



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

« Στοχαστική περιγραφή της ανάκαμψης μεμονωμένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* μετά από έκθεση σε συνθήκες καταπόνησης »

Βάια Α. Ντρίγιου

Επιβλέπων Καθηγητής:

Σκανδάμης Παναγιώτης, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

2020



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

« Στοχαστική περιγραφή της ανάκαμψης μεμονωμένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* μετά από έκθεση σε συνθήκες καταπόνησης »

«Stochastic description of the recovery of single-cells of *Listeria monocytogenes* after exposure to stress conditions »

Βάια Α. Ντρίγιου

Εξεταστική Επιτροπή:

Σκανδάμης Παναγιώτης, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Δροσινός Ελευθέριος, Καθηγητής ΓΠΑ

Πανάγου Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Στοχαστική περιγραφή της ανάκαμψης μεμονωμένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* μετά από έκθεση σε συνθήκες καταπόνησης

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο τροφιμογενής παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*, συναντάται σε ένα ευρύ φάσμα οικολογικών θώκων, περιλαμβανομένου του εδάφους, του νερού και των φυτών. Χώροι επεξεργασίας τροφίμων, μη επεξεργασμένα τρόφιμα και τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση (RTE) εύκολα επιμολύνονται με τον μικροοργανισμό, μέσω φορέων. Η κατανάλωση τροφίμων, μολυσμένων με τον μικροοργανισμό, ενέχει τον κίνδυνο της λιστερίωσης, μια δυνητικά θανατηφόρο ασθένεια.

Προκειμένου, να εξασφαλισθεί η ασφάλεια των τροφίμων, η Βιομηχανία Τροφίμων, δημιουργεί δυσμενείς συνθήκες για την επιβίωση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, οι οποίες περιλαμβάνουν, όξινα περιβάλλοντα, προσθήκη αλάτων, υψηλές θερμοκρασίες. Το βακτήριο, ωστόσο, έχει αναπτύξει μηχανισμό, που του επιτρέπουν να επιβιώνει στις παραπάνω καταπονήσεις.

Η καταπόνηση των κυττάρων του συγκεκριμένου μικροοργανισμού, ενδέχεται να επάγει την κατάσταση Ζώντα αλλά Μη Καλλιεργήσιμα (VBNC), κατά την οποία τα κύτταρα τραυματίζονται υποθανάτια, χωρίς όμως να θανατώνονται. Αυτό ενέχει την πιθανή ανάκαμψη των κυττάρων, όταν βρεθούν σε ευνοϊκές, για αυτά, συνθήκες, αποτελώντας απειλή για την ασφάλεια των τροφίμων.

Στόχος της παρούσας μελέτης, είναι να διερευνήσει την κατάσταση Ζώντα αλλά Μη Καλλιεργήσιμα (VBNC) του εν λόγω μικροοργανισμού, να αξιολογήσει ποσοτικά τον υποθανάτιο τραυματισμό στα κύτταρα του μικροοργανισμού υπό συνθήκες καταπόνησης, που σχετίζονται με την επεξεργασία και περιβάλλοντα επεξεργασίας των τροφίμων και να παρακολουθήσει σε πραγματικό χρόνο την ικανότητα ανάκαμψης με την χρήση της συσκευής Bioscreen. Συγκεκριμένα, το βακτηριακό στέλεχος, ScottA (ορότυπος 4b) υποβλήθηκε σε όξινη καταπόνηση, χρησιμοποιώντας οξικό οξύ (AA) και υδροχλωρικό οξύ (HCl) 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 20°C και 4°C.

Η επαγωγή της VBNC κατάστασης, στα κύτταρα του στελέχους ScottA του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση οξικού οξέος (AA) pH 3, 2.7 και 2.5 στους 20°C, για 5 ώρες και υδροχλωρικού οξέος (HCl) pH 3, 2.7 και 2.5 στους 20°C, για 5 ώρες. Προκειμένου να διαφοροποιηθεί ο ανθεκτικός υποπληθυσμός από τον συνολικό, θρεπτικό μέσο Tryptic Soy Agar με 0.6% Yeast Extract (TSA-Ye) συμπληρωμένο ή όχι με 5% w/v NaCl χρησιμοποιήθηκε συγκριτικά. Τα κύτταρα VBNC προσδιορίστηκαν συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από την μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης και της Μικροσκοπίας Φθορισμού, χρησιμοποιώντας συνδυασμό των φθορίζουσών χρωστικών ουσιών CFDA και Ιωδιούχο Προπίδιο PI. Σε κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας αποτυπώθηκε και μία φωτογραφία από το Μικροσκόπιο Φθορισμού. Η ικανότητα της ανάκαμψης παρακολούθηθηκε σε πλάκες μικροτιτλοδότησης, που περιείχαν Tryptone Soy Broth εμπλουτισμένο με 0.6% Yeast Extract (TSB-Ye) στους 37°C, καθώς και στο θρεπτικό υπόστρωμα Tryptic Soy Agar εμπλουτισμένο με 0.6% Yeast Extract (TSA-Ye).

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*, σε καμία από τις παραπάνω συνθήκες δεν έχασε την καλλιεργησιμότητά του και τα κύτταρα παρέμειναν CFDA+, εκπέμποντας πράσινο φθορισμό. Επομένως, υπό αυτές τις συνθήκες, δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή της κατάστασης VBNC. Ωστόσο, κατά την έκθεση σε υδροχλωρικό οξύ pH 2.7 και pH 2.5, παρατηρήθηκε υψηλός αριθμός τραυματισμένων κυττάρων (CFDA+/PI+), υποδεικνύοντας μια ενδιάμεση κατάσταση τραυματισμού, επιβεβαιώνοντας τη ύπαρξη μιας συνεχούς μεταβατικής κατάστασης λήθαργου. Επιπλέον, τα κύτταρα, στο TSB-Ye, παρουσίασαν ικανότητα ανάκαμψης, μετά την έκθεση και στα τρία διαφορετικά pH οξικού οξέος, παρουσιάζοντας τον πιο επιμηκυμένο χρόνο γενεάς σε pH 2.5 ($10 \pm 0,1$ ώρες), συγκριτικά με τα μη καταπονημένα κύτταρα. Αντίθετα, ανάκαμψη των κυττάρων δεν παρατηρήθηκε μετά την έκθεση στο pH 2.5 οξικού οξέος (AA) σε TSA-Ye, όμως παρατηρήθηκε ανάκαμψη στα υπόλοιπα δύο pH (pH 3 και pH 2.7).

Η παρούσα μελέτη εντάσσεται και θα μπορούσε να συνεισφέρει στην γενικότερη προσπάθεια της Επιστήμης Τροφίμων, στην καλύτερη κατανόηση των κινδύνων που ο υποθανάτιος τραυματισμός και η κατάσταση λήθαργου, ενέχουν για την ασφάλεια των τροφίμων.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία Τροφίμων

Λέξεις Κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, όξινη καταπόνηση, υποθανάτιος τραυματισμός, Ζώντα αλλά Μη Καλλιεργήσιμα (VBNC), ανάκαμψη.

Stochastic description of the recovery of single-cells of *Listeria monocytogenes* after exposure to stress conditions

Department of Food Science & Human Nutrition

Laboratory of Food Quality Control & Hygiene

ABSTRACT

The foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* is found in a wide range of ecological fungi, including soil, water and plants. Food processing areas, unprocessed foods and ready-to-eat foods (RTE) are easily contaminated with the microorganism through vectors. Consumption of food contaminated with the microorganism carries the risk of listeriosis, a potentially deadly disease.

In order to ensure food safety, the Food Industry, creates adverse conditions for the survival of the microorganism *Listeria monocytogenes*, which include, acidic environments, addition of salts, high temperatures. The bacterium, however, has developed stress response mechanisms, that allow it to survive the above stresses.

Stressing the cells of this microorganism may induce the Viable but Non Culturable (VBNC) state, in which the cells are sublethal injured, but not dead. This involves the possible recovery of cells, when they are in favorable conditions for them, posing a threat to food safety.

The aim of the present study is to investigate Viable but Non Culturable (VBNC) state of this microorganism, to quantify the sublethal injury to the cells of the microorganism under stress conditions, related to the processing and processing environments of food and to monitor the ability of recovery in Real-time, using the Bioscreen device. Specifically, the bacterial strain, ScottA (serotype 4b) was subjected to acid stress, using acetic acid (AA) and hydrochloric acid (HCl) and to starvation in combination with the addition of salt. The stress agents were dissolved in Ringer's solution, medium static phase cells with a final population of 10^9 CFU / ml were used, and the temperatures studied were 20 ° C and 4 ° C.

Induction of VBNC state in cells of the ScottA strain of *Listeria monocytogenes* was performed using acetic acid (AA) pH 3, 2.7 and 2.5 at 20° C for 5 hours and hydrochloric acid

(HCl) pH 3, 2.7 and 2.5 at 20° C for 5 hours. In order to differentiate the resistant subpopulation from the total, Tryptic Soy Agar medium with 0.6% Yeast Extract (TSA-Ye) supplemented or not with 5% w/v NaCl was used comparatively. VBNC cells were determined by comparing the results from plate counts and Fluorescence Microscopy, using a combination of fluorescent dyes CFDA and Propionate Iodine PI. Each time point corresponded to a fluorescent microscope snapshot. Recovery ability was monitored on microtiter plates containing Tryptone Soy Broth enriched with 0.6% Yeast Extract (TSB-Ye) at 37 ° C, and also in Tryptic Soy Agar enriched with 0.6% Yeast Extract (TSA-Ye).

The microorganism *Listeria monocytogenes* did not lost its culturability under any of the above conditions and the cells remained CFDA +, emitting green fluorescence. Therefore, under these conditions, the VBNC state was not induced. However, when exposed to pH 2.7 and pH 2.5 hydrochloric acid, a high number of injured cells (CFDA + / PI +) was observed, indicating an intermediate injury state, confirming the existence of a continuous transient state of inactivation. In addition, the cells were able to recover at all three different acetic acid pH, having the longest generation time at pH 2.5 (10 ± 0.1 hours), compared to the non-stressed cells. In contrast, cell recovery was not observed after exposure to acetic acid (AA) pH 2.5 in TSA-Ye, but recovery was observed at the other two pH (pH 3 and pH 2.7).

The present study is part of and could contribute to the overall effort of Food Science, to better understand the risks that sublethal injury and inactivation, involve to food safety.

Scientific area: Food Microbiology

Key words: *Listeria monocytogenes*, acid stress, sublethal injury, VBNC state, resuscitation.

*Αφιερώνεται
στους γονείς & στη γιαγιά μου*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της διπλωματικής μου μελέτης, αισθάνομαι την υποχρέωση να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους βοήθησαν και συντέλεσαν στην εκπόνησή της και ιδιαίτερα:

Στον επιβλέποντα καθηγητή μου και Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, κ. **Σκανδάμη Παναγιώτη**, για την ανάθεση του θέματος και την εμπιστοσύνη και εκτίμηση που έδειξε στο πρόσωπό μου, καθώς και για όλες τις παραγωγικές υποδείξεις του και συμβουλές του.

Στην Υποψήφια Διδάκτορα **Αρβανίτη Μαριάννα**, του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη βοήθεια, την καθοδήγηση και τον χρόνο, που αφιέρωσε για να με βοηθήσει, σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

Σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την αρμονική συνύπαρξή μας μέσα σε αυτό, δημιουργώντας ένα φιλικό περιβάλλον εργασίας.

Τις θερμές μου ευχαριστίες εκφράζω στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. **Δροσινό Ελευθέριο** και τον Καθηγητή κ. **Πανάγου Ευστάθιο**.

Τέλος, ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στους γονείς μου και στον αδερφό μου, που με υπομονή και ψυχραιμία, πρόσφεραν την απαραίτητη ηθική συμπαράσταση για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης, και κυρίως, επειδή πίστεψαν σε εμένα και στις δυνατότητές μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1 Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>Listeria monocytogenes</i>	13
1.1.1 Ιστορικά στοιχεία και χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού	13
1.1.2 Που απαντάται – πηγές μόλυνσης ζώντων οργανισμών.....	14
1.1.3 Τροφιμογενείς ασθένειες - Λιστερίωση	15
1.1.4 Παθογένεια του μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i>	18
1.2 Φυσιολογική κατάσταση μικροοργανισμών ως απόκριση της έκθεσης σε συνθήκες καταπόνησης	19
1.2.1 Βασικοί ορισμοί για το φαινόμενο της καταπόνησης και του τραυματισμού.....	19
1.2.2 Η κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» κύτταρα	22
1.2.3 Ανάκαμψη των VBNC κυττάρων	25
1.3 Επιβίωση του μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> σε συνθήκες καταπόνησης	26
1.3.1 Επιβίωση του μικροοργανισμού σε συνθήκες όξινης καταπόνησης	26
1.3.2 Παράγοντες καταπόνησης	31
Οξικό οξύ (Acetic acid, AA)	31
Υδροχλωρικό οξύ (Hydrochloric acid, HCl)	32
1.3.3 Επιβίωση του μικροοργανισμού σε συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης	32
1.4 Στοχαστικότητα	34
1.5 Υπόθεση Εργασίας	35
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
2.1 Στελέχη <i>Listeria monocytogenes</i>	37

2.2 Προετοιμασία εμβολίου	37
2.3 Θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης	38
2.3.1 Μη επιλεκτικά μέσα ανάπτυξης	38
2.3.2 Επιλεκτικά μέσα ανάπτυξης	38
2.4 Παράγοντες όξινης καταπόνησης	39
2.4.1 Οξικό οξύ (Acetic Acid, AA)	39
2.4.2 Υδροχλωρικό οξύ (Hydrochloric acid, HCl)	39
2.5 Έκθεση σε συνθήκες όξινης καταπόνησης	39
2.6 Πειραματική διαδικασία όξινης καταπόνησης με τη μέθοδο των τρυβλίων (Plates)	40
2.6.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων	41
2.7 Πειραματική διαδικασία όξινης καταπόνησης με τη μέθοδο της μικροσκοπίας φθορισμού (Fluorescence Microscopy)	42
2.7.2 Ανάλυση εικόνας	44
2.8 Μελέτη της ανάκαμψη τραυματισμένων κυττάρων <i>Listeria monocytogenes</i> σε υγρό θρεπτικό μέσο με τη χρήση του Bioscreen	45
2.8.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων	46
2.9 Μελέτη της ανάκαμψη τραυματισμένων κυττάρων <i>Listeria monocytogenes</i> σε στερεό θρεπτικό μέσο με τη χρήση μικροσκοπίου	47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	49
Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση οξικού οξέος με τιμές pH 3, 2.7 και 2.5 σε θερμοκρασία 20°C	49
Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση οξικού οξέος με τιμές pH 3, 2.7 και 2.5 σε θερμοκρασία 4°C	51
Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση υδροχλωρικού οξέος με τιμές pH 3, 2.7 και 2.5 σε θερμοκρασία 20°C	54
Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση υδροχλωρικού οξέος με τιμές pH 3, 2.7 και 2.5 σε θερμοκρασία 4°C	57

Εκτίμηση της ικανότητας επαγωγής της κατάστασης «Ζώντα αλλά μη Καλλιεργήσιμα» (Viable But Non Culturable, VBNC state) με την χρήση διαφορετικών τιμών pH (3, 2.7, 2.5) του οξικού οξέος (AA) σε θερμοκρασία καταπόνησης 20°C	59
Εκτίμηση της ικανότητας επαγωγής της κατάστασης «Ζώντα αλλά μη Καλλιεργήσιμα» (Viable But Non Culturable, VBNC state) με την χρήση διαφορετικών τιμών pH (3, 2.7, 2.5) του υδροχλωρικού οξέος (HCl) σε θερμοκρασία καταπόνησης 20°C	67
Αξιολόγηση της ικανότητας ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB-Ye ύστερα από έκθεση σε διαφορετικές τιμές pH (3, 2.7, 2.5) Acetic Acid (AA) στους 37°C	74
Αξιολόγηση της ικανότητας ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB-Ye ύστερα από έκθεση σε διαφορετικές τιμές pH (3, 2.7, 2.5) Hydrochloric Acid (HCl) στους 37°C	76
Αξιολόγηση της ικανότητας ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye ύστερα από έκθεση σε διαφορετικές τιμές pH (3, 2.7, 2.5) Acetic Acid (AA) στους 37°C	77
Αξιολόγηση της ικανότητας ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye ύστερα από έκθεση σε διαφορετικές τιμές pH (3, 2.7, 2.5) Hydrochloric Acid (HCl) στους 37°C	79
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	80
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	85

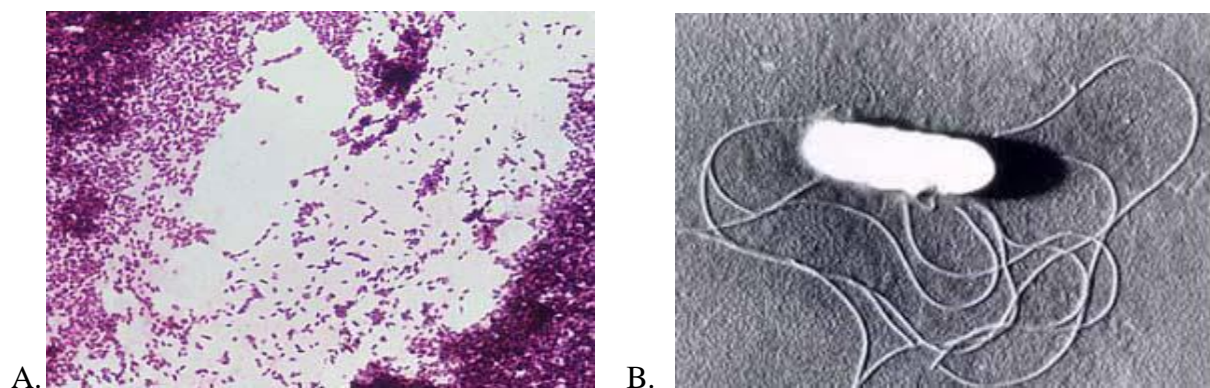
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*

1.1.1 Ιστορικά στοιχεία και χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού

Αυτό το θετικά κατά Gram βακτήριο ανακαλύφθηκε από τον E.G.D. Murray το 1926, μετά από επιδημία που ξέσπασε σε κουνέλια και ινδικά χοιρίδια σε σπίτια, στο Cambridge της Αγγλίας (E.G.D. Murray et al., 1926). Αρχικά, ο μικροοργανισμός έλαβε την ονομασία *Bacterium monocytogenes*, λόγω της μονοκυτταρογόνου δράσης του σε ζωντανά κύτταρα κουνελιών, μετά τον εμβολιασμό τους (Seeliger et al., 1988). Αργότερα, ακολούθησαν άλλες ονομασίες, όπως *Erysipelothrix*, *Listerella* και τελικά *Listeria*, από τον Pirie το 1940, προς τιμήν του Dr. Lister, που ανακάλυψε την αντισηψία (Pirie et al., 1940). Το 1926 υπήρξαν τεκμηριωμένες περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης, από τον Nyfeldt, στη Δανία, οι οποίες ήταν σποραδικές και συχνά συνδέονταν με εργαζόμενους, που έρχονταν σε επαφή με άρρωστα ζώα. Το ενδιαφέρον για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό αυξήθηκε το 1983, όπου εμφανίστηκαν τα πρώτα μαζικά κρούσματα λιστερίωσης, με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας, όπως σημειώνεται από τον Schleich (Cossart et al., 2007). Από τότε μέχρι σήμερα, ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*, ανήκει στα πιο μελετημένα βακτηριακά παθογόνα.

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* είναι ένα θετικά κατά Gram, ραβδόμορφο βακτήριο, μήκους 1-2μm και πλάτους 0,5 μm.



Σχήμα 1 Εικόνες του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε Α) οπτικό μικροσκόπιο μετά από χρώση Gram και Β) ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Todar et al., 2008)

Εμφανίζει μικρές, λεπτές, ελαφρώς πεπλατυσμένες και γαλακτώδεις βακτηριακές αποικίες. Είναι ένας ψυχρότροφος μικροοργανισμός και σημειώνεται ανάπτυξη μεταξύ 3 – 45°C, με βέλτιστο εύρος θερμοκρασιών τους 30 – 37°C. Σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 50°C, ο μικροοργανισμός θανατώνεται. Είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, με ικανότητα να πολλαπλασιάζεται εύκολα σε αναερόβιες ή μικροαερόφιλες συνθήκες, καθώς και σε ένα μεγάλο εύρος pH 4.4 – 9.6, ενώ αν προκύψουν τιμές pH μικρότερες από 5.6, τότε ο πολλαπλασιασμός του αναστέλλεται (Low et al., 1997). Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* αναπτύσσεται καλύτερα σε ενεργότητα ύδατος (a_w , water activity) ≥ 0.97 . Για τα περισσότερα στελέχη, η ελάχιστη a_w είναι 0.93, αλλά ορισμένα στελέχη αναπτύσσονται σε τιμές a_w μέχρι και 0.90. Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις, όπου κύτταρα επιβιώνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε χαμηλές τιμές a_w μέχρι και 0.83 (Miller et al., 1992).

1.1.2 Που απαντάται – πηγές μόλυνσης ζώντων οργανισμών

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* είναι ένα βακτήριο, που έχει την ικανότητα να ανταπεξέρχεται σε ακραίες συνθήκες περιβάλλοντος και επομένως να βρίσκεται σε πληθώρα τρόφιμα και περιβάλλοντα. Έχει απομονωθεί από ποικίλες πηγές, στις οποίες συγκαταλέγονται το έδαφος, το νερό και τα φυτά. Παρά το γεγονός ότι οι πληθυσμοί της *Listeria monocytogenes* στη φύση είναι συνήθως μικροί, το βακτήριο διαθέτει την ικανότητα να μεταδίδεται, να πολλαπλασιάζεται και να διαμένει στον περιβάλλοντα χώρο και τον εξοπλισμό μονάδων παραγωγής τροφίμων για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Εμφανίζεται ευρέως σε καλλιέργειες, υδατοκαλλιέργειες και περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, ενώ μεγαλύτερος επιπολασμός εντοπίζεται σε εδάφη πλησιέστερα σε νερό ή εδάφη με υψηλότερη υγρασία (Strawn et al., 2013). Επομένως, ο τύπος του χώματος, η θερμοκρασία και η υγρασία του εδάφους, επηρεάζουν την επιβίωση του μικροοργανισμού, χωρίς όμως να την επηρεάζει η διαθεσιμότητα ανόργανων θρεπτικών ουσιών (άζωτο και φώσφορος) (Lyautey et al., 2007). Η *Listeria monocytogenes* δύναται να επιβιώσει στο έδαφος από 7 μέχρι και 730 ημέρες (Ferreira et al., 2014).

Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός βρίσκεται, επίσης, στο νερό, όπως λίμνες και ποτάμια, αλλά και σε θαλασσινά ύδατα, όπως υπογραμμίζουν αναφορές από μολυσμένα ψάρια και οστρακοειδή από *Listeria monocytogenes*, κυρίως λόγω της ανθρώπινης δραστηριότητας,

όπως σε περιπτώσεις απόρριψης αποβλήτων βιομηχανικών μονάδων, πτηνοτροφικών μονάδων, σφαγείων και μονάδων βιολογικού καθαρισμού (Jami et al., 2014) (Sauders et al., 2007). Ωστόσο, με βάση την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια Τροφίμων (EFSA and ECDC, 2013) μόνο ένας μικρός αριθμός κρουσμάτων λιστερίωσης έχει συνδεθεί με τα θαλασσινά. Το νερό που χρησιμοποιείται για άρδευση αποτελεί κίνδυνο επιμόλυνσης των τροφίμων, πριν την συγκομιδή τους, με αυτόν τον μικροοργανισμό.

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* μπορεί να εισέλθει στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων, μέσω του εδάφους που προσκολλάται στα παπούτσια και τα ρούχα των εργατών, καθώς και από μολυσμένες πρώτες ύλες ή από ωμά τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Η ανάπτυξή του ανιχνεύεται σε μέρη με υψηλά επίπεδα υγρασία, όπως τοίχους, σωλήνες, στο πάτωμα και στο ταβάνι, όπου μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επίσης, συναντάται στον εξοπλισμό, που χρησιμοποιείται για την επεξεργασία των τροφίμων, λόγω αναποτελεσματικού καθαρισμού, κακής σχεδίασης ή κατάστασης του εξοπλισμού (Buchanan et al., 2017).

Τα τρόφιμα θεωρούνται ότι είναι ο κύριος φορέας λιστερίωσης, και ιδιαίτερα τα έτοιμα προς κατανάλωση (Ready to Eat, RTE), συμπεριλαμβανομένων και των επεξεργασμένων τροφίμων, πριν τη συσκευασία τους. Τα τρόφιμα αυτά, συνήθως επιμολύνονται από τον μικροοργανισμό, επειδή διατηρούνται για παρατεταμένες χρονικές περιόδους σε θερμοκρασίες ψύξης, προσφέροντας ένα κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Buchanan et al., 2017). Χαρακτηριστικά παραδείγματα τροφίμων RTE, που έχουν σχετιστεί με κρούσματα λιστερίωσης, είναι το μη – παστεριωμένο γάλα, τα μαλακά τυριά, τα ωμά θαλασσινά, τα φρέσκα λαχανικά και τα λουκάνικα (Doyle et al., 2007).

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, πως το εν λόγω βακτήριο, είναι παντού στο περιβάλλον, έχοντας πολλές ευκαιρίες μόλυνσης των τροφίμων κατά τη διάρκεια επεξεργασίας τους, ακόμα και όταν αυτά έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία, λόγω μη τήρησης των κανόνων υγιεινής. Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η σωστή διαχείριση των τροφίμων, ώστε να αποφευχθούν τυχόν μολύνσεις από το βακτήριο.

1.1.3 Τροφιμογενείς ασθένειες - Λιστερίωση

Η λιστερίωση είναι μια, συχνά σοβαρή τροφιμογενή ασθένεια, που προκαλείται μετά από μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes*. Αρχικά, αναγνωρίστηκε ως

ασθένεια των ζώων και το 1981 χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά ως τροφική νόσος, με τα τρόφιμα να αποτελούν την κυρίαρχη οδό μετάδοσης του μικροοργανισμού στους ανθρώπους. **(Low et al., 1997)**

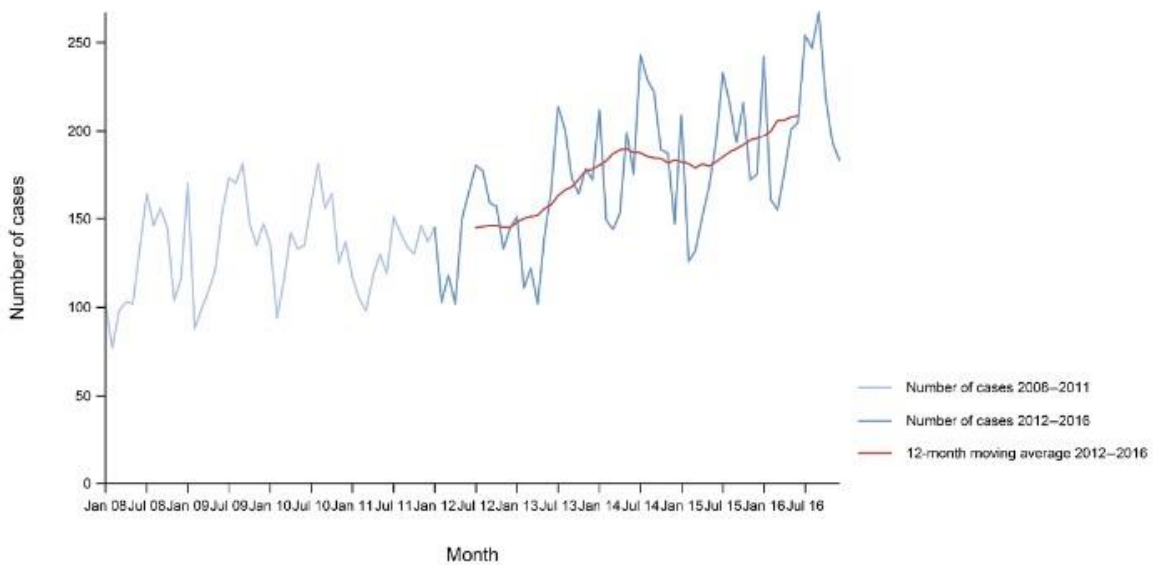
Αν και έχουν αναφερθεί διάφορα κρούσματα λιστερίωσης, οι περισσότερες περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης, πιθανόν να αντιπροσωπεύουν σποραδικές περιπτώσεις, που προκαλούνται από μεγάλη ποικιλία στελεχών *Listeria monocytogenes*. Οι περισσότερες σποραδικές περιπτώσεις, φαίνεται να προκαλούνται από στελέχη που αντιπροσωπεύουν τους ορότυπους 4b, 1/2a και 1/2b, τα οποία μπορούν να ομαδοποιηθούν στη γενεά I **(Ryser et al., 1991)**.

Παρά την ευρεία κατανομή στο περιβάλλον και τη σχετικά υψηλή συχνότητα απομόνωσης του βακτηρίου από τρόφιμα, η επίπτωση της λιστερίωσης είναι χαμηλή στον γενικό πληθυσμό. Η κλινική εικόνα της ασθένειας, σε υγιή άτομα, εμφανίζεται με τη μορφή γαστρεντερίτιδας. Έχει μολυσματική δόση $10^8 - 10^9$ κύτταρα και σχετικά σύντομη περίοδο επώασης (λίγες ώρες έως 2 ή 3 μέρες). Τα συμπτώματα, που εμφανίζονται σε αυτή την περίπτωση λιστερίωσης, περιλαμβάνουν ελαφρύ πυρετό, ναυτία, εμετό και διάρροια.

Εντούτοις, αν οι ευπαθείς ομάδες (ηλικιωμένοι, έγκυες, νεογνά, καρκινοπαθείς και ανοσοκατασταλμένοι) μολυνθούν με το βακτήριο *Listeria monocytogenes*, τότε παρουσιάζεται επεμβατική λιστερίωση, με μολυσματική δόση μόλις $10^2 - 10^4$ κύτταρα και περίοδο επώασης από 24 ώρες έως 91 ημέρες. Η πιο σοβαρή μορφή αυτού του τύπου λιστερίωσης έχει μακρά περίοδο επώασης (3 ημέρες έως 3 μήνες), που οδηγεί σε σηψαιμία, μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα και μυοκάρδια νέκρωση. Συνήθως παρουσιάζεται ως σηψαιμία και σπανιότερα ως μηνιγγίτιδα, προκαλώντας συμπτώματα πυρετού, κόπωσης και έντονους πόνους στην κοιλιακή χώρα. Ένα άτομο, το οποίο εμφανίζει σηψαιμία ή μηνιγγίτιδα, χρειάζεται να νοσηλευτεί για αρκετές εβδομάδες **(Low et al., 1997)**.

Οι ηλικιωμένοι και τα άτομα με υποβαθμισμένο ανοσοποιητικό σύστημα διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για την εμφάνιση της ασθένειας, η οποία μπορεί να αποβεί θανατηφόρα, με ποσοστό θνησιμότητας 20 - 30 %. Στις έγκυες γυναίκες, η λιστερίωση εμφανίζει ήπια συμπτώματα, που συνδέονται με πυρετό, πονοκέφαλο και γαστρεντερικά προβλήματα, όμως μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπτώσεις στο έμβryo ή στο βρέφος, όπως απώλεια εμβρύου, πρόωρο τοκετό, μηνιγγίτιδα και θάνατο **(Silk et al., 2004–2009) (FAO, 2004)**.

Σύμφωνα με το CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2011), κάθε χρόνο στις Η.Π.Α, αναφέρονται περίπου 1600 περιπτώσεις ανθρώπων., εκ των οποίων το 94% των περιπτώσεων οδηγεί σε νοσηλεία, και με ποσοστό θνησιμότητας, που πλησιάζει το 21%, την καθιστά ως την τρίτη κύρια αιτία θανάτων, που σχετίζεται με τρόφιμα. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, το 2016, με βάση τις στατιστικές έρευνες του ECDC, επιβεβαιώθηκαν 2.536 ανθρώπινα κρούσματα λιστερίωσης, με ποσοστό θνησιμότητας από 18.9% έως 26.1%, υπογραμμίζοντας σημαντικά υψηλότερη τάση, συγκριτικά με το έτος 2012, που είχαν επιβεβαιωθεί 1.720 κρούσματα λιστερίωσης. (EFSA and ECDC, 2016)



Διάγραμμα 1 Αριθμός καταγεγραμμένων κρουσμάτων λιστερίωσης σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης την περίοδο 2008 – 2016 (EFSA and ECDC, 2016)

Με βάση τον WHO (World Health Organization), τα τρόφιμα θεωρούνται η κύρια οδός μετάδοσης της λιστερίωσης, συμπεριλαμβανομένων των ready-to-eat (RTE) τροφίμων, των ψαριών, των γαλακτοκομικών προϊόντων, των μαλακών τυριών, των delicatessen προϊόντων και των φρέσκων τροφίμων. Ωστόσο, ιδιαίτερη ανησυχία προκαλούν τα RTE τρόφιμα, καθώς έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής υπό συνθήκες ψύξης, οι οποίες ευνοούν την αύξηση, σε σημαντικό αριθμό κυττάρων, του βακτηρίου, αλλά και επειδή καταναλώνονται χωρίς επιπλέον επεξεργασία, πριν τη στιγμή της κατανάλωσής τους. Προκειμένου, να μειωθεί η μόλυνση των τροφίμων με τον παθογόνο μικροοργανισμό, είναι απαραίτητο να τηρείται το διεθνές νομοθετικό έγγραφο ISO 22000:2005, το οποίο εφαρμόζεται στα Συστήματα

Διαχείρισης Ασφάλειας Τροφίμων βασισμένο στις Ορθές Πρακτικές Υγιεινής και στην Ανάλυση Κινδύνων στα Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου (HACCP).

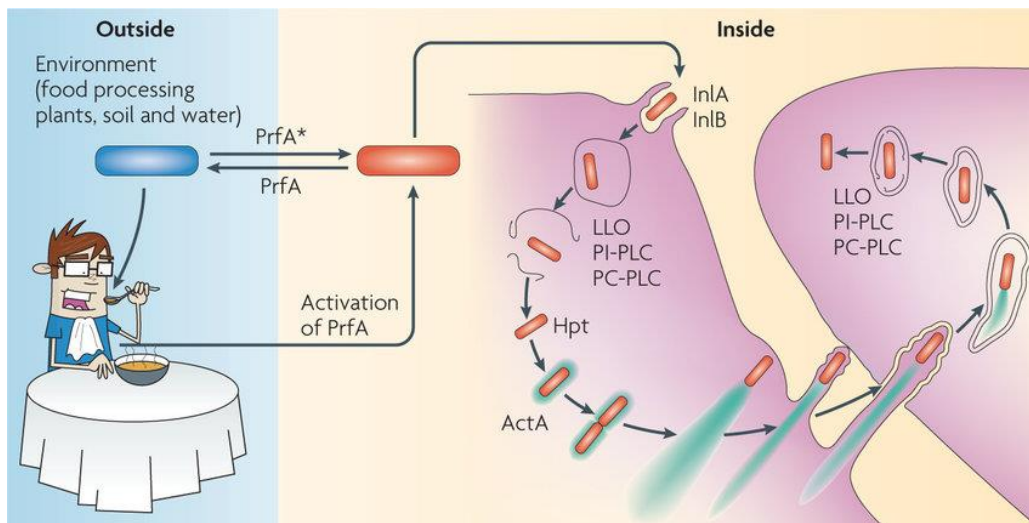
Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ/2073/2005), τα RTE τρόφιμα που δεν έχουν την ικανότητα να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού πρέπει να έχουν ≤ 100 κύτταρα cfu/g, κατά τη διάρκεια ζωής τους στην αγορά, ενώ θα πρέπει να υπάρχει απουσία του μικροοργανισμού σε 25 g τροφίμου στα RTE τρόφιμα, που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς και που έχουν την ικανότητα να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του παθογόνου.

1.1.4 Παθογένεια του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*

Όταν ο ξενιστής εκτεθεί σε κύτταρα της *Listeria monocytogenes*, η μόλυνση ακολουθεί μια καλά καθορισμένη πορεία, περνώντας το εντερικό επιθήλιο, αφού πρώτα εισχωρήσει από τη στοματική οδό. Τα βακτήρια στη συνέχεια εισάγονται στους μακροφάγους, όπου και διπλασιάζονται. Μετά την είσοδο στην κυκλοφορία του αίματος, τα περισσότερα βακτήρια καταλήγουν στους λεμφικούς αδένες. Όταν φτάσουν στο συκώτι και στον σπλήνα, τα περισσότερα κύτταρα πεθαίνουν, λόγω της αποτελεσματικής απόκρισης του ανοσοποιητικού του ξενιστή. Τα κύτταρα που θα επιβιώσουν, θα συνεχίσουν να διαιρούνται και να αντιγράφονται και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος θα μεταφερθούν στο κεντρικό νευρικό σύστημα ή τον πλακούντα.

Μια σειρά γονιδίων της *Listeria monocytogenes* δίνει τις οδηγίες για κάθε βήμα της διαδικασίας της μόλυνσης. Ένας αριθμός επιφανειακών βακτηριακών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των ιντερναλινών *inlA* και *inlB*, έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην βακτηριακή εισβολή στα κύτταρα του ξενιστή, αλληλεπιδρώντας με τους υποδοχείς επιφάνειας των ευκαρυωτικών κυττάρων, του E-cadherin και Met, αντίστοιχα. Μόλις εσωτερικευτούν στο κύτταρο ξενιστή, τα κύτταρα της *Listeria monocytogenes* παγιδεύονται σε ένα σφικτό φαγόσωμα, το οποίο μπορεί να λυθεί με την παραγωγή μιας τοξίνης, που σχηματίζει πόρους λιστεριολυσίνης O (LLO) και δύο φωσφολιπάσες PLC, τις PC-PLC και PI-PLC, οι οποίες συνεργάζονται για να διαρρήξουν το φαγόσωμα. Εντός του κυτοσολίου, τα κύτταρα του βακτηρίου, αναδιπλασιάζονται χρησιμοποιώντας θρεπτικά συστατικά του ξενιστή, συμπεριλαμβανομένων των σακχάρων φωσφορικής εξόζης, που αποκτώνται μέσω του μεταφορέα φωσφορικής εξόζης Hprt. Τα κύτταρα της *Listeria monocytogenes* έχουν την

ασυνήθιστη ικανότητα να χρησιμοποιούν το σύστημα πολυμερισμού ακτίνης του ξενιστή για να διασχίζουν τα ανθρώπινα κύτταρα, μέσω έκφρασης της πρωτεΐνης ActA. Αυτό επιτρέπει στα βακτηριακά κύτταρα να εισέρθουν σε γειτονικά κύτταρα του ξενιστή, όπου απορροφάται σε κενοτόπιο με διπλή μεμβράνη. Από το κενοτόπιο αυτό διαφεύγει, εκκρίνοντας την λιστεριολυσίνη LLO και τις φωσφολιπάσες PC-PLC και PI-PLC, και αρχίζει ένας νέος ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής (Freitag et al., 2009) (Tilney et al., 1989).



Σχήμα 2 Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου λοίμωξης από τον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* στους διαφορετικούς τύπους ευκαρυωτικών κυττάρων. Τα στάδια περιλαμβάνουν την είσοδο, την ανάπτυξη, την κίνηση και την εξάπλωση των κυττάρων του βακτηρίου από το ένα μακροφάγο στο άλλο. (Freitag et al., 2009)

1.2 Φυσιολογική κατάσταση μικροοργανισμών ως απόκριση της έκθεσης σε συνθήκες καταπόνησης

1.2.1 Βασικοί ορισμοί για το φαινόμενο της καταπόνησης και του τραυματισμού

Η έννοια της καταπόνησης (stress)

Ο όρος «καταπόνηση» έχει διαφορετικές ερμηνείες, ανάλογα με το πλαίσιο χρήσης του. Στο πλαίσιο της μικροβιολογίας τροφίμων, ο όρος «καταπόνηση», αναφέρεται σε κάθε επιβλαβή παράγοντα ή κατάσταση, που επηρεάζει δυσμενώς την ανάπτυξη ή την επιβίωση των

μικροοργανισμών, οδηγώντας σε υποθανάτια τραυματισμένα κύτταρα. Σύμφωνα με αυτόν τον ορισμό, πολλές επεξεργασίες τροφίμων, θεωρούνται παράγοντες καταπόνησης, συμπεριλαμβανομένων φυσικών μεταχειρίσεων (π.χ. θέρμανση, πίεση, ακτινοβολία), προσθήκη χημικών ουσιών (π.χ. οξέα, άλατα, οξειδωτικά) και βιολογικών καταπονήσεων (π.χ. ανταγωνιστική μικροχλωρίδα, μικροβιακοί μεταβολίτες).

Οι συνθήκες καταπόνησης, ποικίλλουν σε ένταση και αποτέλεσμα, και διαχωρίζονται σε ήπιες ή υποθανάτιες (sublethal), μέτριες (moderate) και ακραίες καταπονήσεις (lethal) (**Wesche et al., 2009**) :

- Οι «ήπιες» καταπονήσεις είναι υποθανάτιες (sublethal) και δεν οδηγούν σε απώλεια βιωσιμότητας, αλλά μειώνουν ή αναστέλλουν τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων. Τα κύτταρα μπορούν να ανταπεξέλθουν σε αυτές τις συνθήκες καταπόνησης, καθώς τα χαμηλά επίπεδα στρες μπορεί να προκαλέσουν μια παροδική προσαρμογή των κυττάρων (προσαρμοστική απόκριση), συνοδευόμενη από μια προσωρινή φυσιολογική αλλαγή, που συχνά οδηγεί σε αυξημένη ανοχή στο στρες.
- Οι «μέτριες» καταπονήσεις αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων και προκαλούν ως ένα βαθμό απώλεια της κυτταρικής βιωσιμότητας. Αυτού του είδους η καταπόνηση, δημιουργεί υποπληθυσμούς στον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό, που περιλαμβάνουν κύτταρα υγιή, με ήπιους έως σοβαρούς τραυματισμούς και νεκρά κύτταρα.
- Οι «ακραίες» καταπονήσεις περιλαμβάνουν επίπεδα στρες που είναι συνήθως θανατηφόρα (lethal) για τα κύτταρα, με αποτέλεσμα τον θάνατο της πλειοψηφίας του πληθυσμού. Ωστόσο, με την εφαρμογή θανατηφόρας καταπόνησης, δεν θανατώνονται όλα τα κύτταρα, αλλά ένα κλάσμα του πληθυσμού δύναται να επιβιώσει, λόγω γονιδιακών αποκρίσεων και μεταλλάξεων. Αυτός ο υποπληθυσμός, που δημιουργείται, μπορεί να βελτιώσει την επιβίωση του συνολικού πληθυσμού.

Η έννοια του τραυματισμού (injury)

Με τον όρο «τραυματισμό» ορίζεται το αποτέλεσμα ενός ή περισσότερων υποθανάτιων καταπονήσεων σε έναν μικροοργανισμό. Επομένως, ο υποθανάτιος τραυματισμός σε ένα κύτταρο, είναι συνέπεια της έκθεσης σε μια χημική ή φυσική διαδικασία που καταστρέφει, αλλά δεν θανατώνει το κύτταρο (**Wesche et al., 2009**). Ο Hartsell ήταν από τους πρώτους ερευνητές, που όρισε τα τραυματισμένα κύτταρα, ως εκείνα που είναι ικανά να σχηματίζουν αποικίες σε μη επιλεκτικά μέσα, αλλά όχι σε εκλεκτικά (**Hartsell et al., 1951**). Οι όροι του

«τραυματισμού» και της «καταπόνησης» των κυττάρων, συνδέονται μεταξύ τους σαν αίτιο – αποτέλεσμα, με τον τραυματισμό να αποτελεί την αδυναμία ενός κυττάρου να ανταποκριθεί στο στρες ή από μια καθυστερημένη ή ανεπαρκή προσαρμοστική απόκριση.

Ο υποθανάτιος τραυματισμός είναι ένα αναστρέψιμο φαινόμενο, καθώς ένας αριθμός τραυματισμένων κύτταρων μπορεί να επιδιορθώσει την κυτταρική βλάβη και να ανακτήσει όλες τις φυσιολογικές του ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της λοιμογόνου δράσης, όταν οι συνθήκες γίνουν ευνοϊκές. Ένας πληθυσμός επιζώντων μικροοργανισμών, μετά από μια υποθανάτια φυσική ή χημική επεξεργασία, περιλαμβάνει νεκρά κύτταρα (μη αναστρέψιμα τραυματισμένα), μη τραυματισμένα κύτταρα (φυσιολογικά κύτταρα) και τραυματισμένα κύτταρα (αναστρέψιμα τραυματισμένα). Τα παθογόνα μπορούν να τραυματιστούν μέσα στα τρόφιμα είτε από την επεξεργασία τους, είτε από τις διαδικασίες χειρισμού, όπως θερμική επεξεργασία, ψύξη, κατάψυξη, την ξήρανση, από την έκθεση σε συντηρητικά και την οξύτητα. Επομένως, ο προσδιορισμός της παρουσίας τραυματισμένων κυττάρων ενός μικροοργανισμού, είναι κρίσιμος για την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων, καθώς αυτά μπορούν να ανακάμψουν, και για τον λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί πληθώρα μεθόδων και θρεπτικών υποστρωμάτων (Wu et al., 2008).

Ο υποθανάτιος τραυματισμός μπορεί να εκδηλωθεί σαν μεταβολικός ή δομικός τραυματισμός. Ο μεταβολικός τραυματισμός, έχει περιγραφεί ως η αδυναμία των κυττάρων να αναπτυχθούν σε καθορισμένα ελάχιστα μέσα. Αυτή η αδυναμία πολλαπλασιασμού είναι συνήθως προσωρινή και μετά από αυτή τα κύτταρα μπορούν να ανακάμψουν. Ο δομικός τραυματισμός, είναι η ανικανότητα των βακτηρίων να πολλαπλασιάζονται ή να επιβιώνουν σε μέσα που περιέχουν επιλεκτικούς παράγοντες, χωρίς εμφανή ανασταλτικά αποτελέσματα στα μη τραυματισμένα κύτταρα. Ανάλογα με άλλες συνθήκες (π.χ. εμπλουτισμός, συνθήκες επώασης), η αδυναμία των κυττάρων να σχηματίσουν αποικίες σε εκλεκτικά μέσα μπορεί, επίσης, να είναι προσωρινή (Wesche et al., 2009).

Κατά τον υποθανάτιο τραυματισμό, οι μικροοργανισμοί εμφανίζουν κυτταρικές αλλαγές, καθώς επηρεάζονται πολλά δομικά και λειτουργικά συστατικά τους, όπως το κυτταρικό τοίχωμα, η κυτταρική μεμβράνη, τα ριβοσώματα, το DNA και το RNA, και ορισμένα ένζυμα (Wu et al., 2008).

Βλάβη στο κυτταρικό τοίχωμα

Βλάβες στο κυτταρικό τοίχωμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων, δεν είναι τόσο σημαντικές, όσο στα αρνητικά κατά Gram, οι οποίες οδηγούν στην απελευθέρωση λιπιδίων, φωσφολιπιδίων και ενζύμων, που μπορούν να διαταράξουν τη διαπερατότητα της μεμβράνης. Η απώλεια σημαντικών συστατικών για το κύτταρο, οδηγεί στην αναστολή της κυτταρικής αύξησης. Διαταραχή στην διαπερατότητα της μεμβράνης, συμβαίνει και σε χαμηλές θερμοκρασίες λόγω της μειωμένης ρευστότητας της μεμβράνης, ενώ ορισμένες θεραπείες, όπως η θέρμανση, η κατάψυξη, η ξήρανση και η ακτινοβολία, δημιουργούν μικρούς πόρους στην εξωτερική μεμβράνη.

Βλάβη σε πρωτεΐνες και ένζυμα

Ορισμένες επεξεργασίες, με βασικότερη τη θέρμανση, οδηγούν σε αδρανοποίηση των ενζύμων και στην διάσπαση της ενεργούς μεταφοράς κατιόντων, σακχάρων και αμινοξέων.

Βλάβη στα ριβοσώματα και στο RNA

Η αποικοδόμηση των ριβοσωμάτων και του RNA, οφείλεται στις αλλοιώσεις που προκαλεί η θερμική επεξεργασία. Η απώλεια ριβοσωμάτων συμβαίνει, επίσης κατά τη διάρκεια του λοιμού, ιδιαίτερα όταν υπάρχει έλλειψη Mg^{2+} .

Βλάβη στο DNA

Βλάβη στο DNA παρατηρείται στα κύτταρα που έχουν υποστεί θερμική κατεργασία, ψύξη, ξήρανση και προσθήκη οξέων, ως έμμεσο αποτέλεσμα αυτών των κατεργασιών. Για παράδειγμα, κατά τη θερμική επεξεργασία, βλάβη προκύπτει λόγω της διέγερσης της δραστηριότητας των ενδονουκλεασών, ενώ κατά την ψύξη, βλάβη προκύπτει, λόγω απώλειας Mg^{2+} .

1.2.2 Η κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» κύτταρα

Η κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» κύτταρα (viable but nonculturable, VBNC) είναι μια ειδική φυσιολογική κατάσταση, και ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από τον Xu (**Xu et al., 1982**). Καθώς τα βακτήρια βρίσκονται στην VBNC κατάσταση, δεν μπορούν να αναπτυχθούν στα συμβατικά μέσα καλλιέργειας, στα οποία κανονικά θα μπορούσαν να καλλιεργηθούν και να αναπτύξουν αποικίες, αλλά είναι ακόμα ζωντανά. Τα

VBNC κύτταρα, παρότι δεν μπορούν να καλλιεργηθούν, δεν θα πρέπει να θεωρούνται ως νεκρά κύτταρα, γιατί μεταβολικά είναι ενεργά. Οι περισσότεροι ερευνητές πιστεύουν ότι πρόκειται για στρατηγική επιβίωσης, ως απάντηση σε σκληρές περιβαλλοντικές συνθήκες και είναι πλέον σαφές ότι η κατάσταση αυτή φέρει δυνητικούς κινδύνους για τη δημόσια υγεία, ειδικά όταν πρόκειται για παθογόνους μικροοργανισμούς, καθώς μπορεί να γίνει υποεκτίμηση ή μη ανίχνευση των βιώσιμων κυττάρων (**Oliver et al., 2010**). Οι κίνδυνοι προκύπτουν από το γεγονός ότι ενώ τα παθογόνα βακτήρια μπορεί να είναι μη μολυσματικά στην κατάσταση VBNC, μπορούν όμως να επανακτήσουν τη μολυσματικότητά τους, υπό κατάλληλες συνθήκες.

Χαρακτηριστικά των κυττάρων VBNC

Παρά την ανικανότητα για καλλιέργεια σε συμβατικά μέσα, τα κύτταρα VBNC δεν θεωρούνται νεκρά κύτταρα λόγω πολλών διαφορών. Τα νεκρά κύτταρα έχουν μια κατεστραμμένη μεμβράνη, που δεν μπορεί να συγκρατήσει το γενετικό υλικό, ενώ τα κύτταρα VBNC έχουν μια ακέραια μεμβράνη. Ενώ τα νεκρά κύτταρα είναι μεταβολικά ανενεργά, τα κύτταρα VBNC είναι μεταβολικά ενεργά και διεξάγουν αναπνοή. Υψηλό επίπεδο ATP βρέθηκε στη *Listeria monocytogenes* ακόμη και ένα χρόνο μετά την είσοδο στην κατάσταση VBNC. Σε αντίθεση με τα νεκρά κύτταρα, που δεν χρησιμοποιούν πλέον θρεπτικά συστατικά, τα κύτταρα VBNC έδειξαν ότι έχουν συνεχή πρόσληψη αμινοξέων σε πρωτεΐνες (**Fakruddin et al., 2013**).

Αν και τα βακτηριακά κύτταρα VBNC έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα καλλιεργήσιμα κύτταρα, ωστόσο εμφανίζεται μια σειρά φυσιολογικών αλλαγών κατά τη μετάβαση από την κανονική κατάσταση στην κατάσταση VBNC, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής μορφολογίας, σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος και μεμβράνης, τον μεταβολισμό, έκφραση γονιδίων, φυσικές και χημικές αντιστάσεις, ιδιότητες προσκόλλησης και δυναμικό λοιμογόνου δράσης. Σε όρους κυτταρικής μορφολογίας, τα κύτταρα VBNC εμφανίζονται με πιο στρογγυλοποιημένο σχήμα και μικρότερο μέγεθος, πιθανώς για την ελαχιστοποίηση των ενεργειακών απαιτήσεων. Τα κύτταρα VBNC παρουσιάζουν, επίσης σημαντικές διαφορές, στο κυτταρικό τοίχωμα και στη σύνθεση μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, λιπαρών οξέων και πεπτιδογλυκάνης, των οποίων το ποσοστό αυξάνεται, σε αυτή την κατάσταση (**Li et al., 2014**).

Τα κύτταρα VBNC παρουσιάζουν υψηλότερη φυσική και χημική αντίσταση, σε σχέση με τα καλλιεργήσιμα κύτταρα, πιθανώς λόγω του μειωμένου μεταβολικού τους ρυθμού και του κυτταρικού τους τοιχώματος, που ενισχύεται από την αύξηση της διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης. Τέλος, τα κύτταρα VBNC μπορούν να παρουσιάσουν αλλαγές στην προσκόλληση, κάνοντας τα να προσκολλώνται πιο εύκολα σε επιφάνειες και να σχηματίζουν βιομείνια, ενώ παράλληλα, μερικά κύτταρα είναι μολυσματικά σε αυτή την κατάσταση, και μπορούν να προκαλούν μολύνσεις, πιθανώς λόγω της ταχείας ανάκαμψης σε καλλιεργήσιμα κύτταρα.

Παράγοντες που επάγουν την VBNC κατάσταση

Μέχρι σήμερα, έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 85 είδη βακτηρίων, που εισέρχονται στην κατάσταση VBNC, 67 εκ των οποίων είναι παθογόνα, συμπεριλαμβανομένου και του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Τα κύτταρα εισέρχονται σε αυτή την κατάσταση, ως απάντηση σε έναν εκτενή κατάλογο χημικών και περιβαλλοντικών δυσμενών συνθηκών (Wu et al., 2008). Οι φυσικοί παράγοντες που επάγουν τα κύτταρα στην VBNC κατάσταση είναι η έκθεση σε ακραίες θερμοκρασίες, η ξήρανση, το οξειδωτικό στρες, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, ενώ οι χημικοί παράγοντες, περιλαμβάνουν τα συντηρητικά τροφίμων και τα απολυμαντικά. Επιπλέον, κάποιες επεξεργασίες τροφίμων, μπορεί να οδηγήσουν στην επαγωγή των κυττάρων στην VBNC κατάσταση, συμπεριλαμβανομένου της παστερίωσης του γάλακτος και τη χλωρίωση των λυμάτων. Ως απάντηση σε αυτές τις καταπονήσεις, τα κύτταρα, χάνουν την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε αποικίες, εντούτοις παραμένουν βιώσιμα για μεγάλες χρονικές περιόδους.

Παθογένεια των κυττάρων στην VBNC κατάσταση

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πολλά είδη βακτηρίων εισέρχονται στην κατάσταση VBNC, όταν εκτίθενται σε συνθήκες στρες, όπως ο λοιμός και οι χαμηλές θερμοκρασίες, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτή είναι μια προσαρμοστική στρατηγική για την μακροπρόθεσμη επιβίωση των βακτηρίων, κάτω από δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από ορισμένα χαρακτηριστικά των κυττάρων VBNC, συμπεριλαμβανομένης της υψηλότερης αντίστασης στις εξωτερικές συνθήκες καταπόνησης, της ικανότητας επιβίωσης για μεγάλο χρονικό διάστημα υπό συνθήκες στρες και της ικανότητας ανάνηψης (Li et al., 2014). Ωστόσο, οι παθογόνοι οργανισμοί δεν είναι γενικά σε θέση να προκαλέσουν ασθένεια, όταν βρίσκονται στην κατάσταση VBNC, αλλά η λοιμογόνος δράση τους

διατηρείται και η μόλυνση μπορεί να ξεκινήσει, μετά την ανάκαμψή τους, στην κατάσταση ενεργού μεταβολισμού (**Oliver et al., 2010**). Το γεγονός ότι ο μικροοργανισμός δεν είναι μολυσματικός στην VBNC κατάσταση, επιβεβαιώνεται και από τους Cappelier et al., οι οποίοι μελέτησαν τον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*, και αναφέρουν ότι ορισμένες συνθήκες απαιτούνται για να παρατηρήσουν την μολυσματικότητα (**Cappelier et al., 2007**).

Συμπερασματικά, ενώ η ικανότητα εισόδου στην κατάσταση VBNC μπορεί να είναι επωφελής για τα βακτήρια, ωστόσο θέτει σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία, καθώς αυτά τα κύτταρα μπορούν να επανακτήσουν την λοιμογόνο δράση τους, υπό κατάλληλες συνθήκες.

1.2.3 Ανάκαμψη των VBNC κυττάρων

Ο όρος «ανάκαμψη» (resuscitation), αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα VBNC ανακτούν την ικανότητά τους να καλλιεργηθούν, υποδηλώνοντας ότι οι φυσιολογικές και μεταβολικές διαδικασίες των κυττάρων επιστρέφουν σε φυσιολογικά επίπεδα. Ο όρος αυτός χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Roszak et al. (**Roszak et al., 1984**), και μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί 26 παθογόνα βακτήρια, τα οποία έχουν την ικανότητα να ανακάμψουν, συμπεριλαμβανομένου του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Οι συνθήκες ανάκαμψης, διαφέρουν από το ένα βακτήριο στο άλλο, και μόνο υπό κατάλληλες συνθήκες τα κύτταρα VBNC, επιτυγχάνουν να ανακάμψουν (**Zhao et al., 2017**).

Μέχρι σήμερα, έχει αποδειχθεί ότι η μολυσματικότητα των παθογόνων VBNC έχει ανακτηθεί ή διατηρηθεί μετά την ανάκαμψή τους. Για παράδειγμα, ανακτημένα κύτταρα VBNC του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, διατηρούν την μολυσματικότητά τους και προκαλούν βλάβες σε ποντίκια, οδηγώντας ακόμα και στον θάνατο (**Cappelier et al., 2007**). Τα κύτταρα VBNC, μπορούν να ανακάμψουν εντός συγκεκριμένου χρόνου, από τη στιγμή που εισέλθουν σε αυτή την κατάσταση. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος, η ικανότητα για ανάκαμψη χάνεται και επομένως τα κύτταρα οδηγούνται σε θάνατο. Το χρονικό διάστημα για ανάκαμψη συνδέεται άμεσα με το βακτηριακό είδος και ηλικία, τις συνθήκες επαγωγής των κυττάρων στην VBNC κατάσταση και τις συνθήκες ανάκαμψης μετά την είσοδο στην κατάσταση αυτή (**Senoh et al., 2010**).

Παράγοντες που επάγουν την «ανάκαμψη» των VBNC κυττάρων

Γνωρίζοντας ότι τα ανακτημένα κύτταρα παθογόνων μικροοργανισμών, μπορούν να προκαλέσουν άμεσα ανθρώπινες ασθένειες, είναι απαραίτητο να κατανοηθούν οι παράγοντες, που συντελούν στην ανάκαμψη και να ληφθούν αποτελεσματικά μέτρα για την αποφυγή εμφάνισης κινδύνων στα τρόφιμα. Η ανάκαμψη των κυττάρων VBNC μπορεί να προκληθεί από μια ποικιλία ερεθισμάτων, εκ των οποίων η συνηθέστερη είναι η απομάκρυνση των παραγόντων στρες, όπως η αύξηση της συγκέντρωσης θρεπτικών ουσιών, η αύξηση ή η μείωση της θερμοκρασίας, η παρουσία χημικών ερεθισμάτων (**Dong et al., 2019**).

Η προσθήκη θρεπτικών συστατικών μπορεί να συμβάλλει στην ανάκαμψη των VBNC κυττάρων, με βάση τους Pinto et al., οι οποίοι απέδειξαν ότι ένας συνδυασμός μεθειονίνης, γλουταμίνης, θρεονίνης, σερίνης και ασπαραγίνης διευκόλυνε σημαντικά την ανάκαμψη VBNC κυττάρων *E.coli*, καθώς οι τοξικές συγκεντρώσεις ουσιών σε συνθήκες λοιμού, εμπόδιζαν την καλλιεργησιμότητά του. Ωστόσο, η αναστροφή των δυσμενών συνθηκών δεν μπορεί να προάγει την ανάκαμψη όλων των κυττάρων VBNC (**Pinto et al., 2011**). Καθώς τα κύτταρα VBNC παρουσιάζουν αυξημένη οξειδωτική βλάβη και μειωμένη δραστηριότητα δισμουτάσης υπεροξειδίου, θεωρείται ότι η εφαρμογή εξωγενών αντιοξειδωτικών, όπως καταλάση, δισμουτάση υπεροξειδίου και πυροσταφυλικό νάτριο, απομακρύνουν τα υπεροξειδία από το μέσο καλλιέργειας και να προωθούν την ανάκαμψη (**Dong et al., 2019**).

Πέρα όμως από τους παραπάνω παράγοντες, η ανάκαμψη των κυττάρων, μπορεί να συμβεί και με βιολογικά ερεθίσματα. Για παράδειγμα, ο ξενιστής είναι ένα φυσικό καταφύγιο για την ανάκαμψη των κυττάρων VBNC, όπως του *E. coli* και του *C. jejuni*, όμως δεν μπορεί να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, καθώς τα θρεπτικά συστατικά, που χρειάζονται για την ανάκαμψη των VBNC κυττάρων μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου και τα κύτταρα του ξενιστές, δεν μπορούν πάντα να ικανοποιήσουν αυτές τις απαιτήσεις (**Dong et al., 2019**).

1.3 Επιβίωση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε συνθήκες καταπόνησης

1.3.1 Επιβίωση του μικροοργανισμού σε συνθήκες όξινης καταπόνησης

Η οξίνιση των τροφίμων, είναι μια μέθοδος συντήρησης των τροφίμων, που εφαρμόζεται εδώ και αιώνες, ευρέως στα περισσότερα φυτικά και γαλακτοκομικά προϊόντα και το κρέας (**Hill**

et al., 2017). Η συντηρητική δράση επιτυγχάνεται, αφενός, από τα μεταβολικά τελικά προϊόντα, τα οποία είναι ασθενή οργανικά οξέα (π.χ. οξικό, γαλακτικό), τα οποία έχουν αντιμικροβιακή δράση και αφετέρου, από την αναστολή της μικροβιακής ανάπτυξης σε χαμηλά επίπεδα pH. Για να προκαλέσει ασθένεια, ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*, πρέπει σε πρωταρχικό στάδιο να επιβιώσει από τις αντίξοες συνθήκες που δημιουργούνται κατά την επεξεργασία των τροφίμων, και έπειτα να ξεπεράσει τα φυσιολογικά εμπόδια, που συναντά κατά την είσοδό του, στον ανθρώπινο οργανισμό. Για παράδειγμα, το χαμηλό pH του ανθρώπινου στομάχου είναι ένα σημαντικό εμπόδιο άμυνας του ξενιστή έναντι παθογόνων μικροοργανισμών που μεταδίδονται με τρόφιμα. Ωστόσο, μέσω πολλαπλών μηχανισμών, ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* μπορεί να αποκτήσει ενισχυμένη αντοχή στην όξινη καταπόνηση (acid tolerance response, ATR), συμπεριλαμβανομένης της F_0F_1 -ATPάση, της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού οξέος (GAD) και το σύστημα δεμινάσης της αργινίνης (ADI) (**Bucur et al., 2018**).

F_0F_1 -ATPάση

Η ενέργεια που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί, για να διατηρούν την ομοιόσταση του pH τους, προέρχεται από την υδρόλυση του ATP σε ADP και ανόργανο φωσφορικό P_i . Ο ρόλος της F_0F_1 -ATPάσης σε οργανισμούς, που είναι ικανοί για οξειδωτική φωσφορυλίωση, είναι να συνθέσει αερόβια την ATP, ως αποτέλεσμα της διέλευσης των πρωτονίων εντός του κυττάρου, και να δημιουργήσει μία κινητική δύναμη πρωτονίων (PMF) αναεροβίως, μέσω της αποβολής πρωτονίων από το κύτταρο, χρησιμοποιώντας ενέργεια από την υδρόλυση του ATP. Με βάση τον τελευταίο μηχανισμό, η F_0F_1 -ATPάση μπορεί να αυξήσει το ενδοκυτταρικό pH σε καταστάσεις όπου οξινίζεται το κύτταρο και να επέρχεται η ομοιόστασή του.

Η F_0F_1 -ATPάση είναι ένα ένζυμο πολλαπλών υπομονάδων που αποτελείται από ένα καταλυτικό τμήμα F_1 , που μπορεί να συνθέσει ή να υδρολύσει το ATP και αποτελείται από τις υποομάδες α , β , γ , δ και ϵ . Το τμήμα F_0 , αποτελείται από τις υποομάδες a , b και c και λειτουργεί ως διαμεμβρανικός διάυλος για την μετατόπιση των πρωτονίων (**Cotter et al., 2000**) (**Smith et al., 2013**). Οι Cotter et al., χρησιμοποίησαν τον αναστολέα ATPάσης N,N-Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD), για να μελετήσουν την επίδραση της F_0F_1 -ATPάσης στην αντοχή στην όξινη καταπόνηση (ATR) του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Εντέλει, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η F_0F_1 -ATPάση παίζει σημαντικό ρόλο στην αντοχή των όξινα προσαρμοσμένων κυττάρων σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, καθώς

παρατηρήθηκε διαφορά ανθεκτικότητας τριών λογαριθμικών κύκλων σε χαμηλό pH, σε σχέση με τα κύτταρα που υπέστησαν κατεργασία με τον αναστολέα DCCD.

Σύστημα Αποκαρβοξυλάσης του Γλουταμινικού Οξέος (glutamate decarboxylase system GAD)

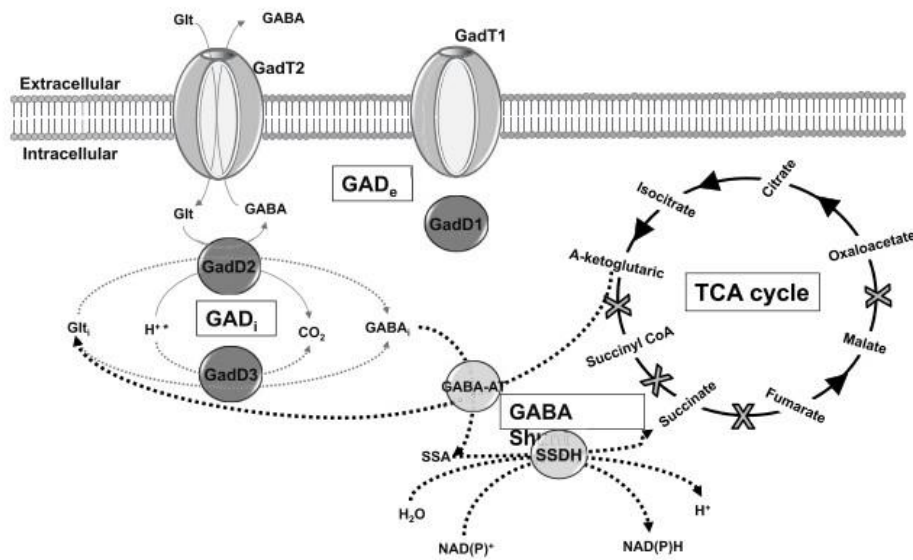
Για να προκαλέσει μόλυνση, ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* απαιτεί ισχυρούς μηχανισμούς αντίστασης σε οξύ για να διασχίσει το όξινο περιβάλλον του στομάχου και να εισχωρήσει στα κύτταρα του ξενιστή. Το σύστημα γλουταμινικής αποκαρβοξυλάσης (GAD), είναι ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς για να επιβιώσει ο μικροοργανισμός σε όξινες συνθήκες καταπόνησης (Cotter et al., 2005). Ο ακριβής μηχανισμός του συστήματος δεν είναι καλά κατανοητός, ωστόσο οι περισσότερες μελέτες υποδεικνύουν ότι ένα ανεπαρκές σύστημα GAD οδηγεί σε μείωση των ενδιάμεσων του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) και άλλων μορίων, όπως το NADPH, τα οποία έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα (Boura et al., 2019).

Το σύστημα GAD για τον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*, περιλαμβάνει τρία ένζυμα γλουταμινικής αποκαρβοξυλάσης (GadD1, GadD2 και GadD3) και δύο αντιμεταφορείς γλουταμινικού/γ-αμινοβουτυρικού (GadT1 και GadT2). Τα 5 αυτά γονίδια οργανώνονται σε τρεις συνδυασμούς : gadD1T1, gadT2D2, and gadD3. Το γονίδιο gadT2D2 παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του μικροοργανισμού υπό εξαιρετικά όξινες συνθήκες, ενώ το γονίδιο gadD1T1 αναφέρεται ότι ενισχύει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού υπό ήπιες όξινες συνθήκες (Karatzas et al., 2012).

Η έκφραση του συστήματος GAD από το παθογόνο, είναι κρίσιμης σημασίας για την αντοχή του, κατά τη διέλευσή του από το όξινο περιβάλλον του στομάχου, ώστε να οδηγήσει σε μόλυνση του λεπτού εντέρου. Σύμφωνα, με τους Cotter et al., η επιβίωση των κυττάρων αυξάνεται δραματικά όταν αυτά ενισχύονται με γλουταμινικό, υποδεικνύοντας ότι τα επίπεδα γλουταμινικού στα τρόφιμα και στο υγρό του στομάχου, αυξάνουν την γαστρική επιβίωση του παθογόνου. Αντίθετα, η εξάλειψη του συστήματος GAD, έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να γίνονται πιο ευάλωτα στο χαμηλό pH του στομάχου και να θανατώνονται γρηγορότερα.

Όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε χαμηλό pH, ένα μόριο ενδοκυτταρικού γλουταμινικού μετατρέπεται σε γ-αμινοβουτυρικό άλας (GABA), καταναλώνοντας ένα ενδοκυτταρικό πρωτόνιο και μειώνοντας, έτσι, τη συγκέντρωση πρωτονίων στο κυτταρόπλασμα. Στη

συνέχεια, το GABA μεταφέρεται εκτός του κυττάρου, μέσω ενός αντιμεταφορέα γλουταμινικού/γ-αμινοβουτυρικού, για να ενσωματωθεί ένα εξωκυτταρικό γλουταμινικό και το σύστημα να καταναλώσει ένα άλλο ενδοκυτταρικό πρωτόνιο. Η απώλεια πρωτονίων από το κύτταρο, συμβάλλει στην αύξηση του pH του κυτταροπλάσματος και την απελευθέρωση γ-αμινοβουτυρικού στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, αυξάνοντας το εξωκυτταρικό pH. (Cotter et al., 2001)



Σχήμα 3 Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος GAD σε συνθήκες όξινης καταπόνησης και η σύνδεσή του με τον κύκλο TCA (Boura et al., 2019).

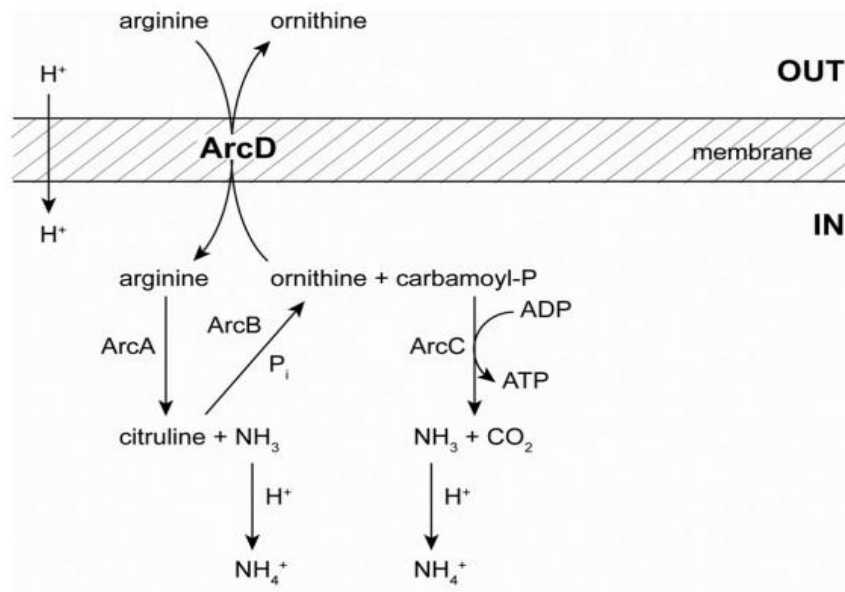
Σύστημα δεμινάσης της αργινίνης (arginine deiminase, ADI)

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* διαθέτει έναν αριθμό πιθανών μηχανισμών για τη διατήρηση της ομοιόστασης του pH, που αρχικά επιτρέπουν την επιβίωσή του σε τρόφιμα χαμηλού pH. Σε πολλά βακτηριακά γένη, ο καταβολισμός της αργινίνης μέσω της οδού δεμινάσης της αργινίνης, έχει συνδεθεί με αυξημένη ικανότητα των κυττάρων να επιβιώνουν σε όξινα περιβάλλοντα.

Το σύστημα δεμινάσης της αργινίνης περιλαμβάνει τρία ενζυμα : τη δεμινάση αργινίνης (ArcA), την καρβαμυλοτρανφεράση καταβολικής ορνιθίνης (ArcB) και την καρβαμική κινάση (ArcC). Τα γονίδια αυτά εκφράζονται όταν επικρατούν αναερόβιες συνθήκες χαμηλού pH (5.0) και παρουσία αργινίνης.

Το σύστημα ADI ξεκινάει με ένα μόριο ορνιθίνης να μεταφέρεται έξω από το κύτταρο, ενώ ένα μόριο αργινίνης εισέρχεται σε αυτό, με τη βοήθεια ενός αντιμεταφορέα μεμβράνης αργινίνης-ορνιθίνης, που κωδικοποιείται από το γονίδιο ArcD. Η αμμωνία που παράγεται συνδυάζεται με ενδοκυτταρικά πρωτόνια προς σχηματισμό NH_4^+ , τα οποία αυξάνουν το ενδοκυτταρικό pH, προστατεύοντας το κύτταρο από τις θανατηφόρες όξινες συνθήκες του περιβάλλοντος. Επιπλέον, για κάθε mole αργινίνης που καταναλώνεται, παράγεται ένα mole ATP, επιτρέποντας την απομάκρυνση κυτταροπλασματικών πρωτονίων από τις F_0F_1 -ATPασες, που όπως αναφέρθηκε σε παραπάνω παράγραφο είναι σημαντικές για την ομοίωση του pH (Ryan et al., 2009).

Οι Ryan et al., απέδειξαν τη σπουδαιότητα του συστήματος ADI, για την προστασία των κυττάρων σε πολύ όξινες συνθήκες, καθώς όταν αυτά εκτέθηκαν σε ένα ήπιο όξινο pH 4.8, χωρίς τα γονίδια του συστήματος, τότε τα κύτταρα εμφάνισαν σημαντικά μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης, ενώ σε ένα θανατηφόρο pH 3.5, η μείωση ήταν ακόμα μεγαλύτερη.



Σχήμα 4 Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος δεμινάσης της αργινίνης

1.3.2 Παράγοντες καταπόνησης

Οξικό οξύ (acetic acid, AA)

Το οξικό οξύ (acetic acid), ή αλλιώς αιθανοϊκό οξύ, είναι ένα ανασταλτικό παραπροϊόν αλκοολικής ζύμωσης, που διεξάγεται από τον μύκητα, *Saccharomyces cerevisiae* (Palma et al., 2018). Ταξινομείται στα ασθενή οργανικά οξέα και έχει χημικό τύπο CH_3COOH . Το οξικό οξύ αποτελεί το βασικό συστατικό του ξυδιού, εκτός του νερού, καθώς βρίσκεται σε συγκέντρωση 5%. Το ξύδι είναι ένα από τα πιο γνωστά όξινα καρυκεύματα σε όλο τον κόσμο. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως, σε όλους σχεδόν τους πολιτισμούς από τους αρχαίους χρόνους και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ως ενισχυτικό γεύσης, φαρμακευτικό, καθαριστικό και συντηρητικό, καθώς ασκεί αντιμικροβιακή δράση κυρίως έναντι των βακτηρίων και λιγότερο έναντι των ζυμών και των μυκήτων. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ), έχουν αναγνωρίσει τα οργανικά οξέα ως ασφαλείς ουσίες και έχουν εγκριθεί ως πρόσθετα τροφίμων (Gonzalez-Fandos et al., 2014).

Για την πρόληψη των παθογόνων μικροοργανισμών και μικροοργανισμών αλλοίωσης τροφίμων, σε πολλά τρόφιμα και κυρίως σε έτοιμα προς κατανάλωση (RTE), προστίθενται ασθενή οργανικά οξέα, όπως το οξικό. Η αντιμικροβιακή δράση των ασθενών οργανικών οξέων, πιθανώς οφείλεται στο ότι προκαλούν κυτταροπλασματική οξίνιση. Στις ήπια όξινες τροφές, υπάρχουν οργανικά οξέα τόσο στις πρωτονιωμένες, όσο και στις μη – πρωτονιωμένες μορφές. Η αδιάστατη (πρωτονιωμένη) μορφή του ασθενούς οργανικού οξέος, μπορεί να διεισδύσει εύκολα στα μικροβιακά κύτταρα και στη συνέχεια συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα. Αν το περιβάλλον του κυτταροπλάσματος είναι πιο αλκαλικό από το pK_a του οξέος, τότε τα μόρια του οξέος, θα αρχίσουν να απελευθερώνουν πρωτόνια στο κυτταρόπλασμα, οδηγώντας σε μια συνολική μείωση στο κυτταροπλασματικό pH. Αν το κύτταρο δεν μπορέσει να αυξήσει το pH του κυτταροπλάσματος, αναστέλλεται η ανάπτυξη του ή οδηγείται σε θάνατο (Heavin et al., 2009).

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* μπορεί να πολλαπλασιάζεται σε ένα pH 4.3 και να επιβιώνει σε χαμηλότερο pH 3.3, ωστόσο το οξύ που χρησιμοποιείται για να μειώσει το pH του μέσου, είναι καθοριστικός παράγοντας για την συμπεριφορά του μικροοργανισμού. Για παράδειγμα, τα ασθενή οξέα, όπως το οξικό, είναι πιο αποτελεσματικοί παράγοντες στην αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού, σε σχέση με τα ισχυρά οξέα, καθώς έχουν

υψηλότερο pK_a . Επίσης, το οξικό οξύ, είναι πιο δραστικό από το κιτρικό ή το γαλακτικό. (Sorrells et al., 1989)

Υδροχλωρικό οξύ (Hydrochloric acid, HCl)

Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα περισσότερα τρόφιμα, όπως το κρέας, τα λαχανικά και τα ψάρια, παρουσιάζουν ελαφρώς όξινο pH, ενώ σε άλλα τρόφιμα επικρατεί αλκαλικό pH, όπως συμβαίνει στο ασπράδι του αυγού. Η αλλαγή της οξύτητας των τροφίμων είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια, ως τρόπος συντήρησης των τροφίμων, που χρησιμοποιείται σε όλο τον κόσμο (Levandowsky, 1980). Για τη μεταβολή του pH των μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται ισχυρά οξέα, ασθενή οξέα και ιόντα. Ισχυρά οξέα, που συνήθως χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα, είναι το υδροχλωρικό και το φωσφορικό.

Το υδροχλωρικό οξύ HCl είναι το κύριο συστατικό του γαστρικού οξέος, το οποίο παράγεται φυσικά στο ανθρώπινο στομάχι και συντελεί στην πέψη των τροφίμων και στην απορρόφηση θρεπτικών συστατικών. Επιπλέον, το γαστρικό υγρό διατηρεί το pH του στομάχου από 1 έως 2, ενεργώντας ως φραγμός έναντι μικροοργανισμών.

Πέρα από τη φυσική του παρουσία στον ανθρώπινο οργανισμό, το υδροχλωρικό οξύ μπορεί να παραχθεί και συνθετικά για μια ποικιλία βιομηχανικών και εμπορικών εφαρμογών. Η βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιεί το υδροχλωρικό οξύ για την επεξεργασία μιας ποικιλίας προϊόντων διατροφής. Τα τρόφιμα και τα ποτά περιέχουν μικρές ποσότητες του οξέος που εξουδετερώνονται και ρυθμίζονται κατά την κατάποση και την πέψη ή μετά την απορρόφηση, σύμφωνα με τον FDA.

Το υδροχλωρικό οξύ, επίσης, χρησιμοποιείται και ως απολυμαντικό, αλλά και για την παραγωγή διαφόρων χημικών ουσιών.

1.3.3 Επιβίωση του μικροοργανισμού σε συνθήκες οσμωτικής καταπόνησης

Ο έλεγχος της ενεργότητας ύδατος, χρησιμοποιείται ως μέσο διατήρησης των τροφίμων, εδώ και χιλιάδες χρόνια. Ως μέσο μείωσης της ενεργότητας ύδατος ενός τροφίμου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τεχνικές, όπως η ξήρανση, ή η προσθήκη ουσιών, όπως σάκχαρα ή χλωριούχο νάτριο, που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μόρια νερού και έτσι να μειώνουν

το διαθέσιμο νερό για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (**Gutierrez et al., 1995**). Καθώς μειώνεται ο συντελεστής ενεργότητας ύδατος στο περιβάλλον του μικροοργανισμού, τα κύτταρα υφίστανται έντονες ωσμωτικές δυνάμεις και χάνουν γρήγορα νερό με την πλασμόλυση που υφίστανται, με αποτέλεσμα να διακόπτεται η ανάπτυξη των κυττάρων, τα οποία είτε πεθαίνουν είτε παραμένουν σε κατάσταση λήθαργου (**O'Byrne et al., 2002**).

Στη βιομηχανία τροφίμων, το αλάτι σε συνδυασμό με άλλες «ήπιες τεχνολογίες» χρησιμοποιείται συχνά ως συντηρητικό και αντιβακτηριακός παράγοντας, λόγω των ανασταλτικών επιπτώσεών του στην ανάπτυξη μικροοργανισμών σε τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση (RTE), θαλασσινά και ζυμωμένα τρόφιμα, όπως τα αλλαντικά, το τυρί, τα φρούτα και τα λαχανικά. Επιπλέον, το αλάτι θεωρείται συχνά απαραίτητο πρόσθετο για την ενίσχυση της γεύσης, της υφής και της διάρκειας ζωής των προϊόντων, καθώς μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα βακτηριακά κύτταρα διακόπτοντας τη διατήρηση της ωσμωτικής ισορροπίας μεταξύ του κυτταροπλασματικού και του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος (**Burgess et al., 2016**). Ωστόσο, τα βακτήρια, συμπεριλαμβανομένου του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, έχουν αναπτύξει περίπλοκους μηχανισμούς, για να αντιμετωπίσουν την ωσμωτική καταπόνηση, που δέχονται από το περιβάλλον.

Η προσαρμοστικότητα του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στην οσμωτική καταπόνηση, φαίνεται να εξαρτάται από την ικανότητα του οργανισμού να συσσωρεύει καρνιτίνη, που βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης και βεταΐνη, η οποία βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα ζαχαρότευτλα και σε άλλες τροφές φυτικής προέλευσης (**Gutierrez et al., 1995**). Η συσσώρευση βεταΐνης και καρνιτίνης διεγείρουν την ανάπτυξη του παθογόνου σε περιβάλλοντα με υψηλή οσμωτικότητα. Έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα μεταφέρουν βεταΐνη 200 φορές ταχύτερα σε υψηλή συγκέντρωση άλατος (χλωριούχο νάτριο 4%) από ό, τι χωρίς πρόσθετο άλας και 15 φορές ταχύτερα στους 7°C από τους 30 °C (**O'Byrne et al., 2002**).

Οι ενώσεις βεταΐνη και καρνιτίνη δεν μπορούν να συντεθούν από τον μικροοργανισμό, αλλά η συσσώρευσή τους επιτυγχάνεται με ενεργή μεταφορά από το περιβάλλον. Η βεταΐνη συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά, χρησιμοποιώντας έναν δευτερεύοντα μεταφορέα BetL, ο οποίος ενεργοποιείται από την αυξημένη οσμωτικότητα, και τον Gbu, που είναι ένας ATP-εξαρτώμενος μεταφορέας και αποτελείται από τις υπομάδες GbuA, GbuB και GbuC. Ο μεταφορέας Gbu ενεργοποιείται από αυξημένη οσμωτική πίεση ή από χαμηλή θερμοκρασία. Οι Sleator et al. απέδειξαν ότι σε στελέχη που είχε αφαιρεθεί το γονίδιο BetL, είχε μειωθεί

σημαντικά η μεταφορά βεταΐνης, σε σχέση με τα στελέχη που είχαν το γονίδιο (**Sleator et al. 1999**), ενώ με την απουσία του γονιδίου Gbu, τα στελέχη δεν ήταν ικανά να χρησιμοποιήσουν την βεταΐνη, καθιστώντας το γονίδιο Gbu ως το κυρίαρχο γονίδιο πρόσληψης βεταΐνης σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (**Angelidis et al., 2003**). Η μεταφορά την καρνιτίνης, αντίστοιχα, συμβαίνει μέσω του ATP-εξαρτώμενου μεταφορέα OpuC, ο οποίος κωδικοποιείται από ένα οπερόνιο τεσσάρων γονιδίων, opuCA, opuCB, opuCC και opuCD. Στελέχη του μικροοργανισμού, που είχε απενεργοποιηθεί το οπερόνιο OpuC, δεν είχαν την ικανότητα να μεταφέρουν καρνιτίνη, ωστόσο παρατηρήθηκε μεταφορά χαμηλής συγκέντρωσης καρνιτίνης, μέσω εναλλακτικών μεταφορέων (**Fraser et al., 2002**).

1.4 Στοχαστικότητα

Η παραλλακτικότητα είναι χαρακτηριστικό των βιολογικών φαινομένων, καθώς τα μεμονωμένα κύτταρα μέσα σε ένα γενετικά ομογενή πληθυσμό, εμφανίζουν ανόμοιους φαινοτύπους. Αυτή η ετερογένεια είναι έκδηλη σε ένα ευρύ φάσμα φαινοτύπων, συμπεριλαμβανομένης της ατομικής συμπεριφοράς των κυττάρων, πολλοί από τους είναι θεμελιώδεις για τη φυσική κατάσταση και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. (**Avery et al., 2006**)

Είναι γνωστό ότι τα βακτήρια αντιδρούν στο δυσμενές περιβάλλον επάγοντας την έκφραση των γονιδίων ανθεκτικότητας. Η στοχαστικότητα περιγράφει την τάση βακτηρίων να αναπτύσσουν διαφορετικά είδη συμπεριφοράς για να ανταποκρίνονται στις πιθανές δυσμενείς αλλαγές στο περιβάλλον στα πλαίσια της απόκρισής τους σε καταπονήσεις. (**Keams et al., 2005**)

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί επωφελούνται από τη δημιουργία διαφόρων υποπληθυσμών που δύναται να είναι καλύτερα εξοπλισμένοι ώστε να επιβιώνουν κατά τη διάρκεια μιας διαταραχής και να αξιοποιούν τις νέες συνθήκες. Εξάλλου, η φαινοτυπική ετερογένεια δεν επικαλείται μια μη αναστρέψιμη κατάσταση, επιτρέποντας έτσι τη γρήγορη επαναστροφή στον αρχικό φαινότυπο, αν χρειαστεί. Τα οφέλη της φαινοτυπικής ετερογένειας στη φυσική κατάσταση του πληθυσμού υποστηρίζονται από τα αυξανόμενα αποδεικτικά στοιχεία υπέρ της εξελικτικής επιλογής των μηχανισμών που παράγουν ποικιλότητα στους μικροοργανισμούς (**Fraser et al., 2004**).

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που οδηγούν σε κυτταρική ετερογένεια. Η ετερογένεια μπορεί να είναι γενετική, αν έχει συμβεί κάποια μετάλλαξη στον πληθυσμό των κυττάρων, ή φαινοτυπική αν οφείλεται σε εξωγενείς ή εγγενείς παράγοντες (Goldman et al., 2019). Παραδείγματα εμφάνισης ετερογένειας έχουν παρατηρηθεί σε περιπτώσεις θερμικής και μη-θερμικής απενεργοποίησης υπό δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, καθώς και σε ήπιες συνθήκες ωσμωτικής και όξινης καταπόνησης.

1.5 Υπόθεση Εργασίας

Η παρούσα ερευνητική μελέτη εστιάζει στην περιγραφή της απόκρισης βιώσιμων βακτηριακών κυττάρων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε διάφορες συνθήκες όξινης καταπόνησης, που εντοπίζονται σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων. Στην Βιομηχανία Τροφίμων, οι μικροοργανισμοί αντιμετωπίζουν συχνά υποθανάτιες καταπονήσεις ή καταφέρνουν να επιβιώσουν, έπειτα από έκθεση σε ένταση καταπόνησης, η οποία θεωρούταν θανατηφόρα. Επομένως, η μελέτη του τραυματισμού και της πιθανής ανάκαμψης, τροφιμογενών μικροοργανισμών, από συνθήκες καταπόνησης που συναντώνται στη Βιομηχανία Τροφίμων, παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον.

Στόχος του πειράματος, αποτελεί η ποσοτική μελέτη του υποθανάτιου τραυματισμού του μικροοργανισμού και η ανακάλυψη των βασικών μηχανισμών επαγωγής και ανθεκτικότητας του παθογόνου μικροοργανισμού, αποκαλύπτοντας πιθανούς κινδύνους που ενέχει για τη δημόσια υγεία.

Για την αξιολόγηση και ποσοτικοποίηση του υποθανάτιου τραυματισμού, το στέλεχος ScottA (ορότυπος 4b), υποβλήθηκε σε όξινη καταπόνηση, χρησιμοποιώντας το οξικό οξύ (AA) και το υδροχλωρικό οξύ (HCl), συγκρίνοντας τον πληθυσμό του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, όπως αυτός προσδιορίστηκε σε επιλεκτικά και μη επιλεκτικά μέσα. Ως μη επιλεκτικό μέσο, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Tryptic Soy Agar με 0.6% Yeast Extract (TSA-Ye) με 0% w/v NaCl, ενώ ως επιλεκτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Tryptic Soy Agar με 0.6% Yeast Extract (TSA-Ye) συμπληρωμένο με 5% w/v NaCl.

Οι θερμοκρασίες, που επιλέχθηκαν για την μελέτη της επίδρασης των παραπάνω δύο οξέων στα κύτταρα του μικροοργανισμού, ήταν οι 20°C και 4°C. Η θερμοκρασία των 20°C επιλέχθηκε καθώς πολλά τρόφιμα διατηρούνται στα ράφια σε αυτή τη θερμοκρασία, ενώ παράλληλα το βακτήριο παρουσιάζει έντονη κινητικότητα. Παράλληλα, ο μικροοργανισμός

πέρα από υψηλότερες θερμοκρασίες, αναπτύσσεται και σε χαμηλότερες, περιλαμβανομένων των 4°C. Η θερμοκρασία αυτή, είναι επίσης ενδιαφέρουσα, καθώς πολλά RTE τρόφιμα, αποθηκεύονται στους 4°C, για μεγάλα χρονικά διαστήματα και συχνά επιμολύνονται με το βακτήριο.

Για την ανίχνευση της κατάστασης VBNC, χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα δύο διαφορετικές μέθοδοι και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν συνδυαστικά. Πιο συγκεκριμένα, με την μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης (Plates), αξιολογήθηκε η ικανότητα διατήρησης της καλλιιεργησιμότητας, ενώ με την Μικροσκοπία Φθορισμού (Fluorescence Microscopy) εκτιμήθηκε η φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων (ζωντανά, τραυματισμένα, VBNC, νεκρά). Προκειμένου, να προσδιοριστούν τα κύτταρα VBNC, συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα από την μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης, με αυτά της Μικροσκοπίας Φθορισμού, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν οι φθοροφόρες ουσίες CFDA και Ιωδιούχο Προπίδιο PI.

Η ικανότητας ανάκαμψης των κυττάρων, παρακολουθήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους. Η πρώτη μέθοδος αφορά την ανάκαμψη μέσα σε θρεπτικό μέσο TSB-Ye στους 37°C και στη δεύτερη μέθοδο παρακολουθήθηκε η ανάκαμψη επάνω σε θρεπτικό μέσο TSA-Ye στους 37°C.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Στέλεχη *Listeria monocytogenes*

Το στέλεχος του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος της παρούσας μελέτης, είναι το ScottA. Το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος προμηθεύτηκε από τη μικροβιακή συλλογή του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το στέλεχος ανήκει στον ορότυπο 4b.

2.2 Προετοιμασία εμβολίου

Το βακτηριακό στέλεχος του μικροοργανισμού ήταν αποθηκευμένο σε θρεπτικό υλικό Tryptone Soy Broth εμπλουτισμένο με 0.6% Yeast Extract (TSB-Ye) με 20 % v/v γλυκερόλη, στους -20°C , και διατηρούταν, υπό κατάψυξη, για ένα χρόνο. Από αυτή την καλλιέργεια stock, γίνονταν δύο ανανεώσεις, η πρώτη στις 24 ώρες και η δεύτερη στις 18 ώρες σε TSB-Ye στους 30°C , και πραγματοποιούταν γραμμική εξάπλωση (streaking) σε τρυβλία Tryptone Soy Agar εμπλουτισμένα με 0.6% Yeast Extract (TSA-Ye). Τα τρυβλία επωάζονταν για 48 ώρες στους 37°C , προκειμένου να ελεγχθούν για την καθαρότητά τους, και έπειτα φυλάσσονταν σε θερμοκρασία ψύξης, στους 4°C , για ένα μήνα.

Για την προετοιμασία του εμβολίου, η διαδικασία ξεκινάει με την ανανέωση της καλλιέργειας του μικροοργανισμού, προκειμένου να ανακτήσει τη ζωτικότητα του, και έπειτα ακολουθεί η φυγοκέντρηση του εμβολίου. Η πρώτη ανανέωση γίνεται με την μεταφορά μιας αποικίας του μικροοργανισμού από τα τρυβλία stock, με τη βοήθεια αποστειρωμένου βακτηριακού κρίκου, σε πλαστικό σωλήνα Falcon όγκου 15 mL, που περιέχει 10 mL αποστειρωμένου TSB-Ye και επωάζεται για 24 ώρες στους 30°C . Κατά τη δεύτερη ανανέωση, γίνεται μεταφορά 100 μL της πρώτης ανανέωσης σε ένα νέο πλαστικό σωλήνα Falcon, που περιέχει 10 mL αποστειρωμένου TSB-Ye και επωάζεται για 18 ώρες στους 30°C .

Η φυγοκέντρηση του εμβολίου, που ακολουθεί, γίνεται προκειμένου να καθαριστεί, δηλαδή να απομακρυνθούν τα θρεπτικά συστατικά και οι μικροβιακοί μεταβολίτες των κυττάρων, που υπάρχουν στο μέσο. Γίνονται δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 3600 rpm στροφές

στους 4°C, για 10 λεπτά. Μετά από κάθε φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο που προκύπτει, απορρίπτεται και επαναδιαλύεται το ίζημα, σε 10 mL αποστειρωμένου ισοτονικού διαλύματος Ringer ¼ strength, ώστε η τελική συγκέντρωση των κυττάρων του μικροοργανισμού να είναι ίση με 10⁹ CFU/mL.

2.3 Θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης

2.3.1 Μη επιλεκτικά μέσα ανάπτυξης

Ως μη επιλεκτικό μέσο ανάπτυξης, που χρησιμοποιήθηκε για την επιφανειακή επίστρωση των κυττάρων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, επιλέχθηκε το Tryptone Soy Agar ενισχυμένο με 0.6% Yeast Extract (TSA-Ye). Για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος ακολουθούνται οι οδηγίες της εταιρείας, από την οποία το εργαστήριο προμηθεύτηκε το υλικό (Sigma-Aldrich). Για 1 λίτρο παρασκευάσματος ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας 40g TSA. Σε αυτό προστίθενται 6g Yeast Extract και 1 λίτρο 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 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 ενισχυμένο με 0.6% περιεκτικότητα Yeast Extract (TSB-Ye), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των διαδοχικών ανακαλλιεργειών, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.2.

2.3.2 Επιλεκτικά μέσα ανάπτυξης

Ως επιλεκτικό μέσο ανάπτυξης, που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του τραυματισμού, επιλέχθηκε το TSA-Ye με προσθήκη 5% w/v NaCl. Η παρασκευή του επιλεκτικού υποστρώματος, έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω, με τη διαφορά ότι ζυγίζονται και προστίθενται 50g NaCl. Ακολουθεί σταδιακή προσθήκη απιονισμένου νερού, με τελικό όγκο 1 L και αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Τα τρυβλία με το επιλεκτικό υπόστρωμα επωάζονται για 5 μέρες στους 37°C. Η χρήση του επιλεκτικού υποστρώματος στοχεύει στην εκτίμηση του ποσοστού των τραυματισμένων κυττάρων, τα οποία αναπτύσσονται μόνο στο γενικό υπόστρωμα, ενώ τα υγιή δίνουν ορατές αποικίες και στα δύο υποστρώματα.

2.4 Παράγοντες όξινης καταπόνησης

2.4.1 Οξικό οξύ (Acetic Acid, AA)

Για την παρασκευή οξικού διαλύματος 1M, διαλύονται 2.87 ml πυκνού οξικού οξέος σε 50 ml 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 προστίθενται σταδιακά σε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer 50 ml. Παρουσία ηλεκτροδίου οι τιμές του pH καταγράφονται έως ότου επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα κάθε φορά (pH 3, 2.7, 2.5).

2.4.2 Υδροχλωρικό οξύ (Hydrochloric acid, 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 κάθε φορά (pH 3, 2.7, 2.5).

2.5 Έκθεση σε συνθήκες όξινης καταπόνησης

Για την παρατήρηση της συμπεριφοράς του στελέχους ScottA του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, μετά από φυγοκέντρηση (10 min × 3600 στροφές/min, rpm × 4°C) 10 mL καλλιέργειας, το ίζημα που προέκυπτε επαναιωρούνταν σε 10mL Ringer. Ακολουθούσε μια δεύτερη φυγοκέντρηση και στο ίζημα που προέκυπτε, προστέθηκαν 10 mL Ringer οξιτισμένου σε pH 2.5, 2.7 και 3.0 (ρυθμισμένο μετά την αποστείρωση, με οξικό οξύ AA 1 M και αντίστοιχα υδροχλωρικό οξύ HCl 3N).

Η διαδικασία ρύθμισης του διαλύματος οξικού οξέος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φιαλών Duran χωρητικότητας 100 mL, που περιείχαν 50 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Το pH (2.5, 2.7 και 3.0) ρυθμιζόταν κάθε φορά, μετά την αποστείρωση, με διάλυμα οξικού οξέος AA 1 M και αντίστοιχα υδροχλωρικού οξέος HCl 3N, υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη χρήση

ψηφιακού πεχάμετρου. Η μέτρηση γινόταν με εμβάπτιση του ηλεκτροδίου στο παρασκεύασμα.

2.6 Πειραματική διαδικασία όξινης καταπόνησης με τη μέθοδο της επίστρωσης (Plates)

Ο στόχος του συγκεκριμένου πειράματος, όπως αναφέρθηκε σε παραπάνω ενότητα, ήταν να εκτιμηθεί η λογαριθμική μείωση του συνολικού πληθυσμού και ο αριθμός των τραυματισμένων κυττάρων του στελέχους ScottA του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Οι συνθήκες καταπόνησης που μελετήθηκαν, ήταν το acetic acid AA (οξικό οξύ) και το hydrochloric acid HCl (υδροχλωρικό οξύ) ρυθμισμένο σε pH 2.5, 2.7 και 3.0 για 5 ώρες, σε θερμοκρασίες 4°C και 20°C.

Ο αρχικός πληθυσμός, με συγκέντρωση 10^7 CFU/mL, λαμβανόταν από την δεύτερη ανανέωση του εμβολίου και μετά τις δύο φυγοκεντρήσεις, μικροποσότητα 100 μ L, εισαγόταν σε δύο σωληνάκια Falcon όγκου 15 mL, που περιείχαν 10 mL του ρυθμισμένου διαλύματος AA και pH 2.5 ή 2.7 ή 3.0, διαλυμένο σε ισοτονικό διάλυμα Ringer. Η προσθήκη των 100 μ L του εμβολίου στο διάλυμα καταπόνησης, αποτελούσε τη μηδενική στιγμή του πειράματος και τη μηδενική στιγμή της πρώτης δειγματοληψίας σε τρυβλία TSA-Ye 0% NaCl και 5% NaCl. Μόλις τελείωνε η δειγματοληψία, το εμβόλιο με τον πληθυσμό των κυττάρων φυλάσσόταν στους 4°C ή στους 20°C και ανά διαστήματα 1 ώρας ακολουθούσαν οι επόμενες δειγματοληψίες.

Τα χρονικά διαστήματα μεταξύ των δειγματοληψιών τηρούνταν με αυστηρότητα και προέκυψαν μετά από δοκιμασίες, που είχαν προηγηθεί, προκειμένου να καθοριστούν και οι υπόλοιπες παράμετροι του πειράματος, όπως ο συνολικός χρόνος έκθεσης των κυττάρων στις συνθήκες καταπόνησης, η συγκέντρωση του pH, και οι θερμοκρασίες έκθεσης. Για το στέλεχος του μικροοργανισμού, πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις, ώστε τα αποτελέσματα να βασίζονταν στην επαναληψιμότητα του φαινομένου, και όχι ενός τυχαίου γεγονότος.

Μετά το πέρας του πειράματος, τα τρυβλία TSA-Ye φυλάσσονταν σε κλίβανο ρυθμισμένο στους 37°C. Η καταμέτρηση των τρυβλίων γινόταν στις 48 ώρες για τα τρυβλία με 0% NaCl και στις 120 ώρες για τα τρυβλία με 5% NaCl.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και στην περίπτωση της όξινης καταπόνησης των κυττάρων με υδροχλωρικό οξύ HCl 3N.

Για κάθε συνθήκη καταπόνησης πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις και η κάθε βιολογική επανάληψη περιλάμβανε δύο τεχνικές επαναλήψεις (A και B).

2.6.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε κάθε δειγματοληψία, δείγμα κυττάρων επιστρώνονται σε επιλεκτικά και μη επιλεκτικά υποστρώματα. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για 5 μέρες και 2 μέρες, αντίστοιχα και έπειτα γίνεται η καταμέτρηση των ορατών αποικιών. Σύμφωνα με τον αριθμό των αποικιών κάθε τρυβλίου, εκτιμάται ο πληθυσμός του δείγματος την στιγμή της δειγματοληψίας, με βάση τον τύπο :

$$\text{Log(CFU/ml)} = \text{Log}\left(\frac{\text{CFU} \cdot \text{Dilution Factor}}{\text{ml}}\right) \quad (\text{Εξίσωση 1})$$

Από κάθε τεχνική επανάληψη υπολογίζεται ο μέσος όρος του εκτιμώμενου πληθυσμού κάθε χρονική στιγμή. Οι τιμές αυτές χρησιμοποιούνται για την κατασκευή του ραβδογράμματος, που αποτυπώνει το επίπεδο του συνολικού πληθυσμού αλλά και του ανθεκτικού υποπληθυσμού σε κάθε χρονική στιγμή. Στο διάγραμμα αποτυπώνεται και η τυπική απόκλιση.

Για τον υπολογισμό του υποθανάτιου τραυματισμού ανά δείγμα, για κάθε τεχνική επανάληψη, συγκρίνεται ο εκτιμώμενος πληθυσμός από τα τρυβλία με το μη επιλεκτικό μέσο με τον εκτιμώμενο πληθυσμό από τα αντίστοιχα τρυβλία με το επιλεκτικό μέσο. Από τον μέσο όρο του πληθυσμού του τραυματισμού κάθε τεχνικής και βιολογικής επανάληψης, βρίσκεται ο συνολικός πληθυσμός τραυματισμένων κυττάρων του δείγματος για την συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Ο υποθανάτιος τραυματισμός εκφράζεται ως ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων σε ένα δείγμα και αποτυπώνεται με βάση τον τύπο:

$$\% \text{sublethal injury} = \left(1 - \frac{\text{counts on selective media}}{\text{counts on nonselective media}}\right) * 100 \quad (\text{Εξίσωση 2})$$

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.

2.7 Πειραματική διαδικασία όξινης καταπόνησης με τη μέθοδο της μικροσκοπίας φθορισμού (Fluorescence Microscopy)

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).

Ο στόχος της χρήσης χρωστικών και της παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο, ήταν να εκτιμηθεί το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων του στελέχους ScottA της *Listeria monocytogenes*. Οι συνθήκες καταπόνησης που μελετήθηκαν, ήταν το acetic acid AA (οξικό οξύ) και το υδροχλωρικό οξύ HCl 3N ρυθμισμένο σε pH 2.5, 2.7 και 3.0 για 5 ώρες στους 20°C.

Ο αρχικός πληθυσμός, με συγκέντρωση 10^9 CFU/mL, λαμβανόταν από την δεύτερη ανανέωση του εμβολίου.. Μετά τη μία φυγοκέντρηση, στο πρώτο εμβόλιο προστέθηκαν 4 mL αποστειρωμένου Ringer, ενώ στα άλλα δύο εμβόλια, προστέθηκαν 4 mL αποστειρωμένου Ringer, του οποίου το pH είχε ρυθμιστεί σε 2.5 ή 2.7 ή 3, με τη χρήση οξικού οξέος AA 1M..

- Το πρώτο εμβόλιο, που περιείχε Ringer, χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας, καθώς περιείχε κύτταρα που δεν είχαν υποστεί όξινη καταπόνηση.
- Το δεύτερο εμβόλιο, του οποίου είχε ρυθμιστεί το pH, χρησιμοποιήθηκε για

δειγματοληψία σε τρυβλία TSA-Ye 0% NaCl και 5% NaCl, παράλληλα με το τρίτο εμβόλιο, που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτόχρονη παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Η κάθε δειγματοληψία περιλάμβανε δύο τεχνικές επαναλήψεις (A και B) και ανά διαστήματα 1 ώρας ακολουθούσαν οι επόμενες δειγματοληψίες, ώστε να παρατηρείται ο τραυματισμός των κυττάρων. Μόλις τελείωνε η δειγματοληψία, το εμβόλιο με τον πληθυσμό των κυττάρων φυλασσόταν στους 20°C. Μετά το πέρας του πειράματος, τα τρυβλία TSA-Ye φυλάσσονταν σε κλίβανο ρυθμισμένο στους 37°C. Η καταμέτρηση των τρυβλίων γινόταν στις 48 ώρες για τα τρυβλία με 0% NaCl και στις 120 ώρες για τα τρυβλία με 5% NaCl.

- Το τρίτο εμβόλιο, του οποίου είχε ρυθμιστεί το pH, χρησιμοποιήθηκε για την

δημιουργία παρασκευασμάτων των κυττάρων και παρακολούθησή τους στο μικροσκόπιο με χρήση φθορίζουσών χρωστικών. Πιο συγκεκριμένα, υπό ασηπτικές συνθήκες παίρνονταν 100 μL , από το εμβόλιο, και τοποθετούνταν σε erpendorf του 1 mL, προκειμένου να γίνει φυγοκέντρηση για 2 min στις 12.000 στροφές στους 20°C, ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα της όξινης καταπόνησης και να σταματήσει ο χρόνος του στρες. Μετά τη φυγοκέντρηση, στο ίζημα που προέκυπτε, τοποθετούνταν 100 μL Ringer, 2 μL χρωστικής CFDA, το οποίο είχε συγκέντρωση 100 μM και 2 μL χρωστικής PI, με συγκέντρωση 29.92 μM . Το δείγμα αφηνόταν για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως μετά ακολουθούσε η φυγοκέντρωσή του στις 13.300 στροφές (rpm) για 2 min, ώστε να φύγει η περίσσεια χρωστικής. Το ίζημα, που προέκυπτε, επαναιωρούταν σε 100 μL Ringer. 10 μL από το δείγμα, τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και καλυπτόταν με μία καλυπτρίδα. Στη συνέχεια, γινόταν παρατήρηση του παρασκευάσματος σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού με φακό μεγέθυνσης $\times 100$.

Η διαδικασία αυτή γινόταν παράλληλα με τη δειγματοληψία σε τρυβλία, δηλαδή σε διαστήματα 1 ώρας και ταυτόχρονης εναπόθεσης των εμβολίων σε κλίβανο ρυθμισμένο στους 20°C, μετά από κάθε δειγματοληψία.

Για τον έλεγχο των μαρτύρων, η διαδικασία που ακολουθούταν, ήταν από το εμβόλιο που περιείχε 4 mL Ringer, να μεταφερθούν 100 μL σε δύο ξεχωριστά erpendorf του 1mL. Στο erpendorf, που θέλαμε να παρατηρήσουμε τα ζωντανά κύτταρα, προστίθονταν 2 μL CFDA και αφηνόταν για 20 min. Μόλις πέραγε το διάστημα αυτό, γινόταν φυγοκέντρηση στις 13.300 στροφές (rpm) για 2 min και επαναιώρηση του ιζήματος σε 100 μL Ringer. Το παρασκεύασμα ήταν έτοιμο για παρατήρηση, μόλις γινόταν μεταφορά 10 μL στην αντικειμενοφόρο πλάκα και καλυπτόταν με μια καλυπτρίδα.

Για την παρατήρηση των νεκρών κυττάρων, γινόταν φυγοκέντρηση του eppendorf που περιείχε 100 μL του εμβολίου για 2 min και ακολουθούσε επαναιώρηση του ιζήματος σε 70% αιθανόλη, όπου και αφηνόταν για 20 min, προκειμένου να θανατωθούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια, γινόταν φυγοκέντρηση και τοποθετούνταν 100 μL Ringer και 2 μL PI για 5 min. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος, ακολουθούσε μια τελευταία φυγοκέντρηση και μετά την προσθήκη 100 μL Ringer στο ίζημα, λαμβανόταν ποσότητα 10 μL και γινόταν η μεταφορά της σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και στην περίπτωση της όξινης καταπόνησης των κυττάρων με υδροχλωρικό οξύ HCl 3N.

Για τη μέθοδο της επίστρωσης, για κάθε συνθήκη καταπόνησης πραγματοποιήθηκαν 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις και η κάθε βιολογική επανάληψη περιλάμβανε δύο τεχνικές επαναλήψεις (A και B).

Για την Μικροσκοπία Φθορισμού, σε κάθε χρονική στιγμή αποτυπώνονταν 4 διαφορετικά οπτικά πεδία από το ίδιο παρασκεύασμα.

2.7.1 Ανάλυση εικόνας

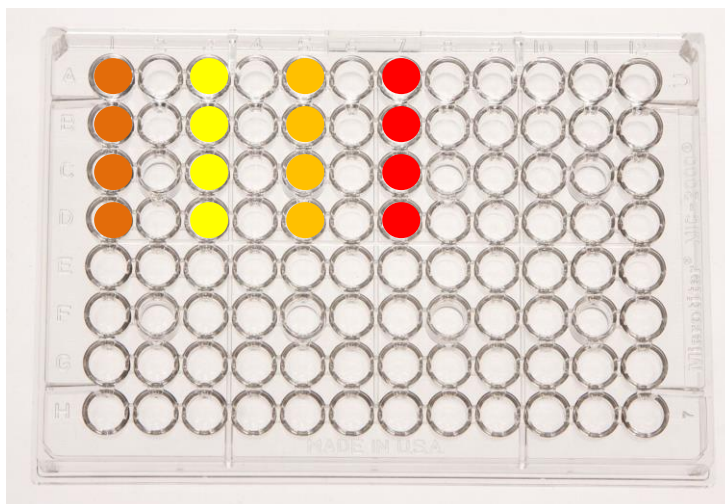
Οι εικόνες που έχουν ληφθεί, υποβλήθηκαν σε επεξεργασία και αναλύθηκαν από ένα συνδυασμό τεχνικών επεξεργασίας εικόνας και μηχανικής εκμάθησης, με στόχο την ποσοτικοποίηση των ζωντανών, (CFDA+, πράσινος φθορισμός), των τραυματισμένων (CFDA+/PI+) και των νεκρών κυττάρων (PI+, κόκκινος φθορισμός), μαζί με τα βιοφυσικά χαρακτηριστικά τους σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Για την ανάλυση των εικόνων χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί αλγόριθμοι, επιτρέποντας την υψηλή εκτίμηση των ιδιοτήτων ενός κυττάρου, την ποσοτικοποίηση και απαρίθμηση των ζωντανών και νεκρών κυττάρων, την επεξεργασία με χρονική υστέρηση και τον υπολογισμό των χρόνων διαίρεσης στην 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 λήθαργου (Balomenos *et al.*, 2017).

2.8 Μελέτη της ανάκαμψης τραυματισμένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* σε υγρό θρεπτικό μέσο με τη χρήση του Bioscreen

Ο στόχος του συγκεκριμένου πειράματος, ήταν η παρατήρηση της ικανότητας των τραυματισμένων κυττάρων του στελέχους ScottA της *Listeria monocytogenes*, να ανακάμψουν σε ευνοϊκές, για αυτά, συνθήκες ανάπτυξης, χρησιμοποιώντας υγρό θρεπτικό μέσο. Η παρατήρηση των τραυματισμένων κυττάρων έγινε, μετά από έκθεση των εμβολίων του μικροοργανισμού, σε συνθήκες όξινης καταπόνησης.

Για το συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν 3 εμβόλια του μικροοργανισμού, τα οποία προέρχονταν από δεύτερη ανανέωση. Τα εμβόλια αυτά φυγοκεντρώνταν για 10 min στους 4°C και το ίζημα, που προέκυπτε, επαναιωρούνταν σε 4mL Ringer, του οποίου το pH είχε ρυθμιστεί σε 3.0, 2.7 και 2.5, από οξικό οξύ AA 1M, αντίστοιχα και για τα τρία εμβόλια. Στη συνέχεια τα εμβόλια διατηρούνταν στους 20°C για 5 ώρες.

Μετά το πέρας των 5 ωρών της όξινης καταπόνησης, τα τρία εμβόλια φυγοκεντρώνταν και έπειτα γινόταν επαναιώρηση του ιζήματος σε 4 mL αποστειρωμένου Ringer, για να σταματήσει ο χρόνος του stress. Ύστερα από καλή ανάδευση των εμβολίων, μικροποσότητες των 25 μL τοποθετούνταν σε 4 κελία, καθώς για κάθε συνθήκη pH πραγματοποιήθηκαν 4 τεχνικές επαναλήψεις, σε πλάκες μικροτιτλοδότησης και έπειτα σε κάθε κελί που περιείχε 25 μL εμβολίου, γινόταν προσθήκη 225 μL αποστειρωμένου θρεπτικού υγρού μέσου TSB – Ye. Η κάθε πλάκα μικροτιτλοδότησης είχε 100 κελιά χωρητικότητας 300 μL. Σε κάθε πλάκα μικροτιτλοδότησης, γινόταν μέτρηση και του αρχικού TSB-Ye, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σαν τυφλό δείγμα, προκειμένου να είναι γνωστή η απορρόφησή του. Συγκεντρωτικά, παρουσιάζεται παρακάτω μια πλάκα μικροτιτλοδότησης, που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα:



Σχήμα 5 Σχηματική αναπαράσταση μιας πλάκας μικροτιτλοδότησης. Κάθε χρώμα αντιπροσωπεύει μια τιμή pH. ● : TSB-Ye (250 μ L/κελί) ● : pH 3.0 (25 μ L εμβολίου και 225 μ L TSB-Ye/κελί) ● : pH 2.7 (25 μ L εμβολίου και 225 μ L TSB-Ye/κελί) ● : pH 2.5 (25 μ L εμβολίου και 225 μ L TSB-Ye/κελί)

Η βακτηριακή ανάπτυξη παρακολουθήθηκε σε συσκευή Bioscreen. Οι οπτικές πυκνότητες (OD) σε κάθε κελί, μετρήθηκαν στα 600 nm σε διαστήματα 15 min (οι πλάκες μικροτιτλοδότησης ανακινούντουσαν για 10 sec πριν από κάθε μέτρηση) για 24 ώρες στους 37°C.

Προκειμένου, να υπολογιστεί ο αριθμός N_{Det} , γινόταν επίστρωση 100 μ l κυττάρων σε τρυβλία TSA-Ye, τη στιγμή που η οπτική πυκνότητα του κελιού, μετρώντας στα 600nm, έδινε μέτρηση OD 0.2, στη συσκευή Bioscreen.

Κάθε συνθήκη καταπόνησης μελετήθηκε σε 3 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Η κάθε βιολογική επανάληψη περιλάμβανε 4 τεχνικές επαναλήψεις για την κάθε τιμή pH.

2.8.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων

Ανά συνθήκη υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών OD των 4 τεχνικών επαναλήψεων στον ίδιο χρόνο. Αντίστοιχα, έγινε και για το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό (TSB-Ye χωρίς πληθυσμό κυττάρων). Έπειτα αφαιρέθηκε, από τον μέσο όρο των τιμών του δείγματος,

η τιμή του μέσου όρου του τυφλού, για τον ίδιο χρόνο. Τέλος, συσχετίστηκαν οι τιμές που προέκυψαν με το χρόνο, δημιουργώντας τα αντίστοιχα διαγράμματα.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την δημιουργία του δείγματος αναφοράς (control). Σ' αυτή τη περίπτωση, ως δείγμα χρησιμοποιήθηκαν untreated κύτταρα (που δεν είχαν εκτεθεί σε κάποιο παράγοντα καταπόνησης).

2.9 Μελέτη της ανάκαμψη τραυματισμένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* σε στερεό θρεπτικό μέσο με τη χρήση Βιντεομικροσκοπίας

Στόχος του πειράματος ήταν η παρακολούθηση της πιθανής ανάκαμψης τραυματισμένων κυττάρων του στελέχους ScottA της *Listeria monocytogenes*, σε ευνοϊκές, για αυτά, συνθήκες ανάπτυξης, χρησιμοποιώντας στερεό θρεπτικό μέσο. Η παρατήρηση των τραυματισμένων κυττάρων έγινε, μετά από έκθεση των εμβολίων του μικροοργανισμού, σε συνθήκες όξινης καταπόνησης.

Στο εν λόγω πείραμα, χρησιμοποιήθηκε ένα εμβόλιο του μικροοργανισμού για κάθε τιμή pH, το οποίο προερχόταν από δεύτερη ανανέωση. Το εμβόλιο φυγοκεντρούταν για 10 min στους 4°C και το ίζημα, που προέκυπτε, επαναιωρούταν σε 4mL Ringer, του οποίου το pH είχε ρυθμιστεί σε 3.0 ή 2.7 ή 2.5, από οξικό οξύ AA 1M, αντίστοιχα για κάθε επανάληψη. Στη συνέχεια το εμβόλιο διατηρούνταν στους 20°C για 5 ώρες.

Μετά το πέρας των 5 ωρών της όξινης καταπόνησης, γινόταν φυγοκέντρηση του εμβολίου και έπειτα το ίζημα επαναιωρούταν σε 4 mL αποστειρωμένου Ringer. Ύστερα από καλή ανάδευση, 100 μL του εμβολίου αραιώνονταν σε erpendorf, που περιείχε 900 μL (1:10 αραιώση) αποστειρωμένου Ringer. Στη συνέχεια, γινόταν μεταφορά όγκου 10 μL του αραιωμένου διαλύματος, πάνω σε ένα κομμάτι θρεπτικού υλικού TSA-Ye, το οποίο είχε κοπεί σε διαστάσεις μιας καλυπτρίδας, και βρισκόταν πάνω σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα. Όταν η σταγόνα ακουμπούσε στο κομμάτι άγαρ, τότε γινόταν εξάπλωση με έναν αποστειρωμένο κρίκο, και αφηνόταν για 15 min, μέχρι να απορροφηθεί. Μετά τα 15 min, το δείγμα καλυπτόταν με μια καλυπτρίδα και περιφερειακά σφραγιζόταν με σιλικόνη, ώστε να μην χαθεί υγρασία.

Το δείγμα παρακολουθούταν στο μικροσκόπιο, με τη χρήση time lapse, στους 37°C για ένα χρονικό διάστημα 6 ωρών, στο οποίο κάθε 5 min, κατέγραφε στιγμιότυπα του πεδίου του δείγματος, που είχε οριστεί.

Κάθε συνθήκη καταπόνησης μελετήθηκε σε 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Το οπτικό πεδίο, που παρακολουθήθηκε στο μικροσκόπιο, του κάθε παρασκευάσματος επιλέχθηκε τυχαία.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση οξικού οξέος με τιμές pH 3, 2.7 και 2.5 σε θερμοκρασία 20°C

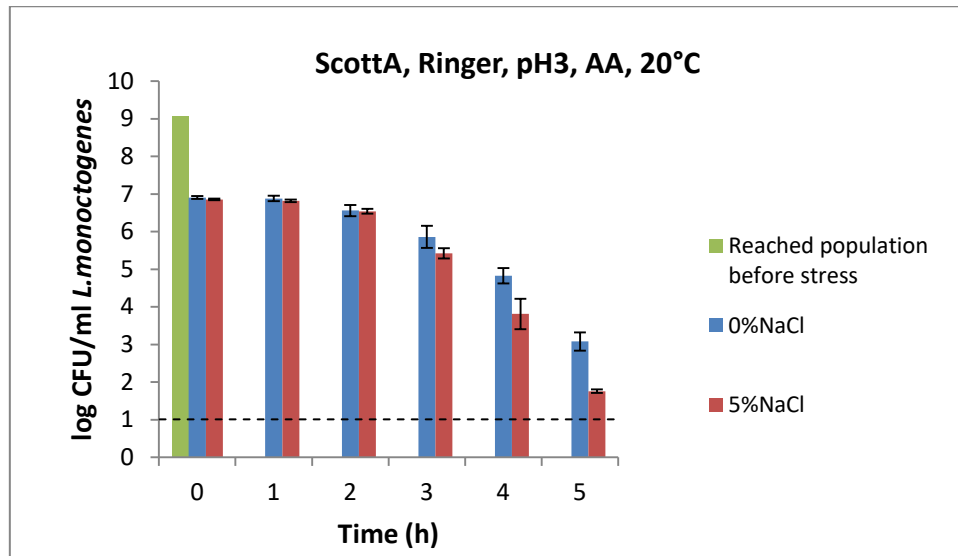
Προκειμένου να ελεγχθεί η απόκριση του στελέχους ScottA του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* έναντι χαμηλού pH παρουσία ασθενών οξέων, χρησιμοποιήσαμε 3 διαφορετικές τιμές pH (3, 2.7 ή 2.5), στους 20°C και στους 4°C. Κύτταρα στατικής φάσης *L.monocytogenes* εμβολιάζονται σε 2 falcons, τα οποία περιέχουν από 10ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer με τη κατάλληλη τιμή pH (3, 2.7 ή 2.5).

Όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 6**, η έκθεση των κυττάρων σε Ringer, pH 3, ρυθμισμένο με AA, στους 20°C προκάλεσε μείωση στο συνολικό πληθυσμό στο στέλεχος ScottA. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ήδη από την μηδενική στιγμή έκθεσης στο διάλυμα της καταπόνησης, το επίπεδο του πληθυσμού (συνολικού και ανθεκτικού) μειώνεται κατά περίπου $\sim 2 \log$ CFU/ ml, σε σχέση με το αρχικό εμβόλιο ($\sim 9 \log$ CFU/ ml). Τόσο ο συνολικός πληθυσμός, όσο και ο ανθεκτικός υποπληθυσμός φαίνεται, μέχρι τις 2 πρώτες ώρες επώασης, να παραμένουν σταθεροί στους περίπου $\sim 7 \log$ CFU/ml. Από την 3^η ώρα επώασης μέχρι το τέλος της έκθεσης του στελέχους στο διάλυμα της καταπόνησης, αρχίζει να μειώνεται τόσο ο συνολικός πληθυσμός, όσο και ο ανθεκτικός υποπληθυσμός, ο οποίος στο τέλος της 5^{ης} ώρας έχει μειωθεί περίπου $\sim 5 \log$ CFU/ml, σε σχέση με το αρχικό εμβόλιο (**Σχήμα 6**). Την ίδια χρονική στιγμή, σημαντική είναι και η διαφορά της μείωσης που παρατηρείται μεταξύ του ανθεκτικού υποπληθυσμού και του συνολικού πληθυσμού.

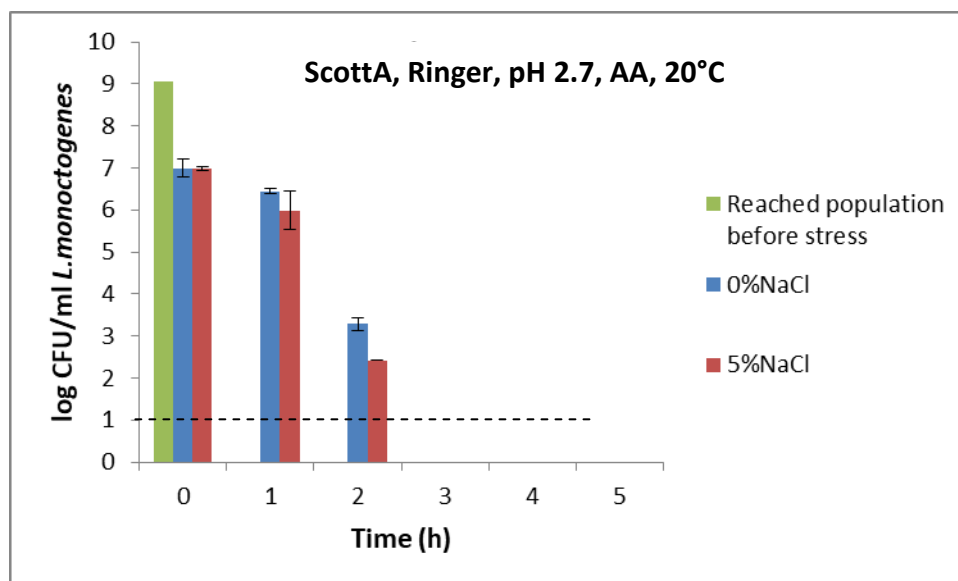
Όταν η τιμή του pH μειωθεί σε 2.7 του οξικού οξέος AA, **Σχήμα 7**, παρατηρείται και πάλι η αρχική μείωση του πληθυσμού κατά περίπου $\sim 2 \log$ CFU/ml, την μηδενική στιγμή της έκθεσης. Κατά την 2^η ώρα έκθεσης, φαίνεται σημαντική μείωση για το επίπεδο του πληθυσμού. Ο συνολικός πληθυσμός μειώνεται κατά περίπου $\sim 3 \log$ CFU/ml, ενώ ο ανθεκτικός υποπληθυσμός υφίσταται επιπλέον μείωση $\sim 1 \log$ CFU/ml, σε σχέση με την μηδενική ώρα έκθεσης στο οξικό οξύ. Ύστερα από τις 3 ώρες επώασης, η ανάπτυξη τόσο του συνολικού πληθυσμού, όσο και του ανθεκτικού υποπληθυσμού, είναι μηδενική.

Η μέγιστη ισχύς καταπόνησης που εφαρμόστηκε στα κύτταρα του στελέχους ScottA, όσον αφορά την έκθεση σε διάφορες τιμές pH οξικού οξέος, στους 20°C, ήταν η τιμή pH 2.5. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 8**, κατά την μηδενική στιγμή ο πληθυσμός, συνολικός και ανθεκτικός ,

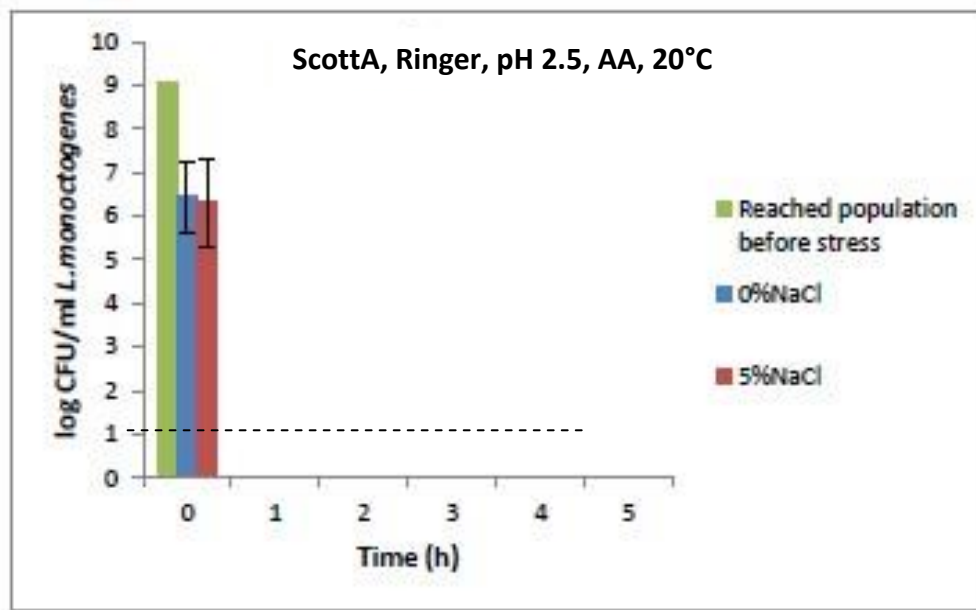
παραμένει σχεδόν σταθερός, ενώ από εκείνη τη στιγμή μέχρι και την 5^η ώρα, η ανάπτυξη για 0% NaCl και 5% NaCl είναι μηδενική.



Σχήμα 6 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3, 4 και 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer, pH 3 (ρυθμισμένο με AA 1M). 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).



Σχήμα 7 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3, 4 και 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer, pH 2.7 (ρυθμισμένο με AA 1M). 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).



Σχήμα 8 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3, 4 και 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer, pH 2.5 (ρυθμισμένο με AA 1M). 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 οC, 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).

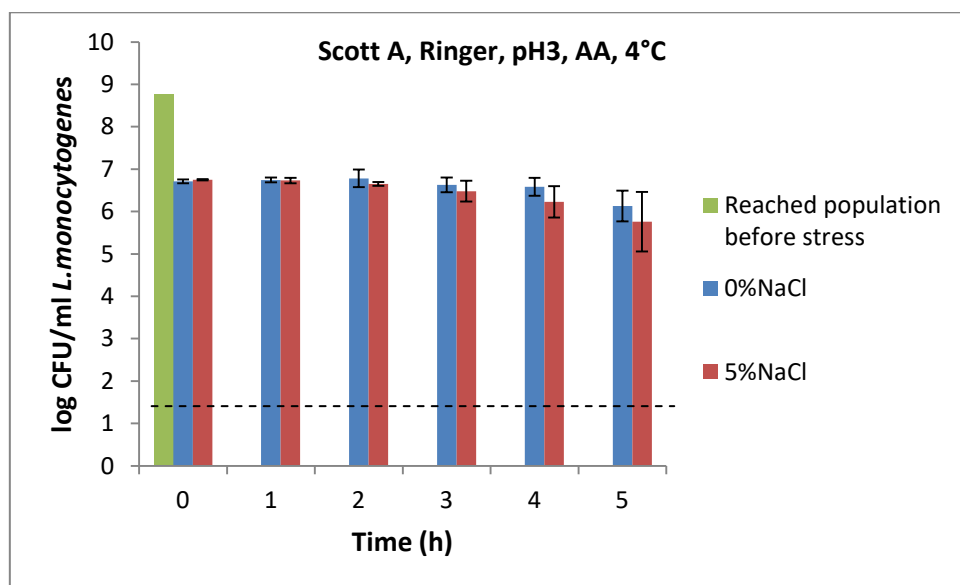
Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση οξικού οξέος με τιμές pH 3, 2.7 και 2.5 σε θερμοκρασία 4°C

Παράλληλα, εξετάστηκε η απόκριση του στελέχους ScottA, σε τιμές pH 3, 2.7 και 2.5 οξικού οξέος στους 4°C. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 9**, ο πληθυσμός (log CFU/ml) του στελέχους ScottA, συνολικός και ανθεκτικός, παραμένει σχεδόν σταθερός, μετά από επώαση 5 ωρών σε

pH3 οξικού οξέος, στους 4 °C . Το επίπεδο του πληθυσμού είναι περίπου 10⁷ 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 (~9 log CFU/ml).

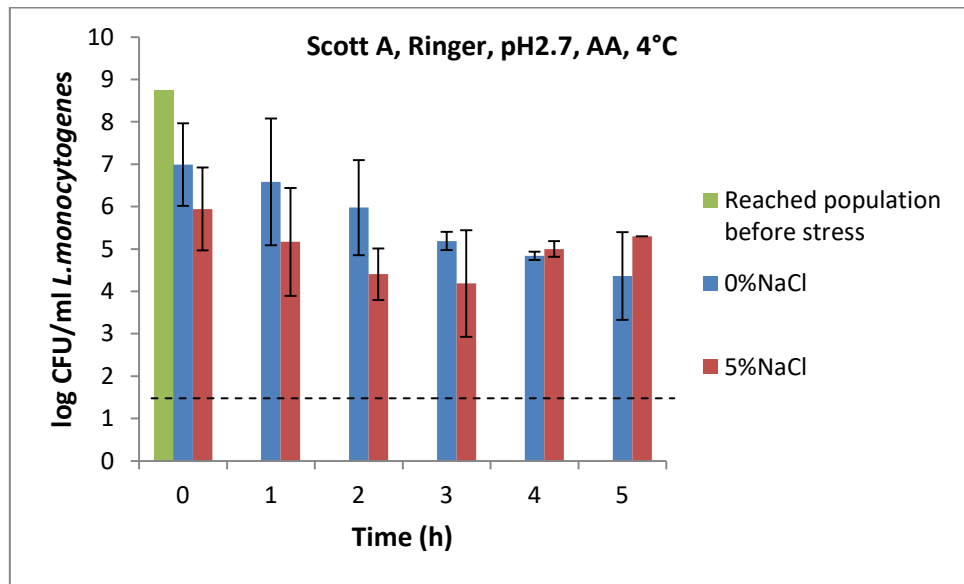
Όταν τα κύτταρα του στελέχους ScottA εκτίθενται σε οξικό οξύ pH 2.7, στους 4 °C, ήδη από τη μηδενική στιγμή έκθεσης παρατηρείται διαφορά μεταξύ του συνολικού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού της τάξης του ~1 log CFU/ml (**Σχήμα 10**). Κατά την 4^η ώρα, παρατηρείται εξάλειψη της διαφοράς μεταξύ των δύο πληθυσμών, ενώ την 5^η ώρα αυξάνεται κατά ~1 log CFU/ml ο ανθεκτικός πληθυσμός, συγκριτικά με τον συνολικό πληθυσμό.

Όταν τα κύτταρα εκτεθούν στο pH 2.5, από την 1^η ώρα παρατηρείται, με βάση το **Σχήμα 11**, η σημαντική διαφορά της μείωσης μεταξύ των δύο πληθυσμών, με τον ανθεκτικό υποπληθυσμό να είναι περίπου κατά ~4 log CFU/ml, πιο μειωμένος. Τα αποτελέσματα μετά την 1^η ώρα έκθεσης, δείχνουν πλήρη απώλεια της βιωσιμότητας του ανθεκτικού υποπληθυσμού, με τον συνολικό πληθυσμό να χάνει πλήρως την βιωσιμότητά του, κατά την τελευταία ώρα έκθεσης στο διάλυμα καταπόνησης.

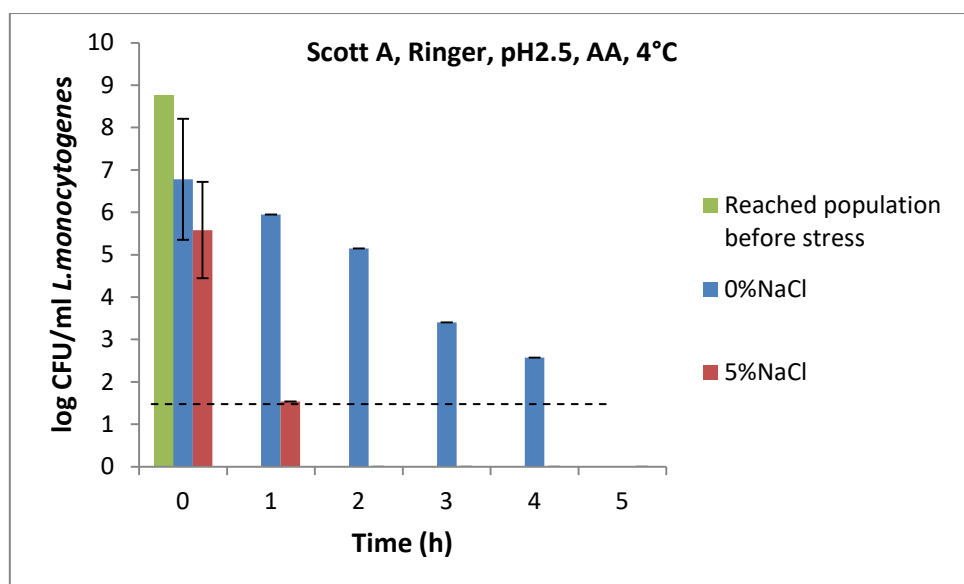


Σχήμα 9 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3, 4 και 5 ώρες στους 4°C σε διάλυμα Ringer, pH 3 (ρυθμισμένο με AA 1M). Ο πληθυσμός του καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 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).



Σχήμα 10 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3, 4 και 5 ώρες στους 4°C σε διάλυμα Ringer, pH 2.7 (ρυθμισμένο με AA 1M). 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).



Σχήμα 11 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3, 4 και 5 ώρες στους 4°C σε διάλυμα Ringer, pH 2.5 (ρυθμισμένο με AA 1M). 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 υδροχλωρικού οξέος με τιμές pH 3, 2.7 και 2.5 σε θερμοκρασία 20°C

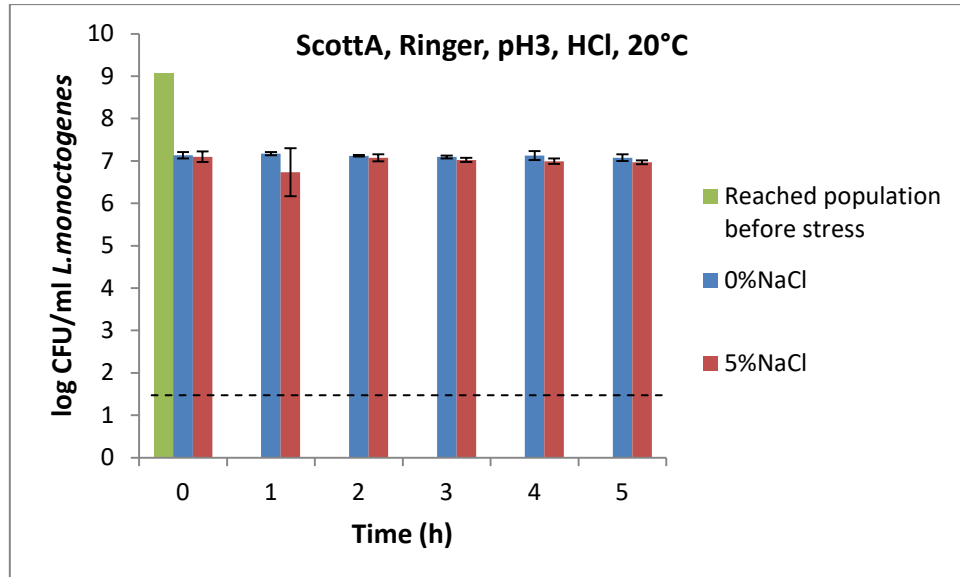
Μία ακόμη συνθήκη καταπόνησης που αξιολογήθηκε ήταν η έκθεση των κυττάρων μέσης στατικής φάσης σε διαφορετικές τιμές pH υδροχλωρικού διαλύματος (HCl) συγκέντρωσης 3N, στους 20°C και στους 4°C. Για το συγκεκριμένο πείραμα, τα κύτταρα στατικής φάσης *L. monocytogenes* εμβολιάζονται σε 2 falcons, που περιέχουν 10 ml αποστειρωμένου Ringer ρυθμισμένο σε pH 3 χρησιμοποιώντας υδροχλωρικό διάλυμα συγκέντρωσης 3N.

Όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 12**, η έκθεση των κυττάρων σε Ringer, pH 3, ρυθμισμένο με HCl, στους 20°C δεν προκάλεσε μείωση ούτε στον συνολικό πληθυσμό, ούτε στον ανθεκτικό υποπληθυσμό, στο στέλεχος ScottA, καθώς φαίνεται μέχρι και την 5^η ώρα επώασης, τα επίπεδα να είναι σταθερά στους ~7 log CFU/ml. Ωστόσο, μείωση του πληθυσμού, παρατηρήθηκε κατά την έκθεση στον παράγοντα καταπόνησης (μηδενική στιγμή), κατά περίπου 2 log CFU/ml, σε σχέση με το αρχικό εμβόλιο. Έτσι, το επίπεδο του πληθυσμού που εκτίθεται στην μετέπειτα καταπόνηση είναι πλέον 10⁷ CFU/ml.

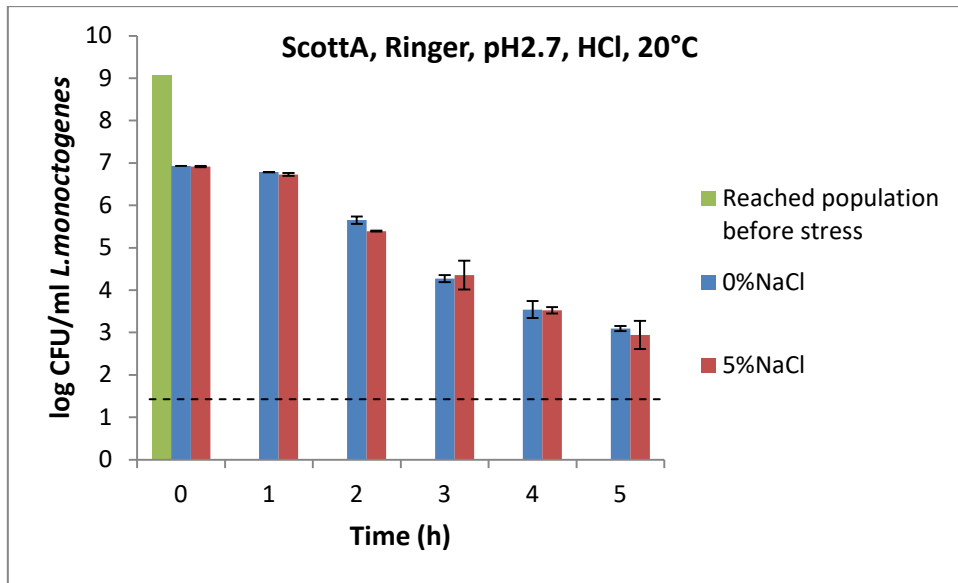
Αντίθετα, όταν τα κύτταρα του στελέχους ScottA, εκτίθενται σε pH 2.7 με HCl, παρατηρείται σταδιακή μείωση του πληθυσμού περίπου 4 log CFU/ml , από τη μηδενική στιγμή μέχρι και την 5^η ώρα. Ωστόσο, μεταξύ των δύο πληθυσμών (συνολικού και ανθεκτικού) δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μείωσης. (**Σχήμα 13**)

Αντίστοιχες παρατηρήσεις διεξάγονται από το **Σχήμα 14**, καθώς 2 ώρες μετά την έκθεση σε pH 2.5 HCl, ο πληθυσμός μειώθηκε περίπου κατά ~4 log CFU/ml, χωρίς ωστόσο να σημειώνεται διαφορά στην μείωση μεταξύ των δύο πληθυσμών, αφού η ανάπτυξη τόσο στο γενικό μέσο (TSA-Ye) όσο και στο επιλεκτικό (TSA-Ye + 5% NaCl) φαίνεται να είναι

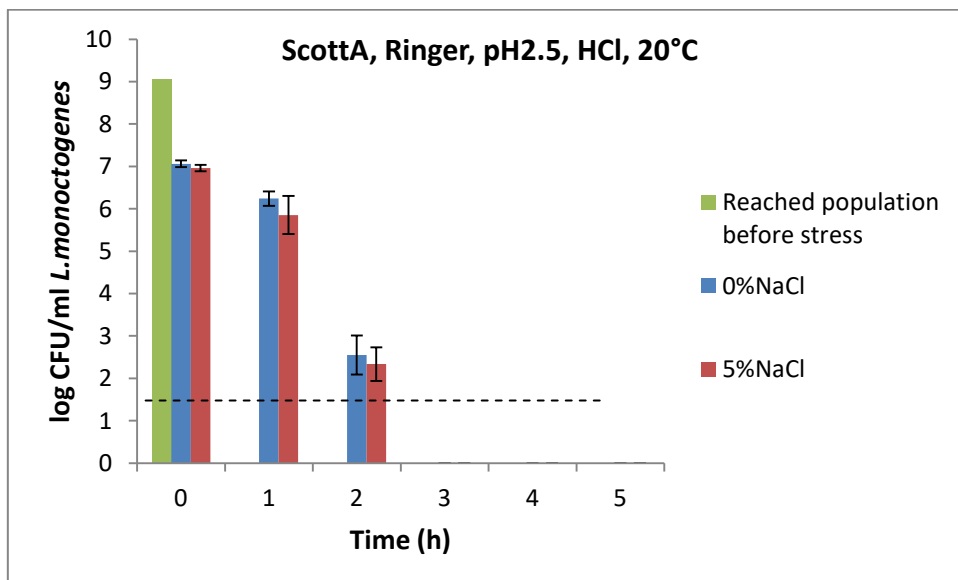
σχεδόν ίση. Μετά την 3^η ώρα έκθεσης στο διάλυμα καταπόνησης, τα κύτταρα και των δύο πληθυσμών έχασαν τη βιωσιμότητά τους.



Σχήμα 12 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3, 4 και 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer, pH 3 (ρυθμισμένο με HCl 3N). Ο πληθυσμός του 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 13 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3, 4 και 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer, pH 2.7 (ρυθμισμένο με HCl 3N). Ο πληθυσμός του καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37 οC, 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).



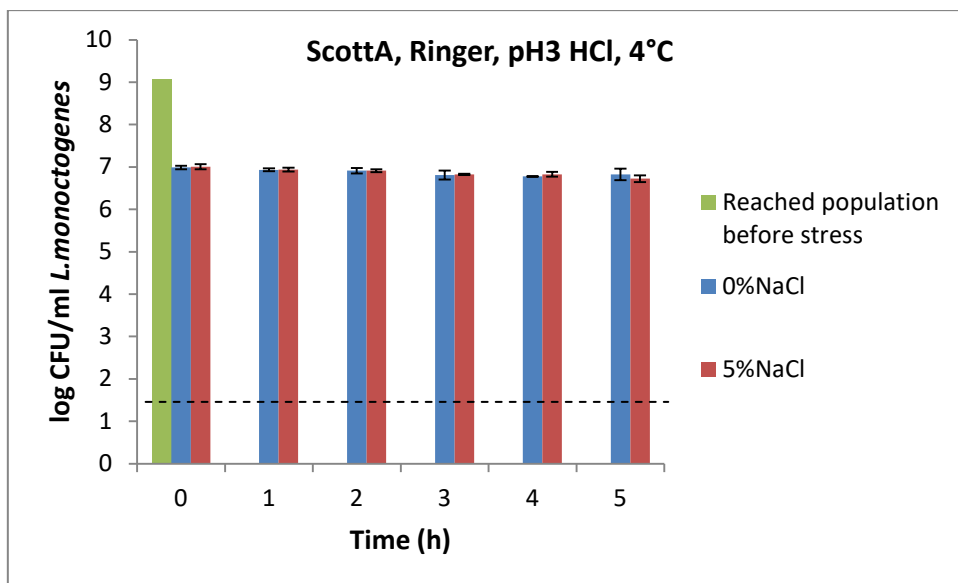
Σχήμα 14 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για

0, 1, 2, 3, 4 και 5 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).

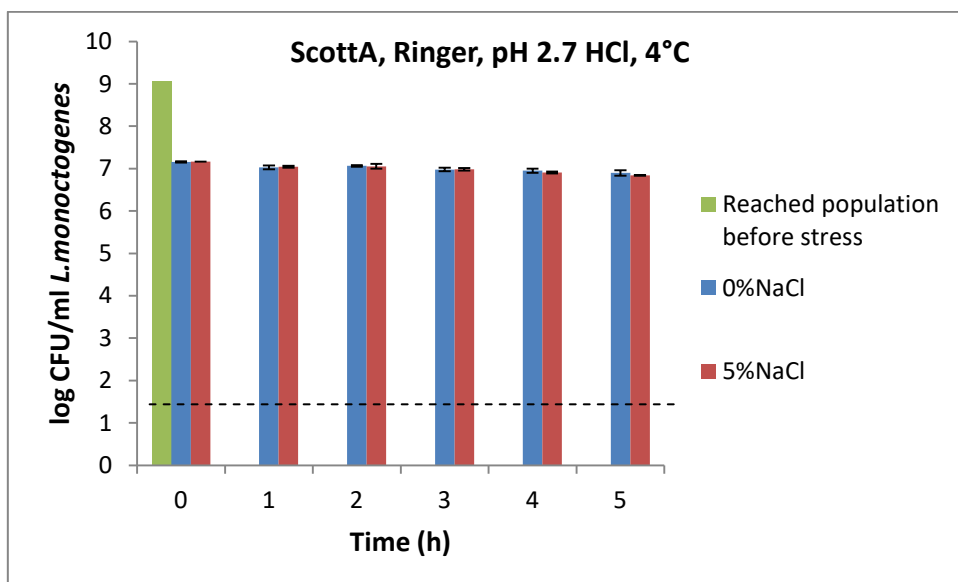
Αξιολόγηση υποθανάτιου τραυματισμού στη καταπόνηση υδροχλωρικού οξέος με τιμές pH 3, 2.7 και 2.5 σε θερμοκρασία 4°C

Παράλληλα, για τις ίδιες τιμές pH HCl, που μελετήθηκαν στους 20°C, μετρήθηκαν και στους 4°C, για το στέλεχος ScottA. Όπως και στους 20°C, έτσι και στους 4°C, η έκθεση των κυττάρων σε Ringer, pH 3 και pH 2.7, ρυθμισμένο με HCl, δεν προκάλεσε μείωση ούτε στον συνολικό πληθυσμό, ούτε στον ανθεκτικό υποπληθυσμό, στο στέλεχος ScottA, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 15** και **Σχήμα 16**, ενώ σημαντική μείωση 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.

Αντίθετα, όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 17**, η έκθεση των κυττάρων σε Ringer, pH 2.5, ρυθμισμένο με HCl, στους 4°C προκάλεσε σημαντική μείωση στο συνολικό πληθυσμό στο στέλεχος ScottA. Τόσο ο συνολικός πληθυσμός, όσο και ο ανθεκτικός υποπληθυσμός φαίνεται να μειώνονται περίπου ~5 log CFU/ml, αντίστοιχα, έπειτα από πέντε ώρες επώασης. Την 1^η ώρα μέχρι την 3^η ώρα επώασης, υπήρξε μια μικρή μείωση του ανθεκτικού υποπληθυσμού, συγκριτικά με τον συνολικό πληθυσμό, αλλά τις τελευταίες 2 ώρες, η μείωση εξαλείφθηκε.

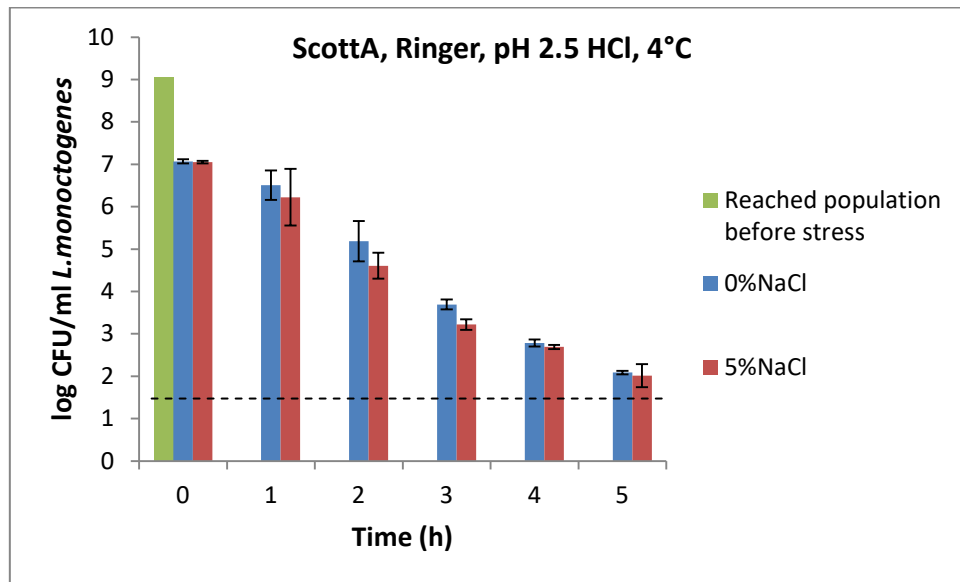


Σχήμα 15 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3, 4 και 5 ώρες στους 4°C σε διάλυμα Ringer, pH 3 (ρυθμισμένο με HCl 3N). Ο πληθυσμός του καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37 οC, 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 16 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3, 4 και 5 ώρες στους 4°C σε διάλυμα Ringer, pH 2.7 (ρυθμισμένο με HCl 3N). Ο

πληθυσμός του 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 17 Αποτύπωση του συνολικού πληθυσμού και του ανθεκτικού υποπληθυσμού του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 0, 1, 2, 3, 4 και 5 ώρες στους 4°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-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 τιμών pH (3, 2.7, 2.5) του οξικού οξέος (AA) σε θερμοκρασία καταπόνησης 20°C

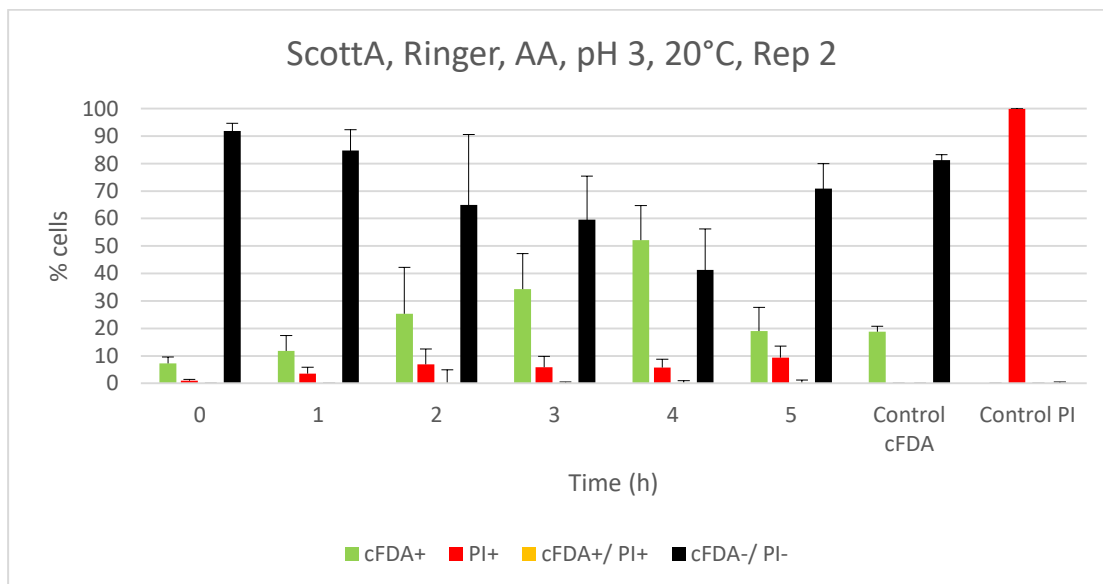
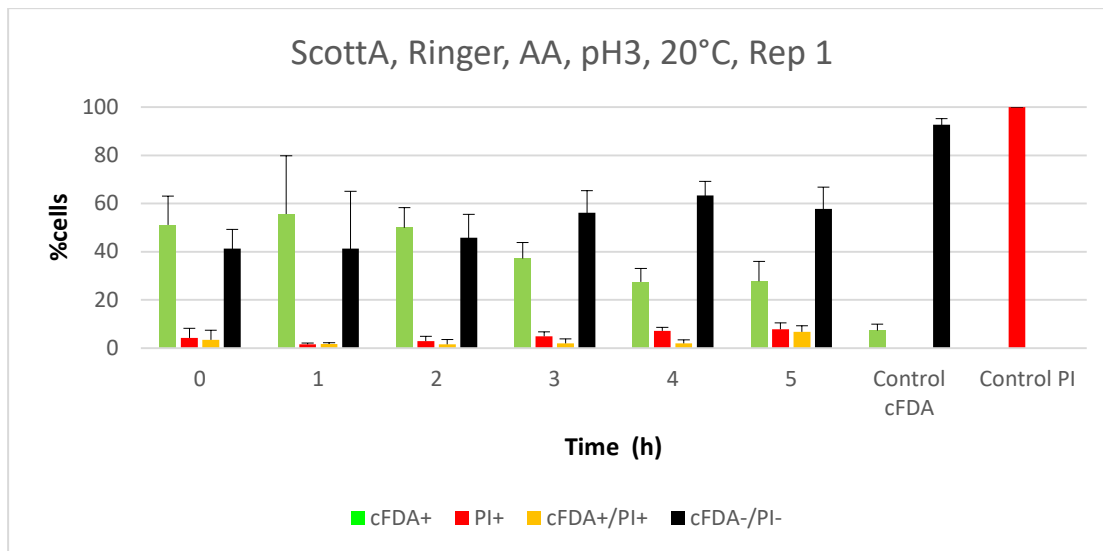
Η καταπόνηση των κυττάρων του στελέχους ScottA, με το οξικό οξύ, δίνει αξιοσημείωτα αποτελέσματα όσον αφορά την επαγωγή της κατάστασης VBNC. Προκειμένου να ανιχνεύσουμε την επαγωγή της κατάστασης VBNC, εκτιμήθηκαν τα αποτελέσματα του

φθορισμού σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη εκτίμηση της καλλιεργησιμότητας, έπειτα από την έκθεση του μικροοργανισμού σε διαφορετικές τιμές pH (3, 2.7 και 2.5) οξικού οξέος AA.

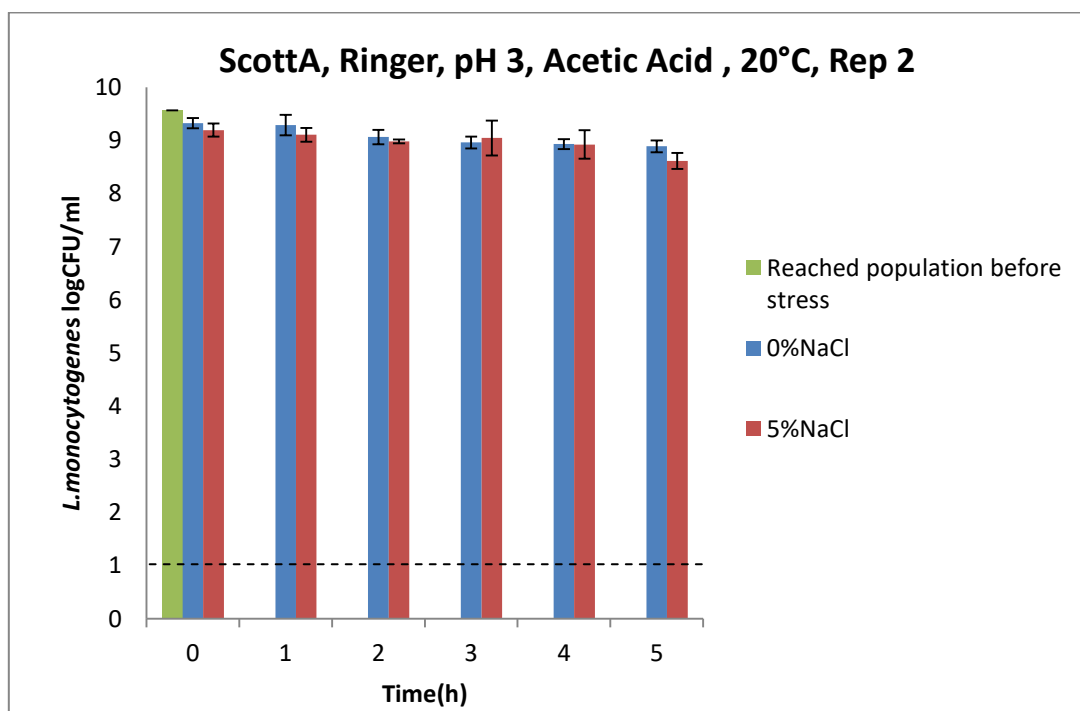
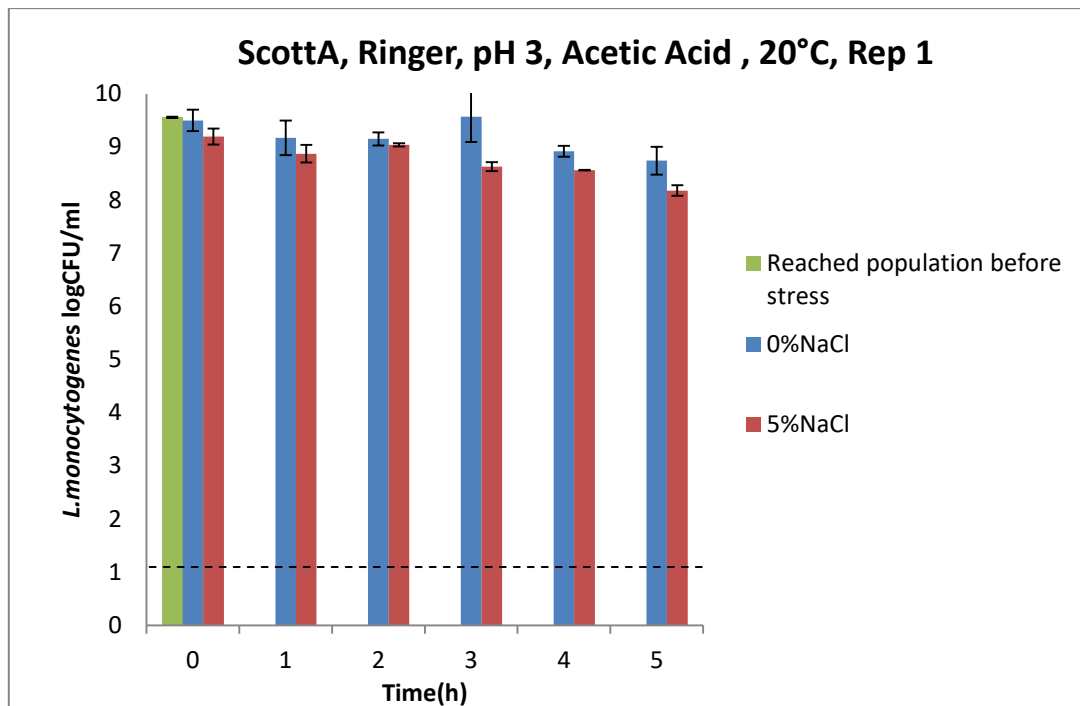
Ύστερα από την επώαση του μικροοργανισμού σε Ringer με pH 3 οξικό οξύ στους 20°C, παρατηρείται υψηλό ποσοστό ζωντανών (CFDA+) κυττάρων καθ'όλη την διάρκεια της έκθεσης στο διάλυμα καταπόνησης, ενώ το ποσοστό των νεκρών (PI+) κυττάρων είναι ιδιαίτερα χαμηλό. Παράλληλα, το ποσοστό των άβαφων κυττάρων φαίνεται να είναι εξίσου υψηλό (**Σχήμα 18**). Οι ίδιες παρατηρήσεις ισχύουν και για τις δύο επαναλήψεις, που πραγματοποιήθηκαν, με τη διαφορά ότι στην 2^η επανάληψη, στις πρώτες 2 ώρες παρατηρείται αρκετά υψηλότερο το ποσοστό των άβαφων κυττάρων συγκριτικά με τα ζωντανά κύτταρα (CFDA+). Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 19**, τα κύτταρα διατηρούν την καλλιεργησιμότητά τους.

Όταν τα κύτταρα εκτεθούν σε διάλυμα Ringer με pH 2.7 AA, παρατηρείται σημαντική αύξηση των νεκρών κυττάρων (PI+), με ταυτόχρονη μείωση των ζωντανών κυττάρων (CFDA+), συγκριτικά με το pH 3. Επιπρόσθετα, το ποσοστό των άβαφων κυττάρων παραμένει σχεδόν στα ίδια επίπεδα, με μία επιπλέον μικρή αύξηση (**Σχήμα 20**). Τα δεδομένα αυτά, συνδυάζονται με τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των τρυβλίων, αφού τα κύτταρα μετά από την έκθεση σε pH 2.7 του οξικού οξέος, 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.

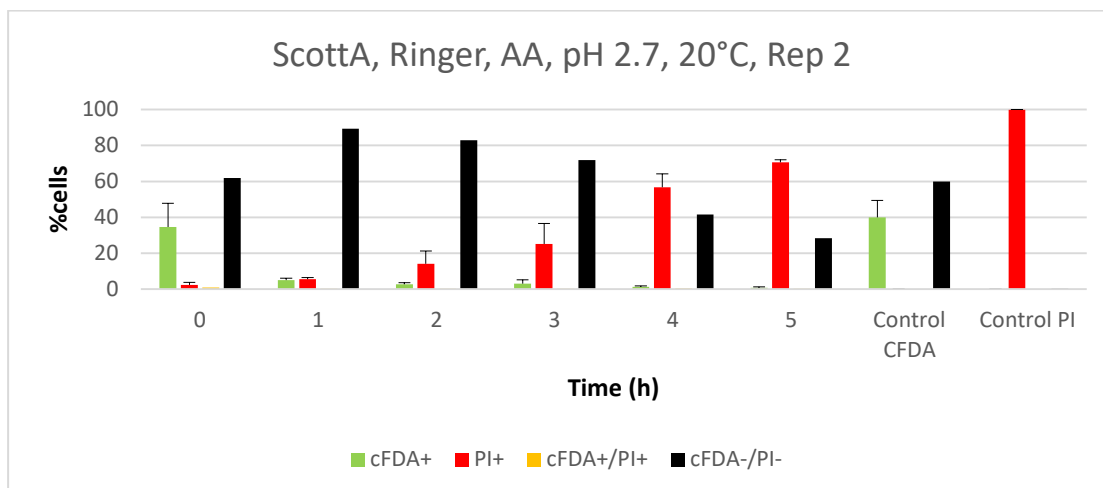
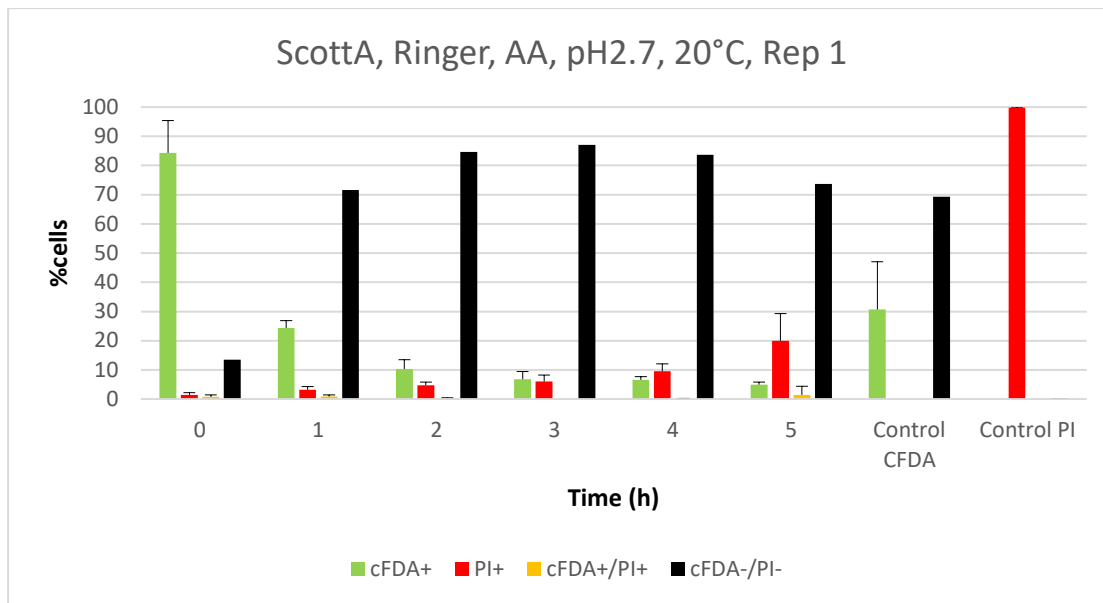
Κατά την έκθεση των κυττάρων σε pH 2.5 του οξικού οξέος, παρουσιάζεται το υψηλότερο ποσοστό νεκρών κυττάρων (PI+). Τα επίπεδα του κόκκινου φθορισμού φαίνεται να είναι υψηλά ήδη από την 2^η ώρα έκθεσης στην καταπόνηση, παρουσιάζοντας το μέγιστος στις 4 ώρες έκθεσης. Αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές στην 2^η βιολογική επανάληψη (**Σχήμα 22**). Στις συγκεκριμένες συνθήκες καταπόνησης (Ringer, pH2.5, AA, 20°C), τα κύτταρα φαίνεται να χάνουν τη ζωτικότητα τους, ήδη από την πρώτη ώρα έκθεσης, όπως παρατηρείται στην 1^η βιολογική επανάληψη, καθώς δεν παρουσιάζονται μετρήσιμα ποσοστά πράσινου φθορισμού (**Σχήμα 22**). Ωστόσο, τα κύτταρα διατηρούν την καλλιεργησιμότητά τους, παρουσιάζοντας απλώς μια μείωση περίπου 2 log CFU/ml, σε σχέση με την μηδενική χρονική στιγμή (9 log CFU/ml) (**Σχήμα 23**).



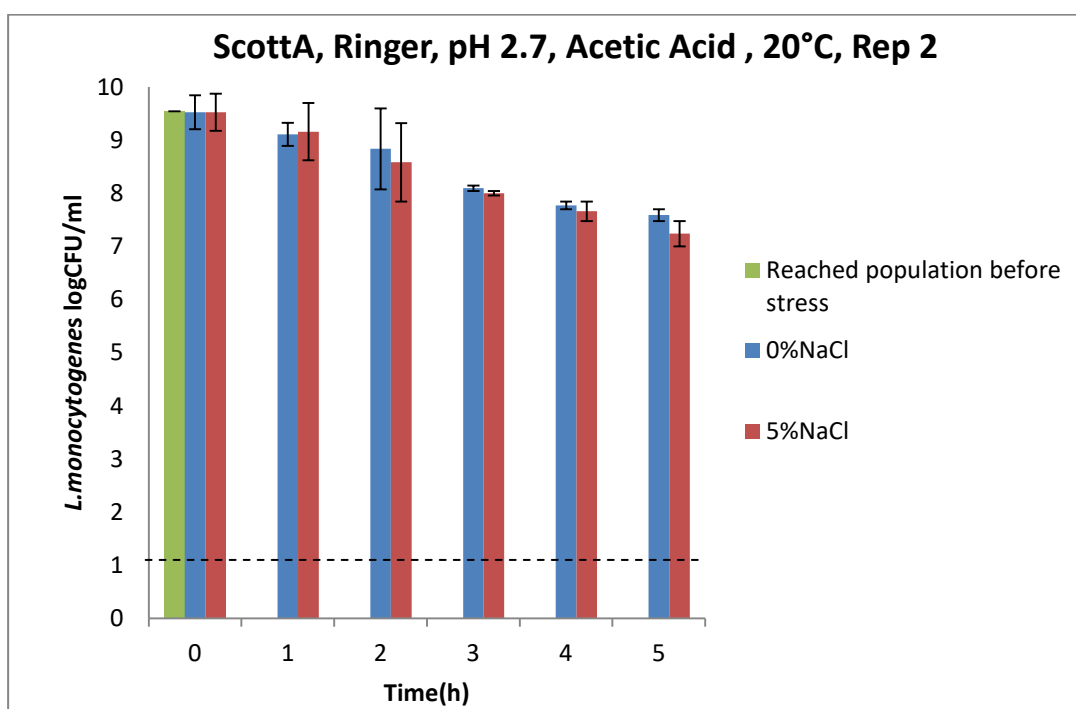
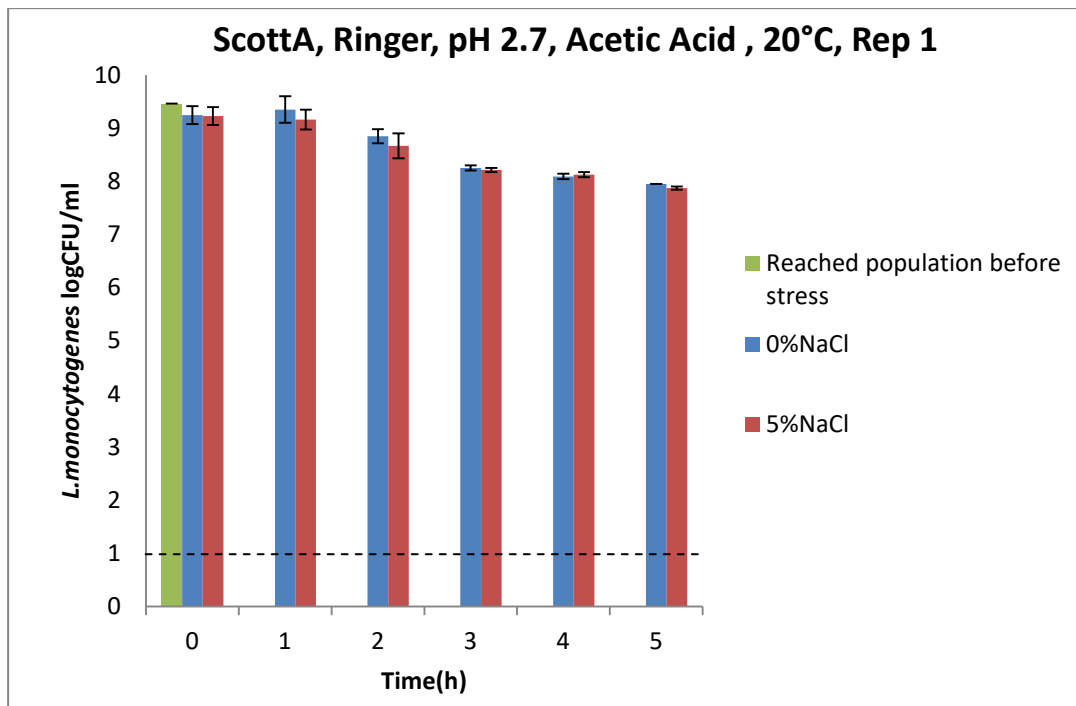
Σχήμα 18 Αποτελέσματα απαρίθμησης των διαφορετικών χρώσεων κυττάρων του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (% κυττάρων ανά οπτικό πεδίο), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer με pH 3 του οξικού οξέος (AA). Για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας αποτυπώθηκαν 4 διαφορετικά οπτικά πεδία. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν τις τυπικές αποκλίσεις. Τα διαγράμματα αντιστοιχούν σε 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.



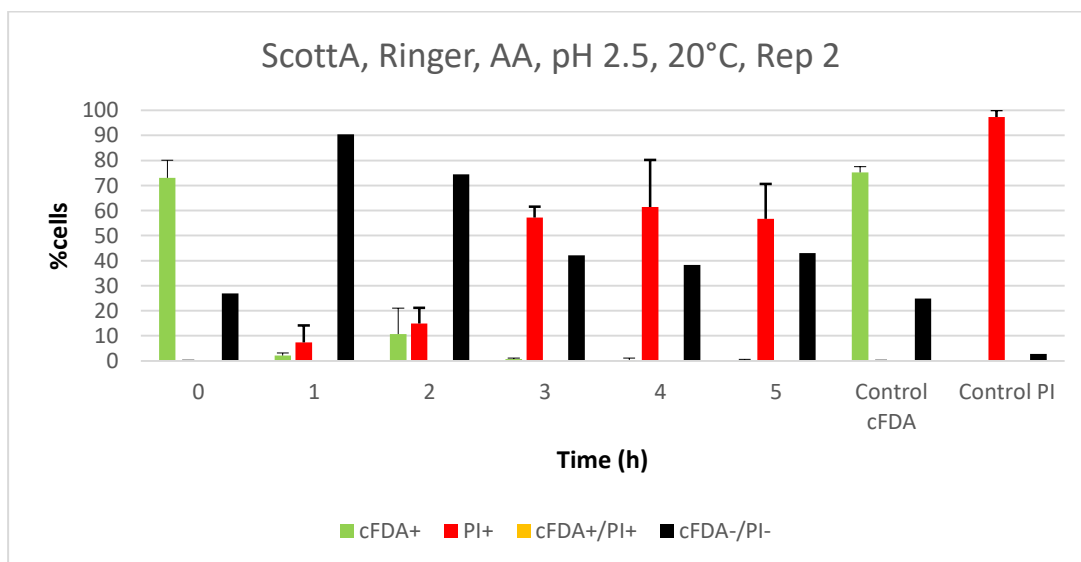
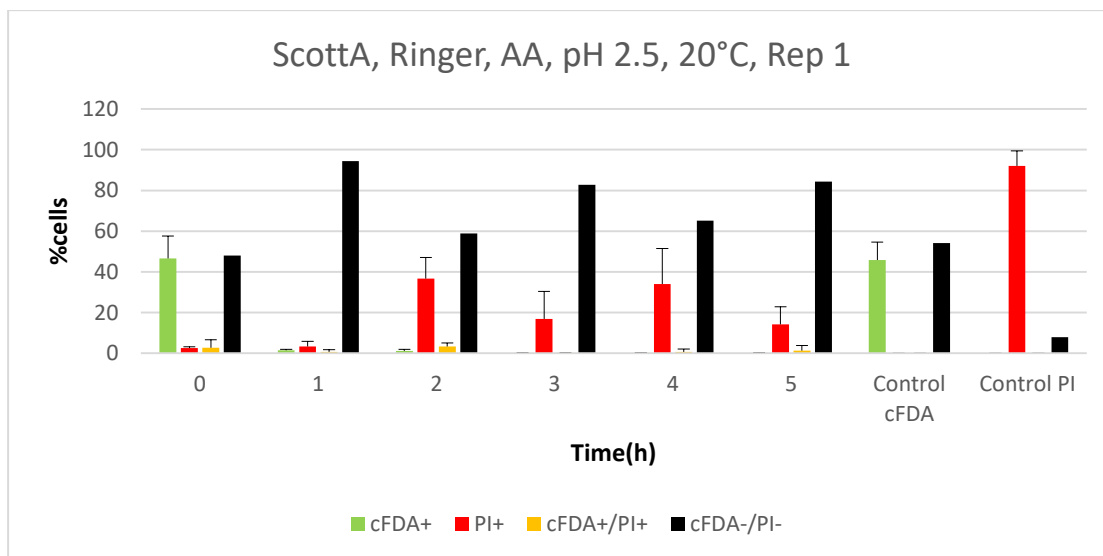
Σχήμα 19 Αξιολόγηση της καλλιεργησιμότητας του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer με pH 3 οξικού οξέος (AA). Ο πληθυσμός του στελέχους ScottA καταμετρήθηκε ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37°C, σε TSA-Ye με 0% 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.



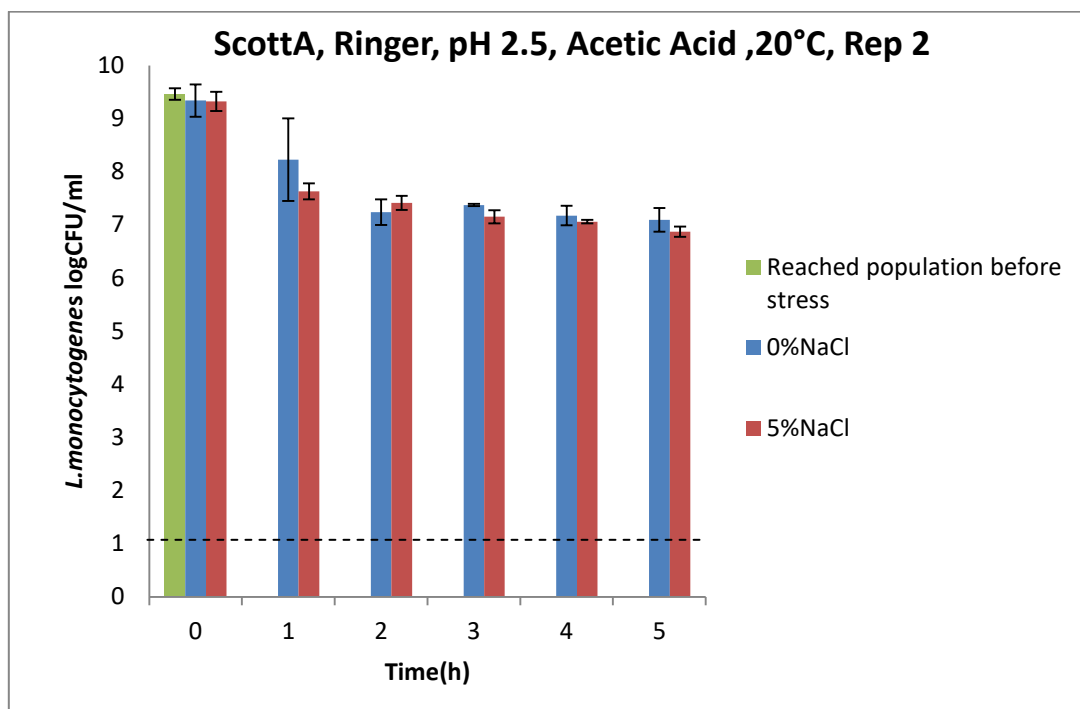
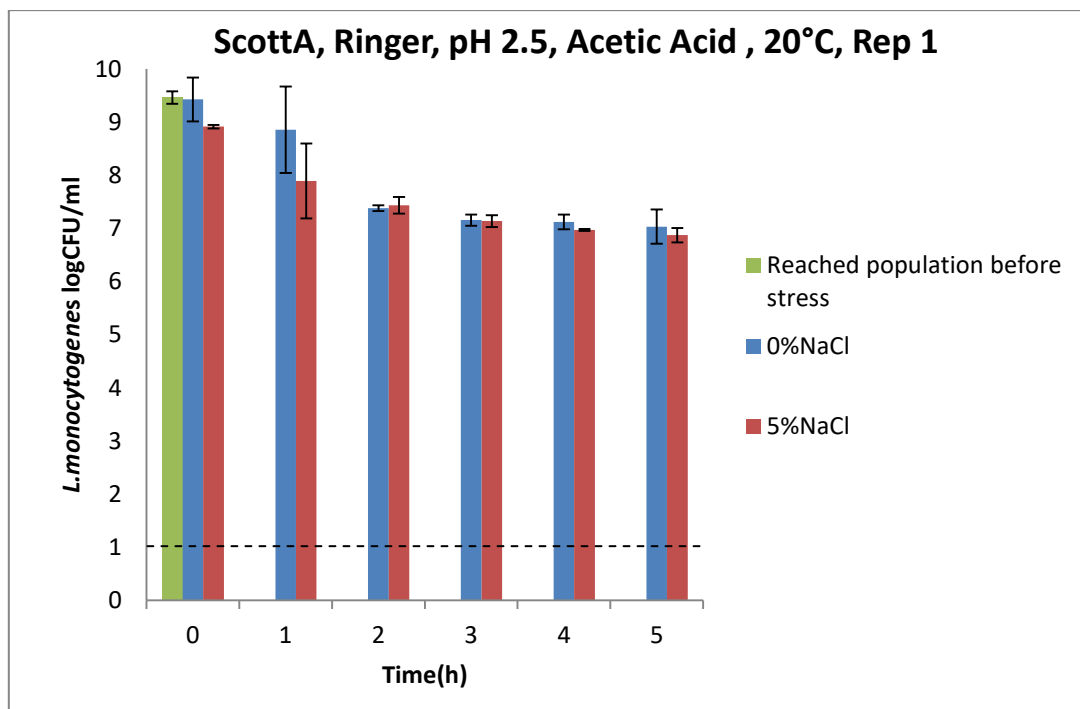
Σχήμα 20 Αποτελέσματα απαρίθμησης των διαφορετικών χρώσεων κυττάρων του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (% κυττάρων ανά οπτικό πεδίο), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer με pH 2.7 του οξικού οξέος (AA). Για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας αποτυπώθηκαν 4 διαφορετικά οπτικά πεδία. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν τις τυπικές αποκλίσεις. Τα διαγράμματα αντιστοιχούν σε 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.



Σχήμα 21 Αξιολόγηση της καλλιεργησιμότητας του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer με pH 2.7 οξικού οξέος (AA). Ο πληθυσμός του στελέχους ScottA 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 22 Αποτελέσματα απαρίθμησης των διαφορετικών χρώσεων κυττάρων του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (% κυττάρων ανά οπτικό πεδίο), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer με pH 2.5 του οξικού οξέος (AA). Για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας αποτυπώθηκαν 4 διαφορετικά οπτικά πεδία. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν τις τυπικές αποκλίσεις. Τα διαγράμματα αντιστοιχούν σε 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.



Σχήμα 23 Αξιολόγηση της καλλιιεργησιμότητας του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer με pH 2.5 οξικού οξέος (AA). Ο πληθυσμός του στελέχους ScottA 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). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή

υποδεικνύει το όριο καταμέτρησης της μεθόδου (ο.κ.= 10 CFU / ml). Τα διαγράμματα αντιστοιχούν σε 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.

Εκτίμηση της ικανότητας επαγωγής της κατάστασης «Ζώντα αλλά μη Καλλιεργήσιμα» (Viable But Non Culturable, VBNC state) με την χρήση διαφορετικών τιμών pH (3, 2.7, 2.5) του υδροχλωρικού οξέος (HCl) σε θερμοκρασία καταπόνησης 20°C

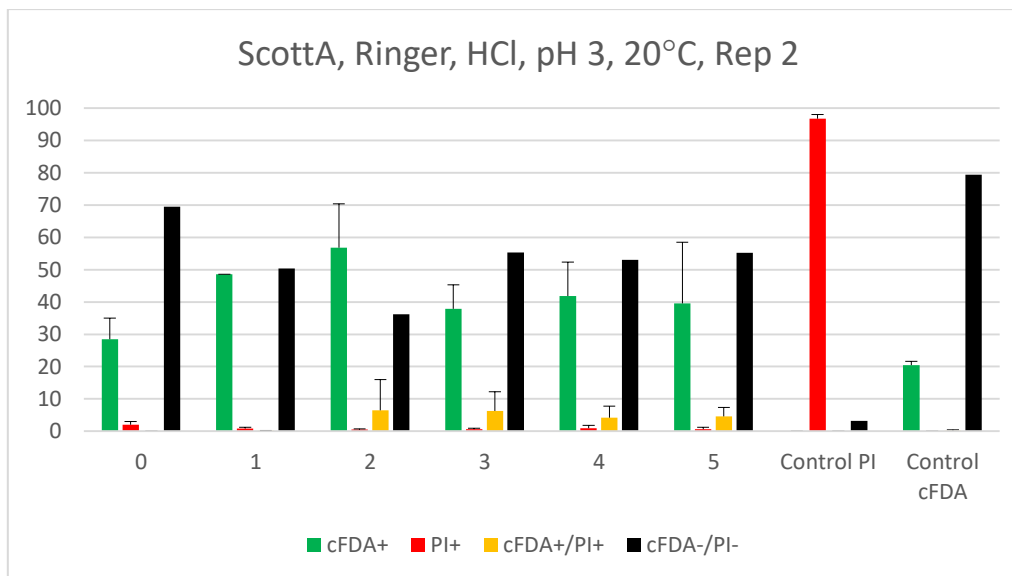
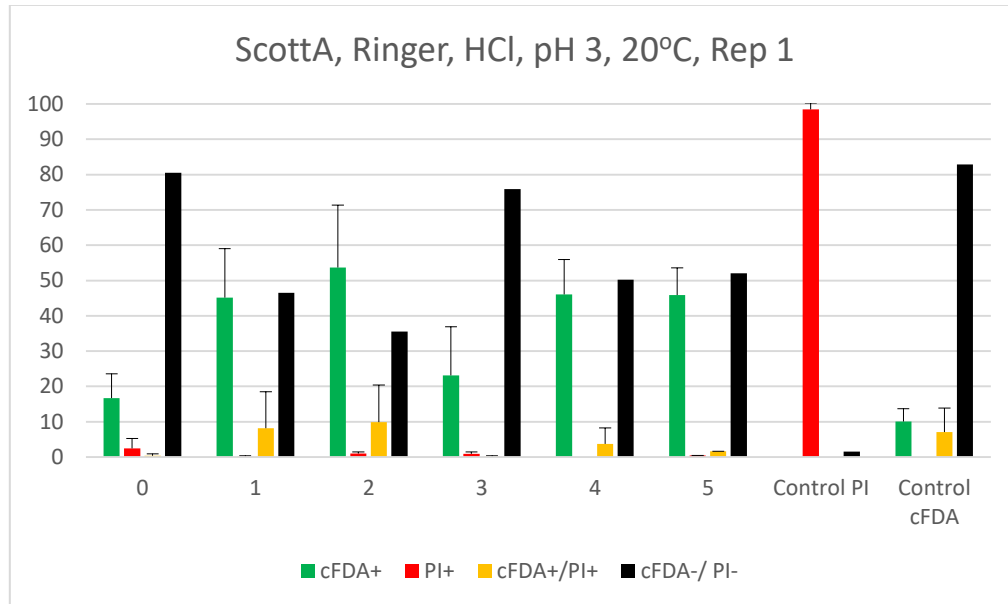
Ο υποθανάτιος τραυματισμός των κυττάρων παρατηρήθηκε και μέσω της καταπόνησή τους με τη χρήση υδροχλωρικού οξέος. Τα αποτελέσματα του φθορισμού σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη εκτίμηση της καλλιεργησιμότητας, μας επιτρέπουν να ανιχνεύσουμε την επαγωγή της κατάστασης VBNC, έπειτα από την έκθεση του μικροοργανισμού σε διαφορετικές τιμές pH (3, 2.7 και 2.5) του υδροχλωρικού οξέος HCl.

Μετά την επώαση του μικροοργανισμού σε Ringer με pH 3 υδροχλωρικό οξύ HCl στους 20°C, παρατηρείται υψηλό ποσοστό ζωντανών (CFDA+) κυττάρων καθ'όλη την διάρκεια της έκθεσης στον παράγοντα καταπόνησης. Παράλληλα, το ποσοστό των νεκρών (PI+) κυττάρων είναι ιδιαίτερα χαμηλό, ενώ το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων (CFDA+/PI+) είναι υψηλότερο από το ποσοστό των νεκρών κυττάρων. Σημαντικό είναι το ποσοστό των άβαφων κυττάρων (CFDA-/PI-) (**Σχήμα 24**). Οι παρατηρήσεις αυτές είναι κοινές και για τις δύο βιολογικές επαναλήψεις. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 25**, τα κύτταρα διατηρούν την καλλιεργησιμότητά τους.

Αναφορικά με την έκθεση των κυττάρων σε Ringer με pH 2.7 υδροχλωρικό οξύ HCl, σημαντικό είναι ότι το ποσοστό των τραυματισμένων (CFDA+/PI+) κυττάρων, το οποίο παρουσιάζεται υψηλότερο σε σχέση με το pH 3, όπως φαίνεται κυρίως στην 2^η βιολογική επανάληψη (**Σχήμα 26**). Ωστόσο, σχεδόν σταθερά παραμένουν τα ποσοστά των ζωντανών (CFDA+) και νεκρών (PI+) κυττάρων. Τα δεδομένα αυτά, συνδυάζονται με τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των τρυβλίων, αφού τα κύτταρα μετά από την έκθεση σε pH 2.7 υδροχλωρικού οξέος, φαίνεται να διατηρούν την καλλιεργησιμότητά τους, με τον πληθυσμό τους να παραμένει σχεδόν σταθερός στους 9 log CFU/ml (**Σχήμα 27**).

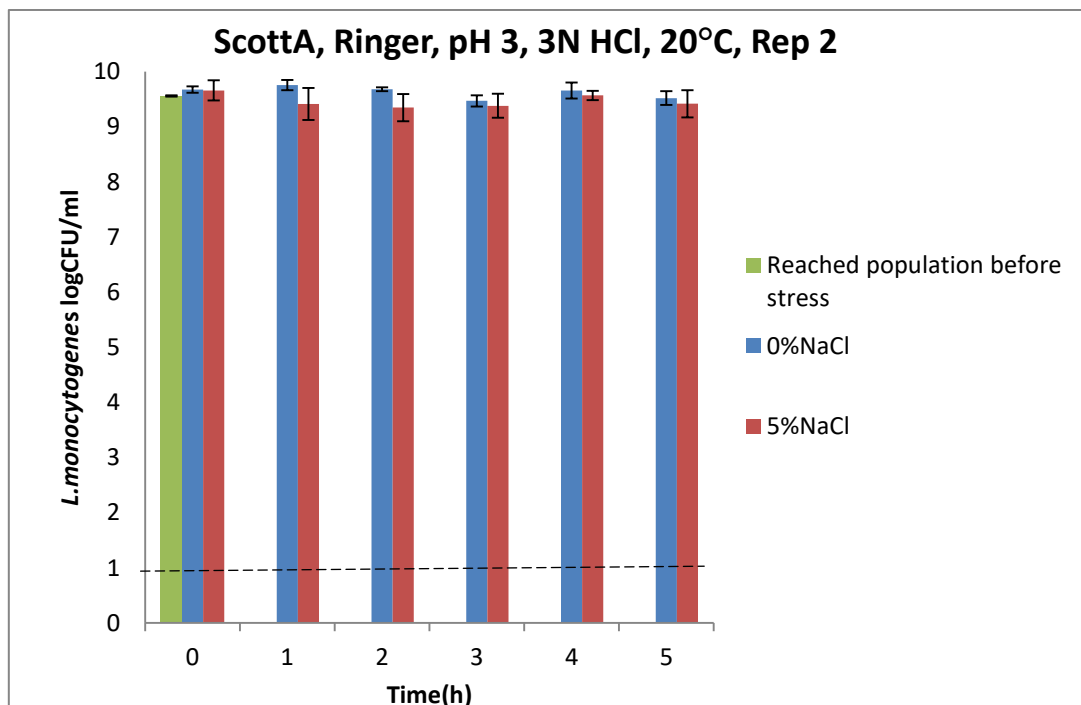
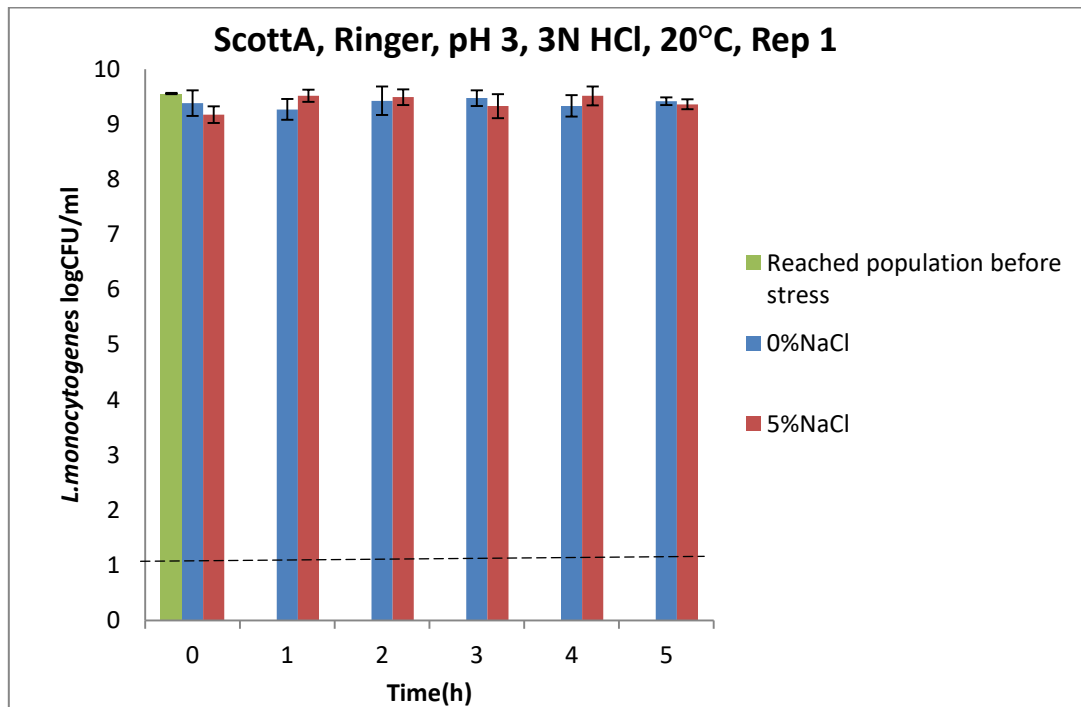
Όταν εκτέθηκαν τα κύτταρα στο pH 2.5 υδροχλωρικού οξέος HCl, παρατηρήθηκαν τα υψηλότερα ποσοστά νεκρών (PI+) κυττάρων, σε σχέση με τις προηγούμενες τιμές pH, όπως είναι ιδιαίτερα εμφανές στην πρώτη βιολογική επανάληψη (**Σχήμα 28**). Επιπλέον, και στις

δύο βιολογικές επαναλήψεις, παρατηρείται σημαντική μείωση των ζωντανών (CFDA+) κυττάρων και αύξηση των άβαφων κυττάρων (CFDA-/PI-). Τα κύτταρα και στη συγκεκριμένη συνθήκη καταπόνησης, διατηρούν την καλλιεργησιμότητά τους (Σχήμα 29) και τη ζωτικότητα τους, με αποτέλεσμα να μην παρουσιάζεται το φαινόμενο της VBNC κατάστασης.



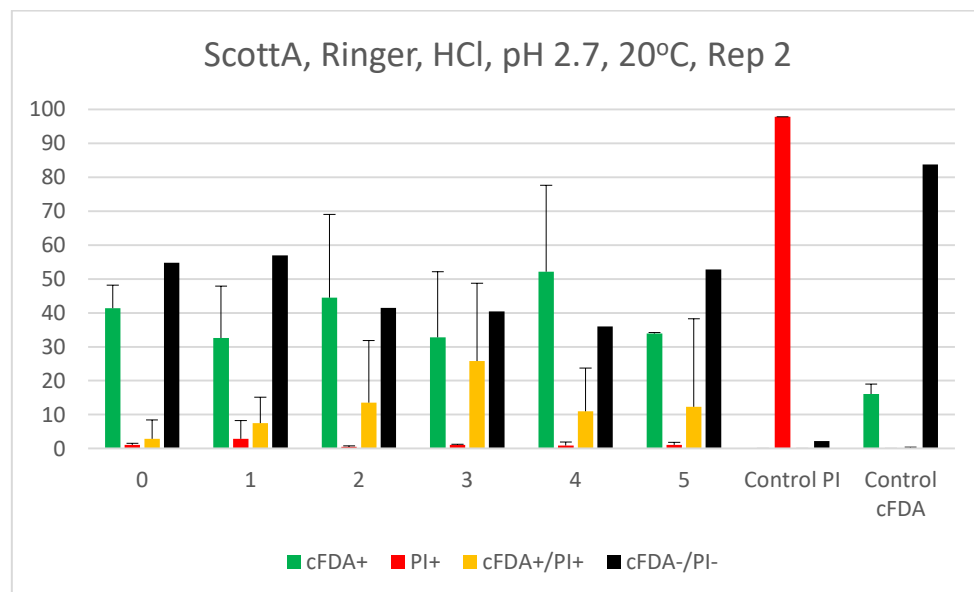
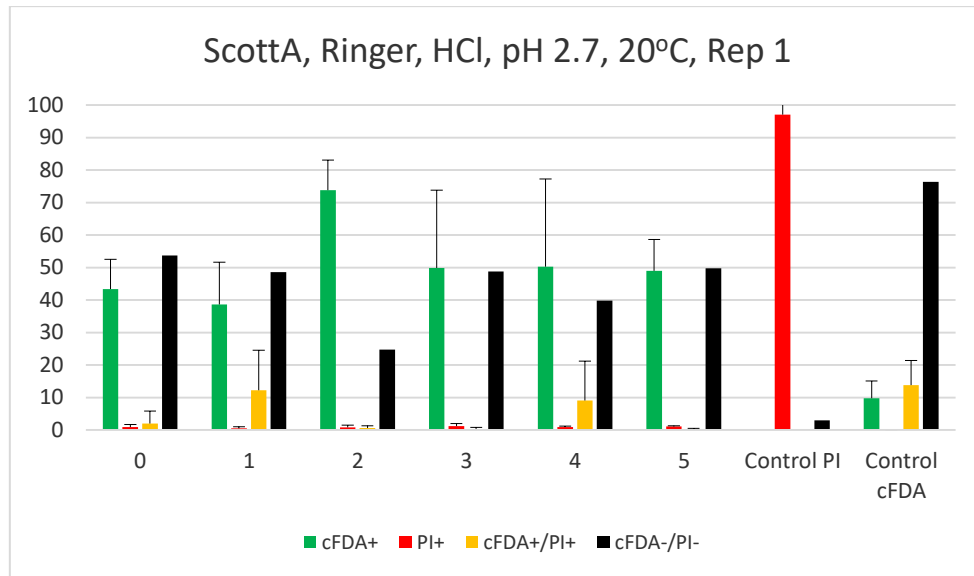
Σχήμα 24 Αποτελέσματα απαρίθμησης των διαφορετικών χρώσεων κυττάρων του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (%κυττάρων ανά οπτικό πεδίο), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer με pH 3 υδροχλωρικού οξέος (HCl). Για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας αποτυπώθηκαν 4 διαφορετικά οπτικά πεδία. Οι

γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν τις τυπικές αποκλίσεις. Τα διαγράμματα αντιστοιχούν σε 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.

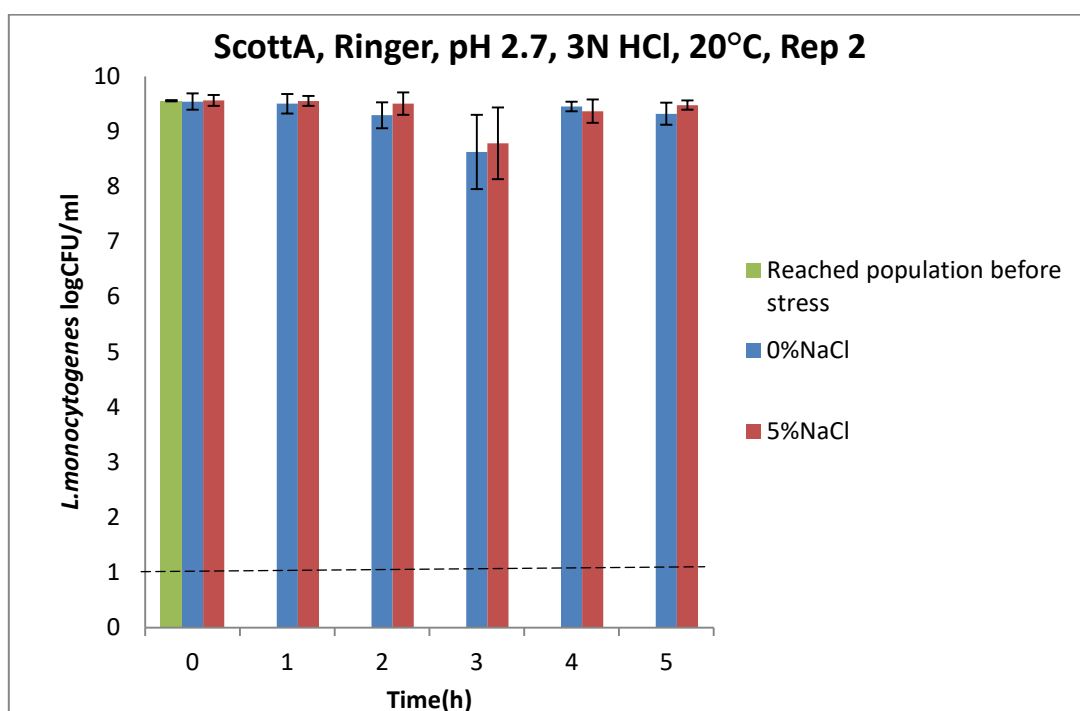
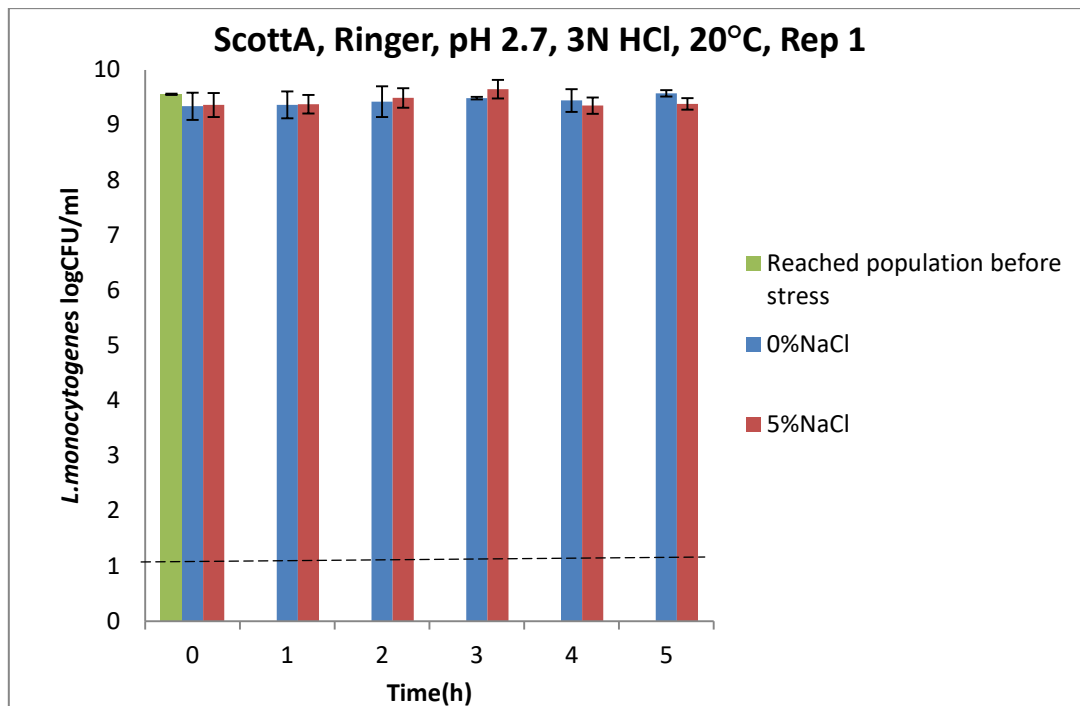


Σχήμα 25 Αξιολόγηση της καλλιεργησιμότητας του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer με τιμή pH 3 υδροχλωρικού οξέος (HCl). Ο πληθυσμός του στελέχους ScottA καταμετρήθηκε

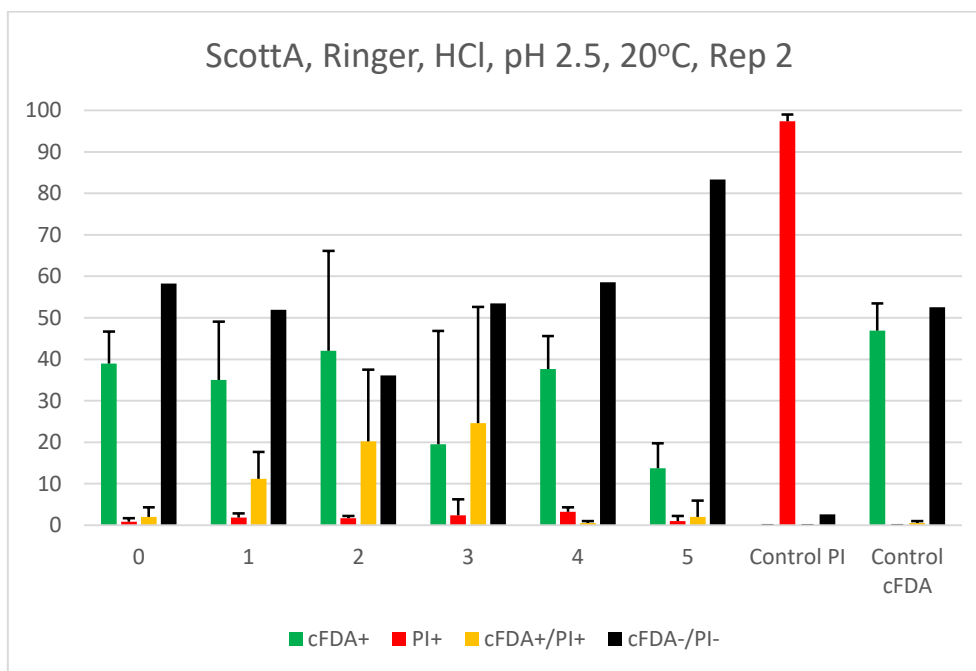
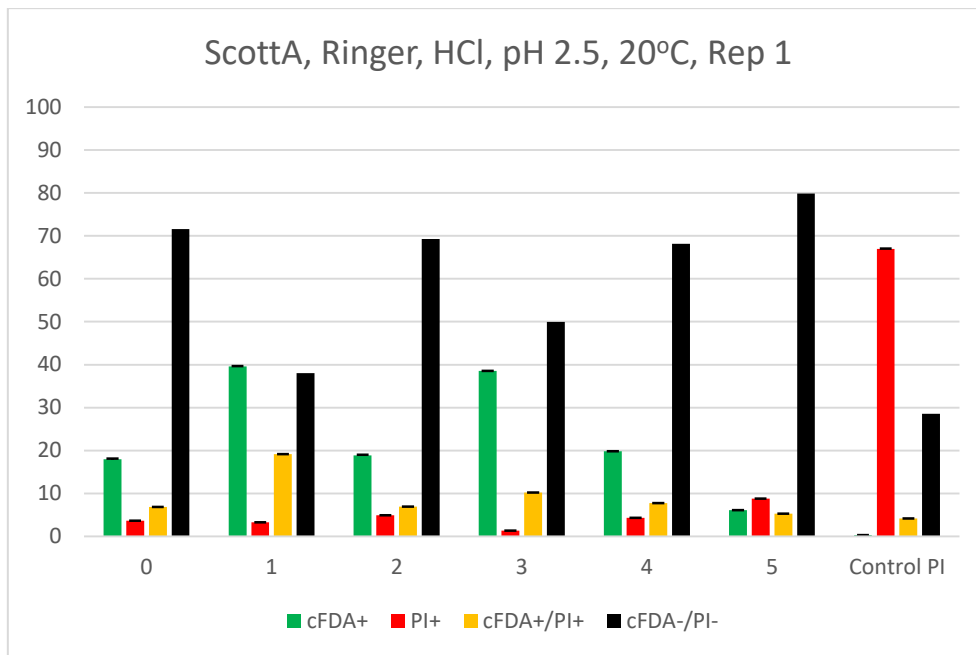
ύστερα από επώαση για 2 ημέρες στους 37°C, σε TSA-Ye με 0% NaCl (μπλε ράβδοι), και για 5 ημέρες στους 37°C, σε TSA-Ye με 5% NaCl (κόκκινες ράβδοι). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το όριο καταμέτρησης της μεθόδου (ο.κ.= 10 CFU / ml). Τα διαγράμματα αντιστοιχούν σε 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.



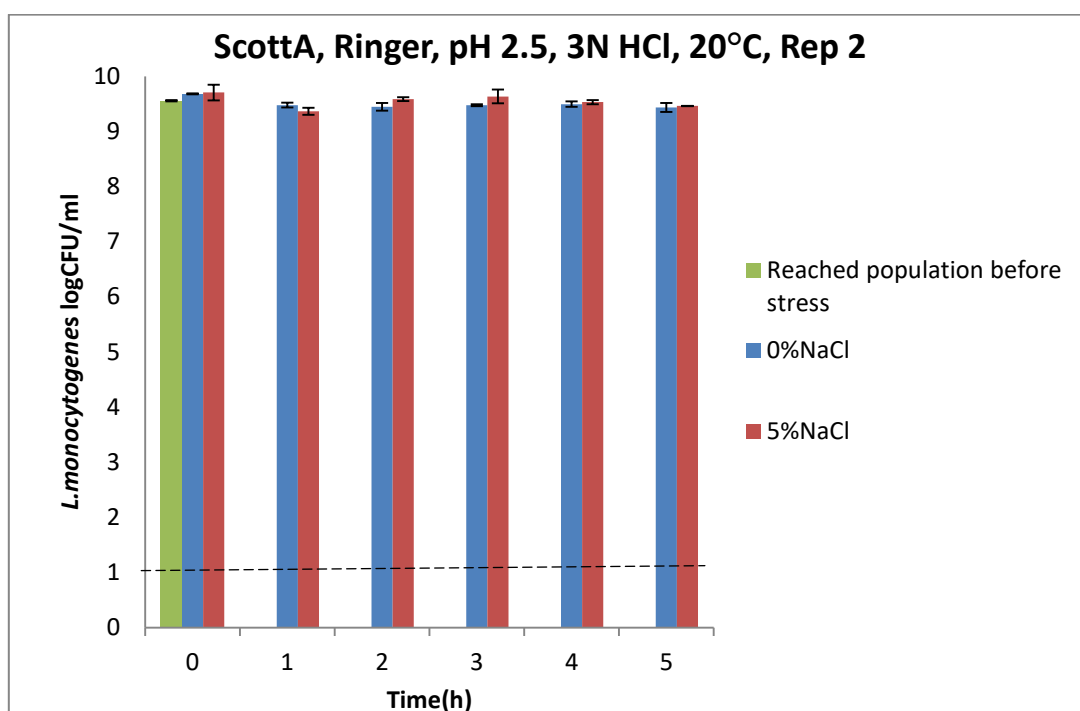
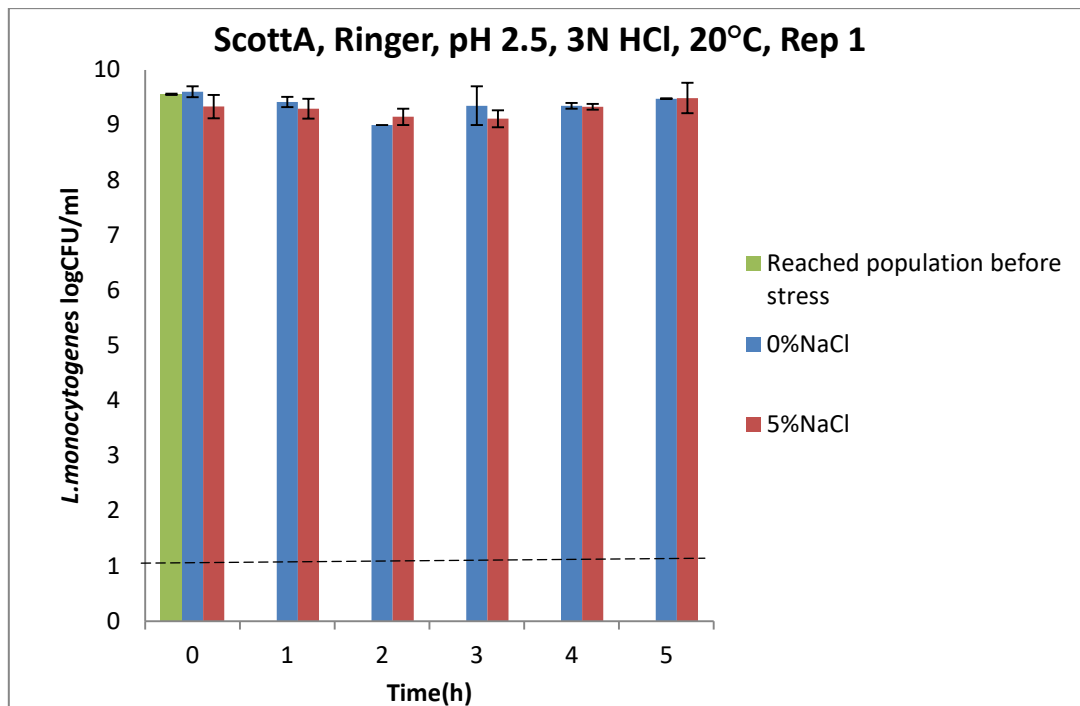
Σχήμα 26 Αποτελέσματα απαρίθμησης των διαφορετικών χρώσεων κυττάρων του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (%κυττάρων ανά οπτικό πεδίο), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer με pH2.7υδροχλωρικού οξέος (HCl). Για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας αποτυπώθηκαν 4 διαφορετικά οπτικά πεδία. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν τις τυπικές αποκλίσεις. Τα διαγράμματα αντιστοιχούν σε 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.



Σχήμα 27 Αξιολόγηση της καλλιεργησιμότητας του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer με τιμή pH2.7υδροχλωρικού οξέος (HCl). Ο πληθυσμός του στελέχους ScottA 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 28 Αποτελέσματα απαρίθμησης των διαφορετικών χρώσεων κυττάρων του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (%κυττάρων ανά οπτικό πεδίο), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer με pH2.5 υδροχλωρικού οξέος (HCl). Για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας αποτυπώθηκαν 4 διαφορετικά οπτικά πεδία. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν τις τυπικές αποκλίσεις. Τα διαγράμματα αντιστοιχούν σε 2 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.



Σχήμα 29 Αξιολόγηση της καλλιεργησιμότητας του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (log CFU/ml), στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer με τιμή pH2.5 υδροχλωρικού οξέος (HCl). Ο πληθυσμός του στελέχους ScottA 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.

Αξιολόγηση της ικανότητας ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB-Υε ύστερα από έκθεση σε διαφορετικές τιμές pH (3, 2.7, 2.5) Acetic Acid (AA) στους 37°C

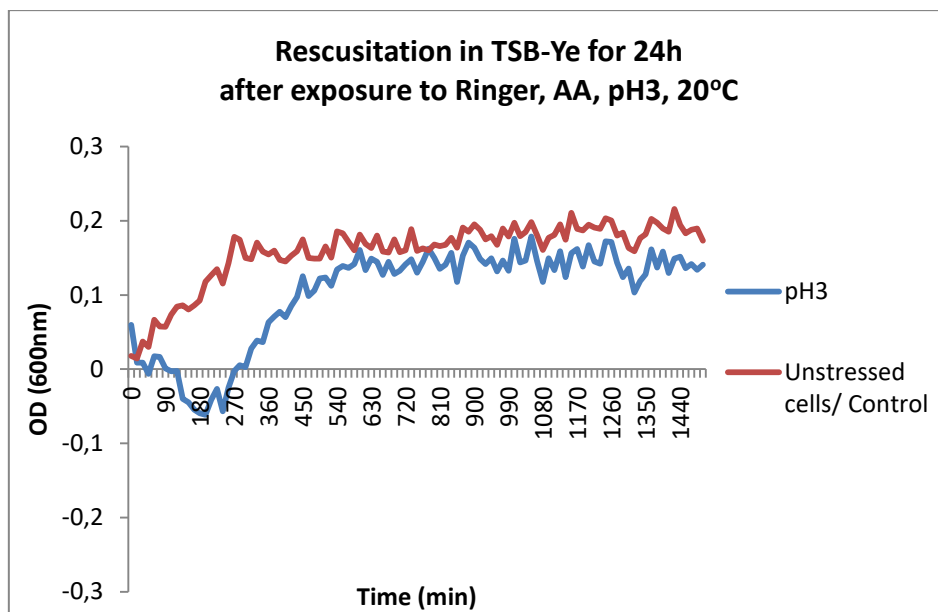
Η μελέτη της ικανότητας ανάκαμψης των κυττάρων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* έγινε μετά την έκθεσή τους σε οξικό οξύ σε διαφορετικές τιμές pH (3, 2.7, 2.5) στους 20°C για 5 ώρες. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα μετά τον χρόνο καταπόνησης, προστέθηκαν στα βιοθρία των πλακών μικροτιτλοδότησης, που περιείχαν θρεπτικό διάλυμα TSB-Υε, προκειμένου να παρατηρήσουμε την ικανότητα του συνολικού πληθυσμού να ανακάμψει ύστερα από τις συνθήκες καταπόνησης και του χρόνου προσαρμογής, με τη συσκευή Bioscreen.

Προκειμένου να προσδιοριστεί το N_{DET} , η συγκέντρωση των κυττάρων που αντιστοιχεί σε OD 0,2, 100μl δείγματα ελήφθησαν αμέσως μετά από κάθε μέτρηση 0,2 OD και επιστρώθηκαν σε TSA-Υε. Η συγκέντρωση των κυττάρων που αντιστοιχεί σε OD 0,2 ήταν 8,685 log CFU / ml.

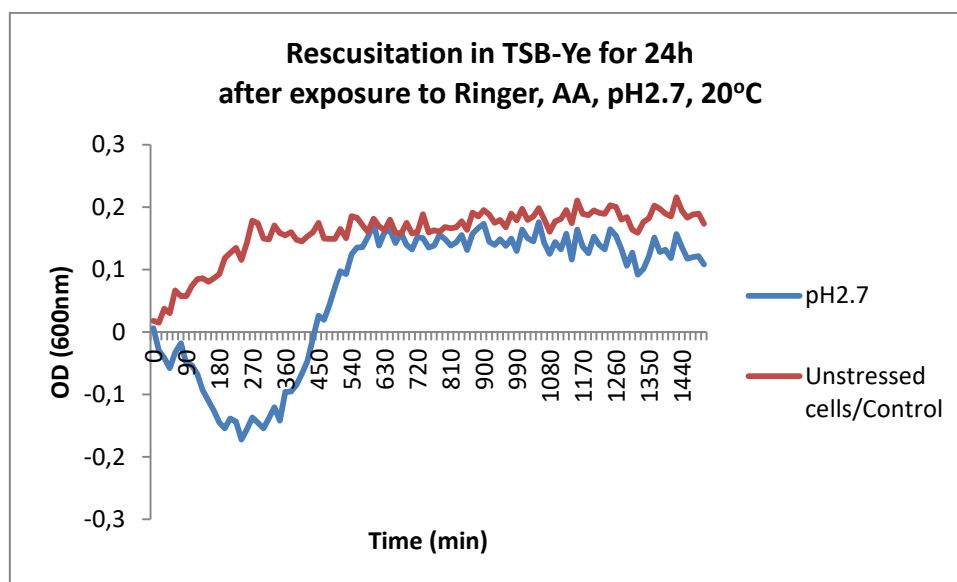
Τα κύτταρα του στελέχους ScottA, μετά την έκθεσή τους για 5 ώρες στους 20°C σε pH 3 οξικό οξύ, υποβλήθηκαν σε μέτρηση του χρόνου προσαρμογής (lag time), με τη χρήση της συσκευής Bioscreen, σε TSB-Υε για 24 ώρες στους 37°C. Με βάση το **Σχήμα 30**, παρατηρείται ικανότητα ανάκαμψης των κυττάρων, τα οποία παρουσιάζουν χρόνο γενεάς επιμηκυμένο σε σχέση με τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων που επώαστηκαν σε TSB-Υε χωρίς την προσθήκη οξικού οξέος (control). Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα που υπέστη όξινη καταπόνηση (pH 3) χρειάστηκαν χρόνο προσαρμογής περίπου $5 \pm 0,1$ ώρες, συγκριτικά με τα κύτταρα control.

Όταν τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε καταπόνηση σε pH 2.7 οξικού οξέος (AA), ο χρόνος προσαρμογής τους παρατάθηκε στις $7,2 \pm 0,1$ ώρες, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 31**.

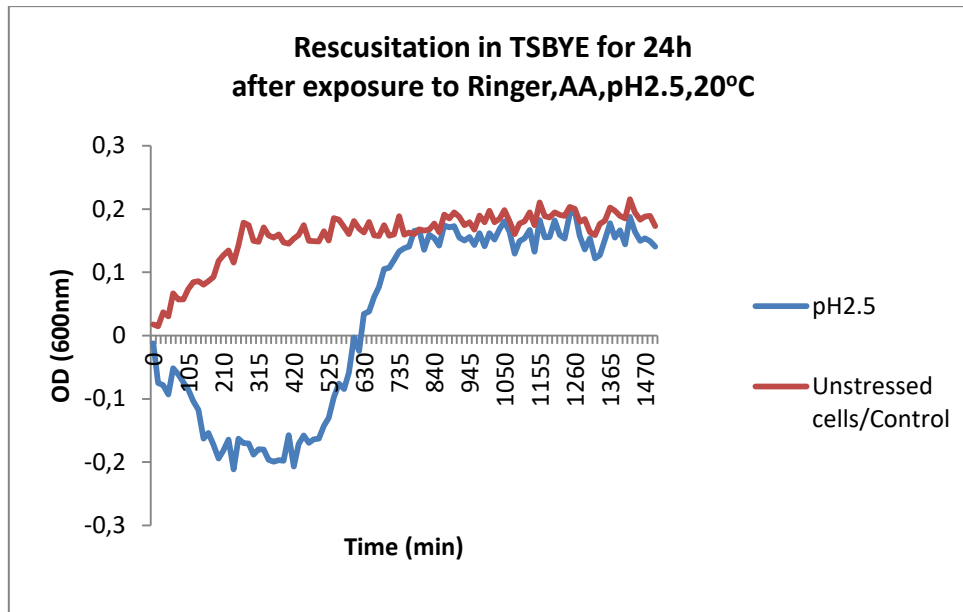
Ωστόσο, ο μεγαλύτερος χρόνος προσαρμογής παρατηρήθηκε μετά την έκθεση των κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού, σε pH 2.5 οξικού οξέος (AA). Με βάση το **Σχήμα 32**, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι τα καταπονημένα κύτταρα χρειάστηκαν χρόνο προσαρμογής περίπου $10 \pm 0,1$, σε σχέση με τα κύτταρα που δεν είχαν υποβληθεί σε συνθήκες καταπόνησης.



Σχήμα 30 Αποτελέσματα ανάκαμψης κυττάρων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* ύστερα από επώαση για 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer με pH 3 οξικού οξέος (AA). Οι μετρήσεις των κυττάρων έγιναν σε TSB-Ye κάθε 15 min για 24 ώρες στους 37°C, με τη χρήση Bioscreen. Το διάγραμμα αντιστοιχεί σε 3 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.



Σχήμα 31 Αποτελέσματα ανάκαμψης κυττάρων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* ύστερα από επώαση για 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer με pH 2.7 οξικού οξέος (AA). Οι μετρήσεις των κυττάρων έγιναν σε TSB-Ye κάθε 15 min για 24 ώρες στους 37°C, με τη χρήση Bioscreen. Το διάγραμμα αντιστοιχεί σε 3 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.



Σχήμα 32 Αποτελέσματα ανάκαμψης κυττάρων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* ύστερα από επώαση για 5 ώρες στους 20°C σε διάλυμα Ringer με pH 2.5 οξικού οξέος (AA). Οι μετρήσεις των κυττάρων έγιναν σε TSB-Υε κάθε 15 min για 24 ώρες στους 37°C, με τη χρήση Bioscreen. Το διάγραμμα αντιστοιχεί σε 3 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.

Αξιολόγηση της ικανότητας ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB-Υε ύστερα από έκθεση σε διαφορετικές τιμές pH (3, 2.7, 2.5) Hydrochloric Acid (HCl) στους 37°C

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην μελέτη της ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε υγρό θρεπτικό μέσο, με τη χρήση Bioscreen, είναι κοινό με το πρωτόκολλο, που ακολουθήθηκε στην μέθοδο μικροσκοπίας φθορισμού.

Κατά την παρατήρηση των μεμονωμένων κυττάρων, με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού, δεν παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού μέχρι τις 5 ώρες, σε καμία τιμή pH HCl, που εξετάστηκε.

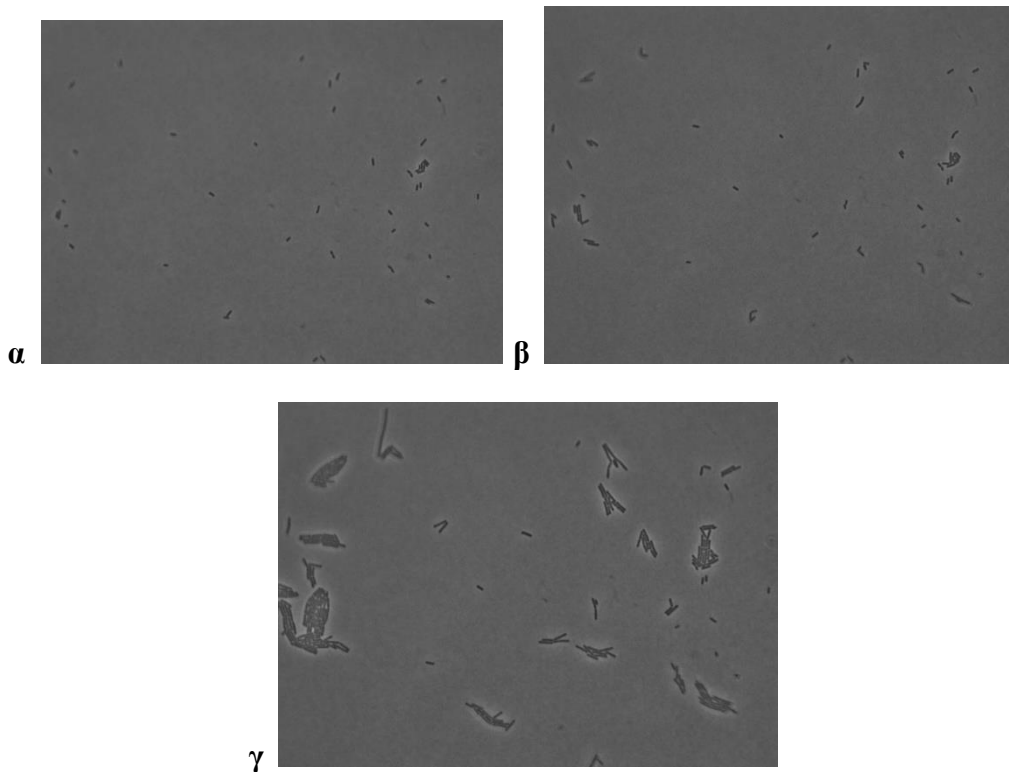
Επομένως, δεν πραγματοποιήθηκε η πειραματική διαδικασία της ανάκαμψης για τη συνθήκη της καταπόνησης των κυττάρων με HCl, καθώς δεν παρατηρήθηκε τραυματισμός.

Αξιολόγηση της ικανότητας ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Υε ύστερα από έκθεση σε διαφορετικές τιμές pH (3, 2.7, 2.5) Acetic Acid (AA) στους 37°C

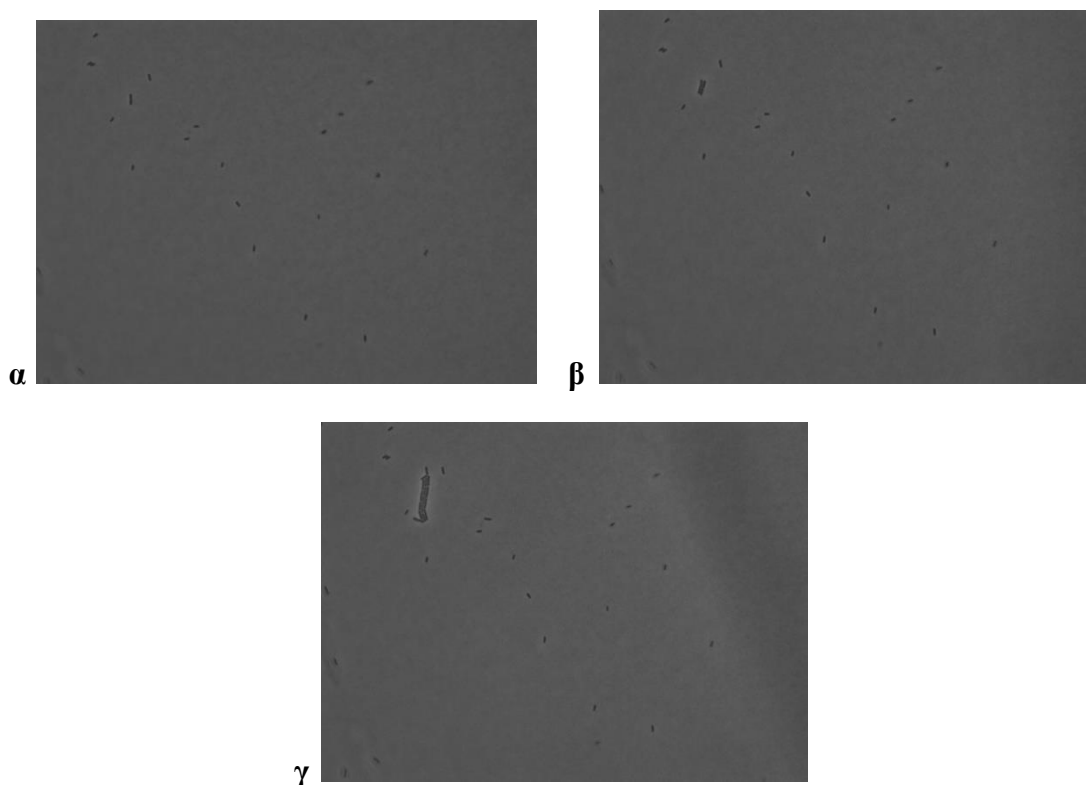
Η ικανότητα ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων παρατηρήθηκε και με την χρήση βιντεομικροσκοπίας, σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Η παρακολούθηση των κυττάρων μας έδωσε την δυνατότητα αξιολόγησης σε πραγματικό χρόνο του χρόνου γενεάς μεμονωμένων κυττάρων, ύστερα από την έκθεση σε διαφορετικές τιμές pH (3, 2.7, 2.5) του οξικού οξέος (AA) στους 20°C.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν, ότι τα κύτταρα του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, εμφανίζουν ικανότητα ανάκαμψης όταν τοποθετούνται σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Υε για 6 ώρες στους 37°C, ύστερα από την έκθεση τους σε οξικό οξύ (AA) ρυθμισμένο σε pH 3 και pH 2.7, για 5 ώρες στους 20°C (**Εικόνες 1, 2**). Πιο συγκεκριμένα, μετά την έκθεση των κυττάρων σε pH 3 οξικού οξέος, παρατηρείται σταδιακή ανάκαμψη, στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA-ΥΕ, μετά από 135 ± 15 λεπτά (**Εικόνα 1β**), ενώ μετά την έκθεση των κυττάρων σε pH 2.7 οξικού οξέος, φαίνεται πως ο χρόνος γενεάς επιμηκύνεται συγκριτικά με το pH 3, καθώς τα κύτταρα εμφανίζουν ανάκαμψη μετά από περίπου 150 ± 15 λεπτά (**Εικόνα 2β**).

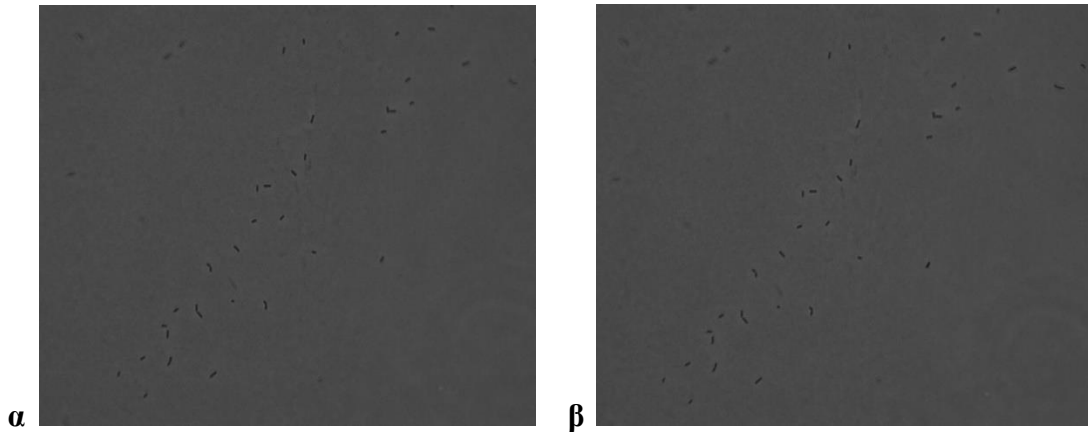
Μετά την παραμονή των κυττάρων σε οξικό οξύ σε pH 2.5 για 5 ώρες, δεν παρατηρείται ανάκαμψη των τραυματισμένων κυττάρων στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Υε μετά το πέρας των 6 ωρών στους 37 °C. Οι εικόνες μικροσκοπίας μετά από 6 ώρες παρακολούθησης, δείχνουν την απουσία ικανότητας των κυττάρων να ανακάμψουν, καθώς τα κύτταρα παραμένουν μεμονωμένα και αδιάκριτα καθ'όλη την παραμονή τους στο TSA-Υε (**Εικόνα 3**).



Εικόνα 1 Αποτύπωση της σταδιακής ανάκαμψης των κυττάρων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 5 ώρες σε Ringer με pH 3 οξικό οξύ AA, τη μηδενική στιγμή (α), μετά από 2 ώρες και 10 λεπτά (β), και μετά από 6 ώρες (γ), παραμονής τους σε TSA-Ye, στους 37°C



Εικόνα 2 Αποτύπωση της σταδιακής ανάκαμψης των κυττάρων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 5 ώρες σε Ringer με pH 2.7 οξικό οξύ AA, τη μηδενική στιγμή (α), μετά από 2 ώρες και 50 λεπτά (β), και μετά από 6 ώρες (γ), παραμονής τους σε TSA-Ye, στους 37°C



Εικόνα 3 Αποτύπωση της απώλειας ικανότητας ανάκαμψης των κυττάρων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, στέλεχος ScottA, ύστερα από επώαση για 5 ώρες σε Ringer με pH 2.5 οξικό οξύ AA, τη μηδενική στιγμή (α), και μετά από 6 ώρες (β), παραμονής τους σε TSA-Ye, στους 37°C

Αξιολόγηση της ικανότητας ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye ύστερα από έκθεση σε διαφορετικές τιμές pH (3, 2.7, 2.5) Hydrochloric Acid (HCl) στους 37°C

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην μελέτη της ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε στερεό θρεπτικό μέσο, με τη χρήση Time lapse, είναι κοινό με το πρωτόκολλο, που ακολουθήθηκε στην μέθοδο μικροσκοπίας φθορισμού.

Κατά την παρατήρηση των μεμονωμένων κυττάρων, με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού, δεν παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού μέχρι τις 5 ώρες, σε καμία τιμή pH HCl, που εξετάστηκε.

Επομένως, δεν πραγματοποιήθηκε η πειραματική διαδικασία της ανάκαμψης για τη συνθήκη της καταπόνησης των κυττάρων με HCl, καθώς δεν παρατηρήθηκε τραυματισμός.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι καταπονήσεις που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, προκάλεσαν υποθανάτιο τραυματισμό στα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Η έκθεση των βακτηρίων σε υποθανάτια ένταση καταπονήσεις, που σχετίζονται με την επεξεργασία τροφίμων και τους χώρους επεξεργασίας τροφίμων, δημιουργεί υποπληθυσμούς υγιών, τραυματισμένων και νεκρών κυττάρων. Το μέγεθος των υποπληθυσμών μεταβάλλεται σε κάθε περίπτωση, όσο εντείνεται η έκθεση στην καταπόνηση.

Σκοπός της μελέτης, ήταν η διερεύνηση των συνθηκών, που μπορούν να επάγουν την κατάσταση VBNC των κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, τόσο σε επίπεδο πληθυσμού, όσο και σε μεμονωμένα κύτταρα, καθώς και η ικανότητα ανάκαμψης αυτών των κυττάρων σε πραγματικό χρόνο.

Για να επιτευχθούν τα παραπάνω, κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* εκτέθηκαν σε οξικό οξύ (pH 3, 2.7 και 2.5) και υδροχλωρικό οξύ (pH 3, 2.7 και 2.5), στους 20°C και στους 4°C. Η μείωση του pH, αποδεικνύεται πως αυξάνει το ποσοστό του υποθανάτιου τραυματισμού και στις δύο θερμοκρασίες, με την έκθεση στο οξικό οξύ να παρατηρείται υψηλότερο επίπεδο υποθανάτιου τραυματισμού. Κάτι τέτοιο επιβεβαιώνεται και από τους **Sorrells et al., 1989**, οι οποίοι απέδειξαν ότι τα ασθενή οξέα (Acetic Acid) έχουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση συγκριτικά με τα ισχυρά οξέα (Hydrochloric Acid).

Πιο αναλυτικά, αναφορικά με τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του υποθανάτιου τραυματισμού οξικού οξέος στους 20°C, παρατηρείται ότι όσο μειώνεται το pH, τόσο πιο έντονος τραυματισμός παρατηρείται στα κύτταρα, με τον ανθεκτικό υποπληθυσμό να παρουσιάζει πιο χαμηλά επίπεδα σε σχέση με τον συνολικό πληθυσμό. Συγκεκριμένα, όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε pH 3, παρέμειναν βιώσιμα μέχρι και την 5^η ώρα (**Σχήμα 6**) ενώ όταν εκτέθηκαν σε pH 2.7, έχασαν την βιωσιμότητά τους μετά την 2^η ώρα επώασης στο διάλυμα καταπόνησης (**Σχήμα 7**). Ο μεγαλύτερος βαθμός τραυματισμού παρουσιάστηκε, όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε pH 2.5, όπου παρατήρησαν πλήρη θανάτωση (**Σχήμα 8**). Ομοίως, οι **Chen et al, 2019**, παρατήρησαν ότι όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του μυριστικού οξέος, δηλαδή μειωνόταν το pH, τόσο περισσότερα κύτταρα του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, θανατώνονταν.

Η θερμοκρασία επώασης των 20°C αποδείχθηκε ότι καταπονεί περισσότερο τα κύτταρα όταν εκτίθενται σε Ringer, οξικό οξύ, pH 3, απ' ό τι η θερμοκρασία των 4°C. Στο **Σχήμα 9**, φαίνεται ότι ο πληθυσμός παραμένει σχεδόν σταθερός καθ' όλη την διάρκεια της επώασης, στους 4°C. Αντίθετα, στο **Σχήμα 11**, παρατηρείται μείωση του συνολικού πληθυσμού, μέχρι την 4^η ώρα και μετά πλήρη θανάτωση, με τον ανθεκτικό υποπληθυσμό, να θανατώνεται ήδη μετά τη 1^η ώρα επώασης σε pH 2.5. Αντίστοιχα, οι **Ahamad et al., 1990**, παρατήρησαν ότι ο χρόνος για να μειωθεί ο πληθυσμός των κυττάρων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, ήταν πιο σύντομος όταν εκτέθηκε στους 35°C, απ' ό τι στους 13°C, όπου παρέμεινε βιώσιμος για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα στη χαμηλή θερμοκρασία.

Κατά την έκθεση των κυττάρων σε υδροχλωρικό οξύ (pH 3) σε θερμοκρασία 20°C, τα κύτταρα έμειναν σχεδόν σταθερά και στις 5 ώρες (**Σχήμα 12**), ενώ όταν εκτέθηκαν σε pH 2.7, παρατηρήθηκε μια μείωση περίπου 4 log CFU/ml (**Σχήμα 13**). Παρατηρώντας το **Σχήμα 14**, τα κύτταρα έχασαν την βιωσιμότητά τους, μετά την 2^η ώρα επώασης, όταν εκτέθηκαν σε pH 2.5 HCl. Φαίνεται ότι η θερμοκρασία επώασης επηρεάζει την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στην καταπόνηση, αφού κατά την έκθεση των κυττάρων στους 4°C σε pH 3 (**Σχήμα 15**) και pH 2.7 (**Σχήμα 16**), ο συνολικός πληθυσμός, παρέμεινε σχεδόν σταθερός. Μείωση περίπου 5 log CFU/ml, παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε pH 2.5 HCl (**Σχήμα 17**).

Ύστερα από τις παραπάνω συνθήκες κυτταρικού υποθανάτιου τραυματισμού, ακολούθησαν πειράματα, με τη χρήση Μικροσκοπίου Φθορισμού. Όσον αφορά την εκτίμηση της ικανότητας επαγωγής της κατάστασης Ζώντα αλλά μη Καλλιεργήσιμα (Viable But Non Culturable, VBNC state) χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τιμές pH (3, 2.7 και 2.5) του οξικού οξέος (AA) και του υδροχλωρικού οξέος (HCl), 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.

Στις συγκεκριμένες συνθήκες καταπόνησης, τόσο στην περίπτωση του οξικού οξέος, όσο και στην περίπτωση του υδροχλωρικού οξέος, δεν παρατηρήθηκε η επαγωγή της κατάστασης VBNC, καθώς τα κύτταρα παρουσίαζαν μετρήσιμα ποσοστά πράσινου φθορισμού, χωρίς να χάσουν την καλλιεργησιμότητά τους. Όσον αφορά τις τιμές του pH προσαρμοσμένες σε οξικό οξύ, είναι σαφές ότι καθώς αυξάνεται η ένταση του στρες υπάρχει μια ανιχνεύσιμη λογαριθμική μείωση του πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός (log CFU/ml) του

μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, στέλεχος ScottA, σε Ringer, pH 2.7 ρυθμισμένο με οξικό οξύ, δείχνει μείωση ~ 1 log CFU/ml, μετά από 3 ώρες έκθεσης (**Σχήμα 21**). Όταν η ένταση της καταπόνησης αυξήθηκε από pH 2.7 σε pH 2.5, παρατηρήθηκε η ίδια μείωση του πληθυσμού (~ 1 log CFU/ml), μετά από 1 ώρα έκθεσης (**Σχήμα 23**). Στο ίδιο χρονικό σημείο, υπάρχει μια σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών, συνολικού και ανθεκτικού, γεγονός που δείχνει τραυματισμό.

Η επώαση σε διαφορετικές τιμές pH προσαρμοσμένες με υδροχλωρικό οξύ, έδειξε ότι ο βακτηριακός πληθυσμός, παραμένει στο ίδιο επίπεδο (~ 9 log CFU/ml) καθ'όλη την έκθεση στην καταπόνηση (**Σχήμα 25, Σχήμα 27, Σχήμα 29**). Ωστόσο, όπως παρατηρείται στο **Σχήμα 26** και **Σχήμα 28**, κατά την έκθεση σε υδροχλωρικό οξύ pH 2.7 και pH 2.5, αντίστοιχα, ο αριθμός των τραυματισμένων κυττάρων (CFDA+/PI+), είναι υψηλός, υποδεικνύοντας μια ενδιάμεση κατάσταση τραυματισμού, επιβεβαιώνοντας τη ύπαρξη μιας συνεχούς μεταβατικής κατάστασης λήθαργου.

Κατά την έκθεση των κυττάρων σε υδροχλωρικό οξύ και στα τρία διαφορετικά pH, που εξετάστηκαν, υψηλός βαθμός άβαφων κυττάρων (CFDA-/PI-) ήδη από τα control (**Σχήμα 24, Σχήμα 26, Σχήμα 28**). Το γεγονός αυτό, πιθανώς, οφείλεται στην επίδραση της καταπόνησης στις εστεράσες του συγκεκριμένου υποπληθυσμού, μειώνοντας την μεταβολική τους δραστηριότητα, χωρίς να προκαλούνται βλάβες στην κυτταρική μεμβράνη (**Massaro et al., 1989**). Σύμφωνα, με τους **Bunthof et al., 2000**, όταν τα κύτταρα του μικροοργανισμού *Lactococcus lactis* επισημανθήκαν με την χρωστική CFDA, την εξώθησαν σε λιγότερο από 2 λεπτά, μόλις προστέθηκε λακτόζη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός, ότι όταν προστίθεται στα κύτταρα λακτόζη, αυτά αρχίζουν να παράγουν ATP, δείχνοντας ότι η εξώθηση πιθανότατα προκαλείται από ένα σύστημα μεταφοράς, που οδηγείται από ATP. Αυτό μπορεί να εξηγήσει το γεγονός ότι τα κύτταρα του control του CFDA, στην παρούσα μελέτη, εμφανίζουν συστηματικά μεγάλο αριθμό άβαφων κυττάρων (CFDA-/PI-). Πιο συγκεκριμένα, η καλλιέργεια επώαστηκε για 18 ώρες στους 30°C, σε ζωμό TSB, που περιέχει 2.5gm/litre γλυκόζη, και έπειτα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά. Το ίζημα που προέκυψε, επαναιωρήθηκε σε 4 ml Ringer και στη συνέχεια σε 100 μl τη καλλιέργειας, προστέθηκαν 2 μL της χρωστικής CFDA, και επώαστηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ενώ ένα σημαντικό ποσοστό κυττάρων, έδειξε πράσινο φθορισμό μετά την επώαση, υπήρχε ένας ανιχνεύσιμος άβαφος υποπληθυσμός (CFDA-/PI-). Επομένως, με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να υποθέσουμε ότι αυτά τα κύτταρα δεν μπόρεσαν να προσαρμοστούν γρήγορα

στην αλλαγή του διαλύματος και για αυτό δεν έδειξαν φθορισμό. Επιπλέον, υπήρξε μια αλλαγή του εξωκυτταρικού pH, από $\sim 5.5 \pm 0.5$ (TSB) σε $\sim 7.5 \pm 0.5$ (Ringer.)

Αντίστοιχο φαινόμενο του υψηλού βαθμού άβαφων κυττάρων (CFDA-/PI-), παρατηρήθηκε και κατά την έκθεση των κυττάρων σε οξικό οξύ και στα τρία διαφορετικά pH (3, 2.7 και 2.5) (**Σχήμα 18, Σχήμα 20, Σχήμα 22**).

Σημαντικό μέρος του συγκεκριμένου πειράματος, ήταν η μελέτη της ανάκαμψης τραυματισμένων κυττάρων σε υγρό και στερεό θρεπτικό μέσο. Η βακτηριακή ανάπτυξη μπορεί να είναι πλαγκτονική σε υγρό ή αποικιακή. Το μικρο-περιβάλλον των βακτηριακών κυττάρων όταν αναπτύσσονται σε αποικίες μπορεί να διαφέρει πολύ από αυτό όταν αναπτύσσονται πλαγκτονικά (**Skandamis et al., 2015**). Στη συγκεκριμένη μελέτη, προσπαθήσαμε να εξετάσουμε την ανάνηψη με βάση τόσο το υγρό θρεπτικό μέσο, όσο και το στερεό θρεπτικό μέσο, των θανάσιμα τραυματισμένων κυττάρων, με κύριο στόχο να εξετάσουμε την ικανότητα ανάνηψης ολόκληρου του πληθυσμού, αλλά και των μεμονωμένων κυττάρων στους 37°C. Η διάρκεια της φάσης υστέρησης της ανάνηψης των τραυματισμένων κυττάρων επηρεάστηκε σημαντικά από την ένταση της καταπόνησης.

Πιο συγκεκριμένα, μετά την έκθεση των κυττάρων σε pH 3 οξικού οξέος, η τιμή του χρόνου προσαρμογής ήταν $5 \pm 0,1$ ώρες (**Σχήμα 30**), ενώ μετά την έκθεση σε pH 2.7 οξικού οξέος (**Σχήμα 31**) και pH 2.5 (**Σχήμα 32**) ήταν $7,2 \pm 0,1$ και $10 \pm 0,1$, αντίστοιχα. Είναι σαφές ότι η ένταση του στρες αυξάνει την παράταση της διάρκειας της φάσης υστέρησης. Ανάκαμψη τραυματισμένων κυττάρων από οξικό οξύ, του μικροοργανισμού *Salmonella enterica*, παρατήρησαν και οι **Liao et al. 2005**, οι οποίοι απέδειξαν ότι η ανάκαμψη επηρεάζεται σημαντικά από την θερμοκρασία επώασης. Παρατήρησαν ότι τα τραυματισμένα κύτταρα από οξικό οξύ, μπόρεσαν να ανακάμψουν στους 20 °C ή 35 °C, αλλά όχι στους 4°C.

Η παρατήρηση της ικανότητας ανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων, έγινε και σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (TSA-Ye) στους 37°C. Αποτύπωση εικόνων μετά από 6 ώρες παρακολούθησης, αποδεικνύουν την σταδιακή ανάκαμψη των κυττάρων σε pH 3 (**Εικόνα 1**) και pH 2.7 (**Εικόνα 2**), εμφανίζοντας μεγαλύτερο χρόνο γενεάς όσο μειώνεται η τιμή pH. Ύστερα από την έκθεση σε οξικό οξύ (AA) pH 2.5, τα κύτταρα έχασαν την ικανότητα ανάκαμψής τους, στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (**Εικόνα 3**). Στην παρούσα μελέτη, επιβεβαιώνεται ότι η φυσική κατάσταση του θρεπτικού μέσου, υγρό ή στερεό, παίζει μεγάλο ρόλο στην επίδραση της ικανότητας των τραυματισμένων κυττάρων, να ανακάμψουν. Πιο συγκεκριμένα, όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε υγρό θρεπτικό μέσο, έχουν την ικανότητα να

κινούνται σε περιοχές πλούσιες σε θρεπτικά συστατικά και να απομακρύνουν τους μεταβολίτες μακριά τους, δημιουργώντας ένα προσωρινό ομοιόμορφο περιβάλλον (**Wilson et al, 2002**). Αντίθετα, στην περίπτωση του στερεού θρεπτικού υποστρώματος, η αναπλήρωση των θρεπτικών ουσιών πραγματοποιείται μόνο από τον πυθμένα ή την περίμετρο της αποικίας, με αποτέλεσμα τα κύτταρα στο κέντρο της αποικίας να βιώνουν λοιμό. Αυτό θέτει περιορισμούς στην ανάπτυξη των κυττάρων σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, καταστέλλοντας τον ρυθμό ανάπτυξής τους, συγκριτικά με το υγρό θρεπτικό μέσο (**Skandamis et al., 2015**).

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. Ξεκινώντας από το επίπεδο ενός κυττάρου και προσομοιώνοντας το σχηματισμό αποικίας ή τον πολλαπλασιασμό σε υψηλούς αριθμούς κυττάρων σε πλαγκτονικό επίπεδο, μπορεί να βοηθήσει στην εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων σχετικά με την αναμενόμενη συμπεριφορά μεγάλων πληθυσμών. 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 (**Habimana et al., 2011**).

Εν κατακλείδι, ο υποθανάτιος τραυματισμός και η κατάσταση VBNC, αποτελούν αναδυόμενους κινδύνους για την Βιομηχανία Τροφίμων, σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων. Όπως αποδείχτηκε, κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση λήθαργου, μόλις βρεθούν σε ευνοϊκές συνθήκες μπορούν να ανακάμψουν διατηρώντας την μολυσματικότητά τους, αποτελώντας σημαντική απειλή για τον καταναλωτή. Η παρούσα μελέτη εντάσσεται και ίσως συμβάλλει στη γενικότερη προσπάθεια της Επιστήμης Τροφίμων, αρχικά να εκτιμήσει και στη συνέχεια να αντιμετωπίσει τον κίνδυνο, που ενέχει ο υποθανάτιος τραυματισμός.

Σε συνέχεια της παρούσας μελέτης, κρίσιμο θα ήταν μελλοντικά, να μελετηθούν και οι μοριακοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στην επαγωγή της VBNC κατάστασης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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.

Angelidis, A. S., & Smith, G. M. (2003). *Three Transporters Mediate Uptake of Glycine Betaine and Carnitine by Listeria monocytogenes in Response to Hyperosmotic Stress. Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1013–1022. doi:10.1128/aem.69.2.1013-1022.2003

Avery, S. V. (2006). Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 577-587

Balomenos, A. D., Tsakanikas, P., Aspidou, Z., Tampakaki, A. P., Koutsoumanis, K. P., & Manolagos, E. S. (2017). *Image analysis driven single-cell analytics for systems microbiology. BMC Systems Biology*, 11(1).

Bayles, D. O., and B. J. Wilkinson. 2000. Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:23–27

Boura, M., Brenson, D., & Karatzas, K. A. G. (2019). A novel role for the glutamate decarboxylase system in *Listeria monocytogenes*; protection against oxidative stress. *Food Microbiology*, 103284. doi:10.1016/j.fm.2019.103284

Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). *A review of Listeria monocytogenes: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. Food Control*, 75, 1–13. doi:10.1016/j.foodcont.2016.12.016

Bucur, F. I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C. U., & Nicolau, A. I. (2018). *Resistance of Listeria monocytogenes to Stress Conditions Encountered in Food and Food Processing Environments. Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.02700

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.

Burgess, C. M., Gianotti, A., Gruzdev, N., Holah, J., Knöchel, S., Lehner, A., ... Tresse, O. (2016). *The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. International Journal of Food Microbiology*, 221, 37–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.014

Cappelier, J. M., Besnard, V., Roche, S. M., Velge, P., and Federighi, M. (2007). Avirulent viable but non culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. *Vet. Res.* 38, 573–583. doi: 10.1051/vetres:2007017

Centers for Disease Control and Prevention. Vital signs: Listeria illnesses, deaths, and outbreaks – United States, 2009–2011. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2013; 62: 448–452.

Chen, X., Zhao, X., Deng, Y., Bu, X., Ye, H., & Guo, N. (2019). *Antimicrobial potential of myristic acid against Listeria monocytogenes in milk. The Journal of Antibiotics*. doi:10.1038/s41429-019-0152-5

Cossart, P. (2007). *Listeriology (1926–2007): the rise of a model pathogen. Microbes and Infection, 9(10), 1143–1146*. doi:10.1016/j.micinf.2007.05.001

Cotter, P. D., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2000). *Analysis of the role of the Listeria monocytogenes FOF1-ATPase operon in the acid tolerance response. International Journal of Food Microbiology, 60(2-3), 137–146*. doi:10.1016/s0168-1605(00)00305-6

Cotter, P. D., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2001). *A glutamate decarboxylase system protects Listeria monocytogenes in gastric fluid. Molecular Microbiology, 40(2), 465–475*. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02398.x

Cotter, P. D., Ryan, S., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2005). *Presence of GadD1 Glutamate Decarboxylase in Selected Listeria monocytogenes Strains Is Associated with an Ability To Grow at Low pH. Applied and Environmental Microbiology, 71(6), 2832–2839*. doi:10.1128/aem.71.6.2832-2839.2005

Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., & Liao, X. (2019). *Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. doi:10.1111/1541-4337.12513

Doyle P. Michael, Beuchat R. Larry *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, Third Edition (2007)* Center for Food Safety, The University of Georgia, Griffin, GA 30223-1797

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2013. *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011*

EFSA, ECDC, 2016. *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016*. doi: 10.2903/j.efsa.2017.5077

E.G.D. Murray, R.A. Webb, H.B.R. Swann, *A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus Bacterium monocytogenes (n.sp.), J. Pathol. Bacteriol. 29 (1926) 407e439.*

Fakruddin, M., Mannan, K. S. B., & Andrews, S. (2013). *Viable but Nonculturable Bacteria: Food Safety and Public Health Perspective. ISRN Microbiology, 2013, 1–6*. doi:10.1155/2013/703813

FAO, 2004 (Food and Agriculture Organization of the United Nations) *Risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods: Technical report*

- Ferreira V., Wiedmann M., Teixeira P., Stasiewicz M. J., (2014). Review: *Listeria monocytogenes* Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health, *J Food Protect.*, 77/1, 150-170.
- Fraser, K. R., & O'Byrne, C. P. (2002). *Osmoprotection by carnitine in a Listeria monocytogenes mutant lacking the OpuC transporter: evidence for a low affinity carnitine uptake system. FEMS Microbiology Letters*, 211(2), 189–194. doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11223.x
- Fraser, H. B., Hirsh, A. E., Giaever, G., Kumm, J., & Eisen, M. B. (2004). Noise minimization in eukaryotic gene expression. *Plos Biology*, 2(6), 834-838.
- Freitag, N. E., Port, G. C., & Miner, M. D. (2009). *Listeria monocytogenes* — from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 623–628. doi:10.1038/nrmicro2171
- Goldman, S. L., MacKay, M., Afshinnekoo, E., Melnick, A. M., Wu, S., & Mason, C. E. (2019). *The Impact of Heterogeneity on Single-Cell Sequencing. Frontiers in Genetics*, 10. doi:10.3389/fgene.2019.00008
- Gonzalez-Fandos, E., & Herrera, B. (2014). *Efficacy of Acetic Acid against Listeria monocytogenes Attached to Poultry Skin during Refrigerated Storage. Foods*, 3(3), 527–540. doi:10.3390/foods3030527
- Gutierrez, C., Abee, T., & Booth, I. R. (1995). *Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. International Journal of Food Microbiology*, 28(2), 233–244. doi:10.1016/0168-1605(95)00059-3
- Habimana, O., Guillier, L., Kulakauskas, S., and Briandet, R. (2011). Spatial competition with *Lactococcus lactis* in mixed-species continuous-flow biofilms inhibits *Listeria monocytogenes* growth. *Biofouling* 27, 1065–1072. doi: 10.1080/08927014.2011.626124
- Hartsell, S.E., 1951. The longevity and behavior of pathogenic bacteria in frozen food: the influence of plating media. *Am. J. Public Health* 41, 1072–1077
- Heavin, S. B., Brennan, O. M., Morrissey, J. P., & O'Byrne, C. P. (2009). *Inhibition of Listeria monocytogenes by acetate, benzoate and sorbate: weak acid tolerance is not influenced by the glutamate decarboxylase system. Letters in Applied Microbiology*, 49(2), 179–185. doi:10.1111/j.1472-765x.2009.02634.x
- Hill, D., Sugrue, I., Arendt, E., Hill, C., and Stanton, C. (2017). Recent advances in microbial fermentation for dairy and health [version 1; referees:3 approved]. *FI000Res*. 6:751. doi: 10.12688/f1000research.10896.1
- Jami, M., Ghanbari, M., Zunabovic, M., Domig, K. J., & Kneifel, W. (2014). *Listeria monocytogenes in Aquatic Food Products-A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 798–813. doi:10.1111/1541-4337.12092

Karatzas, K.-A. G., Suur, L., & O’Byrne, C. P. (2012). *Characterization of the Intracellular Glutamate Decarboxylase System: Analysis of Its Function, Transcription, and Role in the Acid Resistance of Various Strains of Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10), 3571–3579. doi:10.1128/aem.00227-12

Keams, D.B. and R. Losick, Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev*, 2005. 19(24): p. 3083-94

Levandowsky, M. *Microbial Ecology of Foods*. Volume 1: Factors Affecting Life and Death of Microorganisms. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods *The Quarterly Review of Biology*, volume 56, number 2, pages 204 – 204},(1981)doi10.1086/412232}

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., & Faucher, S. P. (2014). *The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens*. *Frontiers in Microbiology*, 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00258

Liao, C.-H., & Fett, W. F. (2005). *Resuscitation of acid-injured Salmonella in enrichment broth, in apple juice and on the surfaces of fresh-cut cucumber and apple**. *Letters in Applied Microbiology*, 41(6), 487–492. doi:10.1111/j.1472-765x.2005.01794.x

Low, J. C., & Donachie, W. (1997). *A review of Listeria monocytogenes and listeriosis*. *The Veterinary Journal*, 153(1), 9–29. doi:10.1016/s1090-0233(97)80005-6

Lyautey, E., Lapen, D. R., Wilkes, G., McCleary, K., Pagotto, F., Tyler, K., ... Topp, E. (2007). *Distribution and Characteristics of Listeria monocytogenes Isolates from Surface Waters of the South Nation River Watershed, Ontario, Canada*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), 5401–5410. doi:10.1128/aem.00354-07

Massaro, E., K. Elstein, K. Bair, AND R. Zucker. LIMITATIONS OF THE FLUORESCENT PROBE VIABILITY ASSAY. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/J-89/551 (NTIS PB92113166), 1989.

MILLER, A. J. (1992). *Combined Water Activity and Solute Effects on Growth and Survival of Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, 55(6), 414–418. doi:10.4315/0362-028x-55.6.414

O’Byrne, C. P., & Booth, I. R. (2002). *Osmoregulation and its importance to food-borne microorganisms*. *International Journal of Food Microbiology*, 74(3), 203–216. doi:10.1016/s0168-1605(01)00681-x

Oliver, J. D. (2010). *Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria*. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 415–425. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x

- Palma, M., Guerreiro, J. F., & Sá-Correia, I. (2018). *Adaptive Response and Tolerance to Acetic Acid in Saccharomyces cerevisiae and Zygosaccharomyces bailii: A Physiological Genomics Perspective*. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.00274
- (52) Pinto, D., Almeida, V., Almeida, S. M., & Chambel, L. (2011). Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 1601–1611. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05016.x>
- PIRIE, J. H. (1940). *THE GENUS LISTERELLA PIRIE*. *Science*, 91(2364), 383–383. doi:10.1126/science.91.2364.383
- Roszak, D. B., Grimes, D. J., & Colwell, R. R. (1984). *Viable but nonrecoverable stage of Salmonella enteritidis in aquatic systems*. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(3), 334–338. doi:10.1139/m84-049
- Ryan, S., Begley, M., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2009). *Molecular characterization of the arginine deiminase system in Listeria monocytogenes: regulation and role in acid tolerance*. *Environmental Microbiology*, 11(2), 432–445. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01782.x
- Ryser, E. T., and E. H. Marth.** 1991. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Marcel Dekker, New York, N. Y.
- Sauders B.D. and Wiedmann M., (2007). Ecology of *Listeria* species and *L.monocytogenes* in the natural environment. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, listeriosis, and food safety*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press., 21-53.
- Seeliger, H. P. R. (1988). *Listeriosis — History and actual developments*. *Infection*, 16(S2), S80–S84. doi:10.1007/bf01639726
- Senoh, M., Ghosh-Banerjee, J., Ramamurthy, T., Hamabata, T., Kurakawa, T., Takeda, M., ... Takeda, Y. (2010). Conversion of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to the culturable state by co-culture with eukaryotic cells. *Microbiology and Immunology*, 54, 502–507. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00245.x>
- Silk BJ, Date KA, Jackson KA, et al. Invasive listeriosis in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004–2009: further targeted prevention needed for higher-risk groups. *Clin Infect Dis* 2012;54:S396–404.
- Skandamis, P. N., & Jeanson, S. (2015). *Colonial vs. planktonic type of growth: mathematical modeling of microbial dynamics on surfaces and in liquid, semi-liquid and solid foods*. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.01178
- Sleator, R. D., C. G. M. Gahan, T. Abee, and C. Hill. 1999. Identification and disruption of *betL*, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2078–2083

Smith, J. L., Liu, Y., & Paoli, G. C. (2013). *How does Listeria monocytogenes combat acid conditions? Canadian Journal of Microbiology*, 59(3), 141–152. doi:10.1139/cjm-2012-0392

Sorrells K.M., D.C. Enigl and J.R. Hatfield. (1989) Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 50:730.

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

Tilney, L. G. & Portnoy, D. A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 109, 1597–1608 (1989)

Todar, Online Textbook of Bacteriology, 2008; http://textbookofbacteriology.net/Listeria_2.html. Accessed May 2010

WESCHE, A. M., GURTLER, J. B., MARKS, B. P., & RYSER, E. T. (2009). *Stress, Sublethal Injury, Resuscitation, and Virulence of Bacterial Foodborne Pathogens*. *Journal of Food Protection*, 72(5), 1121–1138. doi:10.4315/0362-028x-72.5.1121

Wilson, P. D. G., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., et al. (2002). Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 275–289. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00660-2

WU, V. (2008). *A review of microbial injury and recovery methods in food*. *Food Microbiology*, 25(6), 735–744. doi:10.1016/j.fm.2008.04.011

Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., and Colwell, R. R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* 8, 313–323. doi: 10.1007/BF02010671

Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C.-W., & Ding, T. (2017). *Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens*. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00580