. A. and Brynildsen, M. P. (2013) 'Metabolic Control of Persister Formation in *Escherichia coli*', *Molecular Cell*, 50(4), pp. 475–487. doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.002.
- Ayrapetyan, M., Williams, T. C. and Oliver, J. D. (2015) 'Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 7–13. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.004.
- Balomenos, A. D. *et al.* (2017) 'Image analysis driven single-cell analytics for systems microbiology', *BMC Systems Biology*. BMC Systems Biology, 11(1), pp. 1–21. doi: 10.1186/s12918-017-0399-z.
- Bernier, S. P. *et al.* (2013) 'Starvation, Together with the SOS Response, Mediates High Biofilm-Specific Tolerance to the Fluoroquinolone Ofloxacin', *PLoS Genetics*, 9(1). doi: 10.1371/journal.pgen.1003144.
- Bridier, A. *et al.* (2015) 'Fluorescence-based tools for single-cell approaches in food microbiology', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 213, pp. 2–16. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.003.
- Bunthof, C. J. *et al.* (2000) 'Fluorescence assessment of *Lactococcus lactis* viability', *International Journal of Food Microbiology*, 55(1–3), pp. 291–294. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00170-7.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* (no date). Available at: <http://www.cdc.gov/listeria/index.html>.
- Cotoni, L. (1942) 'A propos des bacteries denommees *Listerella*—rappel d'une observation ancienne de meningite chez l'homme', *Ann.Inst. Pasteur*, 68, pp. 92–95.
- Dörr, T., Vulić, M. and Lewis, K. (2010) 'Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*', *PLoS Biology*, 8(2). doi: 10.1371/journal.pbio.1000317.
- Faleiro, M. L., Andrew, P. W. and Power, D. (2003) 'Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods', *International Journal of Food*

- Microbiology*, 84(2), pp. 207–216. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00422-1.
- Farber, J. M. and Peterkin, P. I. (1991) *Listeria monocytogenes, a Food-Borne Pathogen*, *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*.
- Fauvart, M., de Groote, V. N. and Michiels, J. (2011) ‘Role of persister cells in chronic infections: Clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies’, *Journal of Medical Microbiology*, 60(6), pp. 699–709. doi: 10.1099/jmm.0.030932-0.
- Francis, G. A. and O’Beirne, D. (2005) ‘Variation among strains of *Listeria monocytogenes*: Differences in survival on packaged vegetables and in response to heat and acid conditions’, *Food Control*, 16(8 SPEC. ISS.), pp. 687–694. doi: 10.1016/j.foodcont.2004.06.005.
- Galsworthy, S.B., Girdler, S., K. S. F. (1990) ‘Chemotaxis in *Listeria monocytogenes*’, *Acta Microbiol. Hung*, 37, pp. 81–85.
- Gandhi, M. and Chikindas, M. L. (2007) ‘*Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive’, *International Journal of Food Microbiology*, pp. 1–15. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008.
- Guillet, C. *et al.* (2010) ‘Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*’, *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), pp. 136–138. doi: 10.3201/eid1601.091155.
- Heymann DL (2008) ‘Control of Communicable Diseases Manual’, *American Public Health Association*, pp. 357–361.
- Lebreton, A. *et al.* (2016) ‘1926–2016: 90 Years of listeriology’, *Microbes and Infection*. Elsevier Masson SAS, 18(12), pp. 711–723. doi: 10.1016/j.micinf.2016.10.009.
- Lewis, K. (2010) ‘Persister Cells’, *Annual Review of Microbiology*, 64(1), pp. 357–372. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134306.
- Li, L. *et al.* (2014) ‘The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens’, *Frontiers in Microbiology*, 5(JUN), pp. 1–1. doi: 10.3389/fmicb.2014.00258.
- Lianou, A. *et al.* (2006) ‘Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins’, *Journal of Food Protection*, 69(11), pp. 2640–2647. doi: 10.4315/0362-028X-69.11.2640.

- Lianou And, A. and Sofos, J. N. (2007) *A Review of the Incidence and Transmission of Listeria monocytogenes in Ready-to-Eat Products in Retail and Food Service Environments, Journal of Food Protection.*
- Mackey, B. M. *et al.* (1990) 'Heat resistance of Listeria: strain differences and effects of meat type and curing salts', *Letters in Applied Microbiology*, 10(6), pp. 251–255. doi: 10.1111/j.1472-765X.1990.tb00119.x.
- Maisonneuve, E. and Gerdes, K. (2014) 'Molecular mechanisms underlying bacterial persisters', *Cell*. Cell Press, pp. 539–548. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.050.
- Molenaar, D. *et al.* (1992) 'The efflux of a fluorescent probe is catalyzed by an ATP-driven extrusion system in Lactococcus lactis', *Journal of Bacteriology*, 174(10), pp. 3118–3124. doi: 10.1128/jb.174.10.3118-3124.1992.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, M. B. . (1926) 'A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus Bacterium monocytogenes.', *J. Pathol. Bacteriol.*, 28, pp. 407–439.
- Nicole M Vega, Kyle R Allison, A. S. K. & J. J. C. (2012) 'Signaling-mediated bacterial persister formation', *Nature Chemical Biology*, 8, pp. 431–433.
- Nowakowska, J. and Oliver, J. D. (2013) 'Resistance to environmental stresses by Vibrio vulnificus in the viable but nonculturable state', *FEMS Microbiology Ecology*, 84(1), pp. 213–222. doi: 10.1111/1574-6941.12052.
- O'driscoll, B., Gahan, C. G. M. and Hill, C. (1997) *Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis Analysis of the Acid Tolerance Response in Listeria monocytogenes LO28, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.* Available at: <http://aem.asm.org/>.
- Oliver, J. D. and Bockian, R. (1995) 'In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of Vibrio vulnificus', *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), pp. 2620–2623. doi: 10.1128/aem.61.7.2620-2623.1995.
- Orsi, R. H., Bakker, H. C. de. and Wiedmann, M. (2011) 'Listeria monocytogenes lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics', *International Journal of Medical Microbiology*, pp. 79–96. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.05.002.
- Ottaviani, F., Ottaviani, M., Agosti, M. (1997) 'Differential agar medium for Listeria

- monocytogenes', in in: *Quinper Froid Symposium. Proceedings. P6 A.D.R.I.A.*
- Pine, L. *et al.* (1989) *Physiological studies on the growth and utilization of sugars by Listeria species I*. Available at: www.nrcresearchpress.com.
- Pinto, D. *et al.* (2011) 'Resuscitation of Escherichia coli VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli', *Journal of Applied Microbiology*, 110(6), pp. 1601–1611. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05016.x.
- Pirie, J. H. . (1927) 'A new disease of veld rodents, Tiger River Disease', *Publ. S. Afr. Inst. Med. Res*, 3, p. 163.
- Pirie, J. H. . (1940) 'Listeria: Change of name for a genus of bacteria, Nature', *Nature*, 145, p. 264.
- Premaratne, R.J., Lin, W.J., Johnson, E. A. (1991) 'Development of an improved chemically defined minimal medium for Listeria monocytogenes', *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, pp. 3046–3048.
- Rocourt, J., Buchrieser, C. (2007) 'The genus Listeria and Listeria monocytogenes: Phylogenetic position, taxonomy, and identification', In *E.T Ryser και E.H. Marth (Eds.), Listeria, listeriosis, and food safety (3 rd edn., pp. 1-20)*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, A., Malinverni, R., Bille, J. (1986) 'Meningite purulente aiguë à Listeria seeligeri chez un adulte immunocompétent.', *Schweiz Med Wochenschr.*, 116(8), pp. 248–251.
- Romick, T. L., Fleming, H. P. and Mcfeeters, R. F. (1996) *Aerobic and Anaerobic Metabolism of Listeria monocytogenes in Defined Glucose Medium*, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. Available at: <http://aem.asm.org/>.
- Samuel Baron. (1996) *Medical Microbiology*. 4th edn. Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Seeliger, H.P.R., Hohne, K. (1979) 'Serotyping of Listeria monocytogenes and related species', *Methods Microbiol*, 13, p. 31.
- Seeliger, H.P.R., B. (1968) 'Kritische Untersuchungen zur Frage einer Kapselbildung bei Listeria monocytogenes', *Zbl. Bakteriol. Parasit. Infekt. Hyg.*, 206, pp. 216–227.
- Siddiqi R, K. M. (1989) 'Amino acid requirement of six strains of Listeria

- monocytogenes.’, *Zentralbl Bakteriol.*, Jul;271(2), pp. 146–52.
- Todeschini, G., Friso, S., Lombardi, S., Casaril, M., Fontana, R., Corrocher, R. (1998) ‘A case of *Listeria murrayi/grayi* bacteremia in a patient with advanced Hodgkin’s disease’, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, 17, pp. 808–810.
- Vega, N. M. *et al.* (2012) ‘Signaling-Mediated Bacterial Persister Formation’, *Nat Chem Biol.*, 8(5), pp. 431–433. doi: 10.1038/nchembio.915.Signaling-Mediated.
- Wagner, M., McLauchlin, J. (2008) *Biology. Handbook of Listeria monocytogenes. Liu Dongyou.*
- Ward, T. J. *et al.* (2008) ‘Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates’, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), pp. 7629–7642. doi: 10.1128/AEM.01127-08.
- Welshimer, H. J. (2020) *VITAMIN REQUIREMENTS OF LISTERIA MONOCYTOGENES* Downloaded from. Available at: <http://jb.asm.org/>.
- Wu, Y. *et al.* (2012) ‘Role of oxidative stress in persister tolerance’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(9), pp. 4922–4926. doi: 10.1128/AAC.00921-12.
- Yousef, A. E. and Courtney, P. D. (2003) *Basics of Stress Adaptation and Implications in New-Generation Foods.*
- Zhao, X. *et al.* (2017) ‘Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens’, *Frontiers in Microbiology*, 8(APR). doi: 10.3389/fmicb.2017.00580.
- Zhao, Y., Knøchel, S. and Siegumfeldt, H. (2014) ‘In situ examination of *Lactobacillus brevis* after exposure to an oxidizing disinfectant’, *Frontiers in Microbiology*, 5(NOV), pp. 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2014.00623.