



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της επαγωγής της κατάστασης «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα»
και μοριακός χαρακτηρισμός αυτής σε μεμονωμένα κύτταρα
Listeria monocytogenes με τη χρήση απολυμαντικών

Δήμητρα Α. Σούρμπη

Επιβλέπων Καθηγητής:
Παναγιώτης Σκανδάμης, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2022**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της επαγωγής της κατάστασης «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα»
και μοριακός χαρακτηρισμός αυτής σε μεμονωμένα κύτταρα
Listeria monocytogenes με τη χρήση απολυμαντικών

Study of the induction of the “viable but non culturable” state in individual *Listeria monocytogenes* cells using disinfectants and its molecular characterization

Δήμητρα Α. Σούρμπη

Εξεταστική Επιτροπή:

Σκανδάμης Παναγιώτης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Δροσινός Ελευθέριος, Καθηγητής ΓΠΑ

Νυχάς Γεώργιος-Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ

Μελέτη της επαγωγής της κατάστασης ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα και μοριακός χαρακτηρισμός αυτής σε μεμονωμένα κύτταρα *Listeria monocytogenes* με τη χρήση απολυμαντικών

ΠΜΣ Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα βακτήρια, προκειμένου να επιβιώνουν σε αντίξοα περιβάλλοντα, ενεργοποιούν βιολογικούς μηχανισμούς απόκρισης στην καταπόνηση, που τα καθιστούν πιο ανθεκτικά σε αυτήν. Ένας τύπος απόκρισης αποτελεί η μετάπτωση ορισμένων μη σποριογόνων βακτηρίων σε μία κατάσταση μειωμένης μεταβολικής ενεργότητας, που ονομάζεται κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα». Ένα από αυτά τα βακτήρια είναι το τροφιμογενές παθογόνο *Listeria monocytogenes*, το οποίο εντοπίζεται ευρέως στο περιβάλλον της βιομηχανίας των τροφίμων και συνδέεται κυρίως με έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που συντηρούνται υπό ψύξη. Αν και τα κρούσματα λιστερίωσης δεν υπερβαίνουν τα 0,1-10 ανά 1.000.000 άτομα ανά έτος παγκοσμίως, το υψηλό ποσοστό θνητότητας της ασθένειας (20-30%) καθιστά τη *L. monocytogenes* επικίνδυνη για τη δημόσια υγεία. Στόχος της παρούσας έρευνας ήταν η διερεύνηση της απόκρισης του βακτηριακού πληθυσμού της *L. monocytogenes* στην καταπόνηση που προκαλείται από τα απολυμαντικά υποχλωριώδες νάτριο (SH) και υπεροξικό οξύ (PAA) και ιδιαίτερα της επαγωγής τους στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» ή viable but non culturable (VBNC).

Συγκεκριμένα, σε πρώτο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση του SH και του PAA στον καλλιεργήσιμο πληθυσμό μεγέθους 10^7 CFU/mL του στελέχους Scott A της *L. monocytogenes*, καθώς αυτός υποβλήθηκε σε συνδυασμό καταπόνησης λιμού και οξειδωτικής καταπόνησης. Οι παράγοντες οξειδωτικής καταπόνησης ήταν τα διαλύματα SH 0,5, 5, 10, ppm και PAA 0,5, 5, 10, 20, 30 και 40 ppm, ενώ ο λιμός προκλήθηκε εξαιτίας της απουσίας θρεπτικών στοιχείων από το μέσο διάλυσης των απολυμαντικών. Τα βακτήρια παρέμεινα σε κάθε ένα από τα διαλύματα καταπόνησης στους 20 και στους 4 °C για μισή ώρα. Ο προσδιορισμός της κινητικής θανάτωσης των βακτηρίων έγινε μέσω της καλλιέργειας των καταπονημένων σε γενικό θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye, οπότε προσδιορίστηκε το μέγεθος του ολικού πληθυσμού, από την καταμέτρηση των αποικιών. Παρομοίως, προσδιορίστηκε ο αριθμός των τραυματισμένων βακτηρίων. Για το σκοπό αυτό τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν και σε υπόστρωμα TSA-Ye που περιείχε 5% NaCl. Ο πληθυσμός των τραυματισμένων κυττάρων υπολογίστηκε μέσω και της αφαίρεσης του αριθμού των ανθεκτικών στην οξειδωτική καταπόνηση κυττάρων που σχημάτισαν αποικίες στο επιλεκτικό υπόστρωμα, από το σύνολο των βακτηρίων. Σε δεύτερο στάδιο, εξετάστηκε η επαγωγή 10^9 CFU/mL *L. monocytogenes* στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα», έπειτα από την επώασή των κυττάρων σε διαλύματα 20, 30 και 40 ppm PAA. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε TSA-Ye και, παράλληλα, παρατηρήθηκαν με μικροσκοπία φθορισμού, έπειτα από χρώση τους με τα φθοροφόρα cFDA και PI. Ακολούθησε η μελέτη της ανάκαμψής τους από την κατάσταση τραυματισμού και VBNC. Αφού λοιπόν τα βακτήρια απομακρύνθηκαν από το διάλυμα του PAA, συγκέντρωσης 20, 30 ή 40 ppm, επιστρώθηκαν σε TSA-Ye και επώαστηκαν στους 37 °C. Κατά τη διάρκεια της επώασής των κυττάρων, γινόταν

παρατήρηση της ανάπτυξής τους με τη χρήση βιντεομικροσκοπίας. Τέλος, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *clpP*, *sigB*, *prfA*, *lmo0887*, *inlA*, *lmo0888* και *relA* κατά τη διάρκεια της καταπόνησης και της επαγωγής των βακτηρίων στην κατάσταση VBNC, μέσω RT-qPCR την 0^η, 1^η, 2^η, και 3^η ώρα επαφής τους με 40 ppm PAA.

Η επώαση των κυττάρων υπό την παρουσία 5 ppm SH κατέληξε στην απουσία ανάπτυξης αποικιών στα τρυβλία που περιείχαν είτε το γενικό, είτε το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα έπειτα από το πρώτο λεπτό της καταπόνησης, ενώ όταν χρησιμοποιήθηκαν 10 ppm SH, δεν παρατηρήθηκαν αποικίες από την έναρξη της καταπόνησης και στις δύο θερμοκρασίες. Αναφορικά με το PAA, ο βακτηριακός πληθυσμός έπαυσε να είναι καλλιεργήσιμος από τα 600 s επώασης σε 10 ppm απολυμαντικού στους 20 °C και από τα 900 s στα 20 ppm στους 4 °C. Από τη σύγκριση των τρυβλίων και των εικόνων του μικροσκοπίου, διαπιστώθηκε η ύπαρξη VBNC κυττάρων την 3^η ώρα της επώασης σε 40 ppm PAA, στους 20 °C, ενώ δεν παρατηρήθηκε ανάκαμψή τους. Τα αποτελέσματα της RT-qPCR κατέδειξαν αρνητική ρύθμιση της έκφρασης του συνόλου των γονιδίων, εκτός του *clpP*, το οποίο φάνηκε να υπερεκφράζεται κατά τη 0^η και τη 2^η ώρα της βακτηριακής επώασης σε 40 ppm PAA, στους 20 °C. Τα ευρήματα της έρευνας θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την ορθότερη χρήση των απολυμαντικών στις βιομηχανίες τροφίμων, καθώς και να αποτελέσουν τη βάση για την περαιτέρω μελέτη και την αποτελεσματική ανίχνευση των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων κυττάρων στα τρόφιμα και στα περιβάλλοντα των τροφίμων.

Επιστημονική περιοχή: Ζώντα μη καλλιεργήσιμα βακτήρια

Λέξεις κλειδιά: Ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα, βακτηριακός τραυματισμός, *Listeria monocytogenes*, απολυμαντικά

Study of the induction of the viable but non culturable state in individual *Listeria monocytogenes* cells using disinfectants and its molecular characterization

MSc Food Science & Technology
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Quality Control & Hygiene

ABSTRACT

Bacteria, to survive in adverse environments, activate several kinds of stress response. One type of response is the transformation of certain non-sporogenic bacteria into a state of diminished vitality, called the "Live But Not Culturable" state. One of these bacteria is the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*, which is widely found in the food industry environments and is mainly associated with ready-to-eat refrigerated foods. Although listeriosis cases do not exceed 0.1-10 per 1,000,000 people per year worldwide, the high rate of disease mortality (20-30%) makes *L. monocytogenes* dangerous to public health. The aim of the present study was to investigate the response of the bacterial population of *L. monocytogenes* to the stress caused by disinfectant sodium hypochlorite (SH) and peracetic acid (PAA) and, their induction in the "Live But Not Culturable" or VBNC state.

Specifically, the effect of SH and PAA on 10^7 CFU/mL of culturable *L. monocytogenes* strain Scott A subpopulation was studied, as the cells were subjected to a combination of famine and oxidative stress. As oxidizing agents, the solutions SH 0.5, 5, 10, ppm and PAA 0.5, 5, 10, 20, 30 and 40 ppm were selected, while the famine was caused due to the absence of nutrients in the medium. The bacteria remained submerged in the solutions at 20 and 4 °C for half an hour. The determination of the bacterial killing kinetics was done through their culture in general growth medium TSA-Ye. The size of the total culturable population was determined by colony counts. Similarly, the number of injured bacteria was determined. For this purpose, the bacteria were also cultured on a TSA-Ye substrate containing 5% NaCl. The population of injured cells was calculated by subtracting the number of oxidative-resistant cells that formed colonies on the selective substrate from total bacteria. In a second step, the induction of 10^9 CFU/mL *L. monocytogenes* into the "viable but non culturable" state was examined, after incubating the cells in 20, 30 and 40 ppm PAA solutions. The cells were plated on TSA-Ye and, at the same time, observed by fluorescence microscopy, after staining with the fluorophores cFDA and PI. This was followed by the study of their resuscitation. After the bacteria were removed from the PAA solution at a concentration of 20, 30 or 40 ppm, they were plated on TSA-Ye and incubated at 37 °C. During the incubation of the cells, their growth was observed using video microscopy. Finally, the expression of the *clpP*, *sigB*, *prfA*, *lmo0887*, *inlA*, *lmo0888* and *relA* genes was studied during the stress implementation and induction of bacteria in the VBNC state, via RT-qPCR at the 0, 1st, 2nd, and 3rd hour of contact with the stress solution of 40 ppm PAA.

Incubation of cells in the presence of 5 ppm SH resulted in the absence of colony growth in plates containing either the general or selective growth medium after the first minute of strain, whereas when 10 ppm SH were used, no colonies were observed from the first moment of

incubation, at both temperatures. Regarding PAA, the bacterial population ceased to be culturable since the 600th s of incubation in the 10 ppm solution of the disinfectant at 20 °C and since the 900th s at 20 ppm at 4 °C. Comparison of the plates and microscope images revealed the presence of VBNC cells at the 3rd hour of incubation at 40 ppm PAA at 20 °C, while no recovery was observed. The RT-qPCR results showed downregulation of expression of all genes, except of *clpP*'s, which appeared to be upregulated. The research findings could be used for better use of disinfectants in the food industry, as well as to be the basis for further study and effective detection of live but non-culturable cells in foods and food environments.

Scientific area: Viable non culturable bacteria

Keywords: Viable but non culturable, bacterial, bacterial cell damage, *Listeria monocytogenes*, disinfectants

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο «Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής» κατά τη χρονική περίοδο από τον Σεπτέμβριο του 2020 έως τον Ιανουάριο του 2022, στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών μου σπουδών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Παναγιώτη Ν. Σκανδάμη.

Θα ήθελα αρχικά να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Σκανδάμη για τη ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία υπό την επίβλεψή του, για την καθοδήγησή του και για την ώθηση που παρείχε και συνεχίζει να παρέχει τόσο σε εμένα, όσο και στην υπόλοιπη ομάδα του εργαστηρίου για συνεχή μάθηση και βελτίωση. Επίσης επιθυμώ να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Μαριάννα Αρβανίτη, για το χρόνο που αφιέρωσε και την προσπάθεια που κατέβαλε για να με εκπαιδεύσει από την πρώτη έως και την τελευταία στιγμή της συνεργασίας μας, παρά τις αντίξοες συνθήκες της πανδημίας. Επιθυμώ ακόμη να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθεια και την καθοδήγησή τους, καθώς και για το άριστο κλίμα συνεργασίας.

Ευχαριστώ επίσης θερμά, όλους τους καθηγητές που δίδαξαν εμένα και τους συμφοιτητές μου στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος: τον κύριο Δροσινό, τον κύριο Νυχά, τον κύριο Πανάγου, τον κύριο Παπαδόπουλο και φυσικά τον κύριο Σκανδάμη και όλους τους Δασκάλους που, παρά τις μεγάλες δυσκολίες που αντιμετωπίσαμε για πρώτη φορά στο έτος μου, προσπάθησαν και επέτυχαν στο να μας μεταλαμπαδεύσουν γνώσεις που ήδη αποδεικνύονται κρίσιμης σημασίας για την επαγγελματική μας πορεία.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Αντώνη και Κυριακή καθώς και το φίλο μου Γιάννη για τη συνεχή τους στήριξη, την υπομονή και την αγάπη τους.

Αθήνα, Ιανουάριος 2022.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.1. Επιδημιολογία.....	1
1.2. Μηχανισμός παθογένειας.....	2
1.3. Παρουσία στη βιομηχανία τροφίμων και νομοθετική ισχύς.....	4
2. Η βακτηριακή καταπόνηση	7
2.1. Είδη καταπόνησης.....	7
2.2. Απόκριση στην καταπόνηση.....	7
3. Η κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα»	10
3.1. Η επαγωγή στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα».....	11
3.2. Διάκριση της κατάστασης «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» από άλλες καταστάσεις ληθάργου.....	12
3.3. Μορφολογία και φυσιολογία στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» 14	
3.4. Γονιδιακή έκφραση στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα»	16
3.5. Ανάκαμψη των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων	19
3.6. Μέθοδοι ανίχνευσης και μελέτης των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων	21
4. Απολυμαντικά στη βιομηχανία τροφίμων	30
4.1. Χλωριούχα απολυμαντικά.....	30
4.2. Υπεροξικό οξύ.....	33
Υπόθεση εργασίας.....	36
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
1. Υλικά και εξοπλισμός.....	37
1.1. Στελέχη μικροοργανισμών και φύλαξή τους.....	38
1.2. Θρεπτικά υποστρώματα.....	38
1.3. Διαλύματα απολυμαντικών.....	39
1.4. Διαλύματα φθοροφόρων.....	40
1.5. Εξοπλισμός.....	40
2. Πειραματικές μέθοδοι.....	41

2.1. Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού και της θανάτωσης των βακτηριακών κυττάρων από τη χρήση των απολυμαντικών	41
2.2. Μελέτη της κατάστασης ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα μέσω μικροσκοπίας φθορισμού.....	43
2.3. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που συνδέονται με την κατάσταση VBNC μέσω αντίστροφης μεταγραφής PCR σε πραγματικό χρόνο (Real Time RT- PCR)	46
Πίνακας 2.3.4.1.: Προετοιμασία του Master Mix για τη Real Time PCR	48
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
1.....	50
2. Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού και της κυτταρικής θανάτωσης	50
3. Μελέτη της κατάστασης ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα μέσω μικροσκοπίας φθορισμού	56
4. Κυτταρική ανάκαμψη.....	58
5. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που συνδέονται με την κατάσταση VBNC	63
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	65
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	70

Πίνακας Συντομογραφιών

ATP: Adenosine triphosphate

aw: water activity

cDNA: complementary DNA

cF: carboxyfluorescein

cFDA: carboxyfluorescein diacetate

CTC: 5-Cyano-2,3-ditoly-tetrazolium chloride

DAPI: 4',6- diamidino-2-phenylindole

DBPs: Disinfection By-Products

ddPCR: digital droplet Polymerase Chain Reaction

DPA: Docosapentaenoic Acid

dPCR: digital Polymerase Chain Reaction

DVC: Direct Viable Counts

EB: Ethidium Bromide

EMA: Ethidium Monoazide

FCM: Flow Cytometry

FDA: Food and Drug Administration

FISH: Fluorescent *In Situ* Hybridization

GABBA: g-aminobutyric acid

HC: Hemorrhagic Colitis

HEDP: 1-Hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid

HUS: Hemolytic uremic syndrome

InIA: Internalin A

InIB: Internalin B

LAMP: Loop-mediated isothermal Amplification

LLO: Listeriolysin O

Mip: Macrophage infectivity potentiator

MS: Mass Spectrometry

PAA: Peracetic Acid

PBP: Penicillin Binding Proteins

PCR: Polymerase Chain Reaction

PI: Propidium Iodide

PMA: Propidium Monoazide

qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction

RING-FISH: Recognition of Individual Genes- Fluorescent *In Situ* Hybridization

ROS: Reactive Oxygen Species

Rpf: Resuscitation promoting factor

RT-PCR: Real time- Polymerase Chain Reaction

RT-qPCR: Real time- quantitative Polymerase Chain Reaction

SH: Sodium Hypochlorite

SS: Stock Solution

T_m: Melting temperature

VBNC: Viable but non-culturable

WHO: World Health Organization

WS: Working Solution

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. *Listeria monocytogenes*

Η *L. monocytogenes* είναι ένας θετικός κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιος βάκιλος, μήκους 1-2 µm, που διαθέτει ικανότητα κίνησης, αλλά όχι ικανότητα σποριογονίας (Bhunia, 2008; Κοτζεκίδου-Ρουκά, 2009; Food and Drug Administration, 2012). Όπως προδίδει η ονομασία του, ανήκει στο γένος *Listeria*, στο οποίο περιλαμβάνονται συνολικά έξι είδη, τα *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* και *L. grayi*, εκ των οποίων μόνο τα *L. monocytogenes* και *L. ivanovii* είναι παθογόνα (Bhunia, 2008; Food and Drug Administration, 2012). Συγκεκριμένα, η *L. monocytogenes* θεωρείται επικίνδυνη για τον άνθρωπο, ενώ η *L. ivanovii* προσβάλλει κατά κανόνα τα μηρυκαστικά (Bhunia, 2008; Food and Drug Administration, 2012).

1.1. Επιδημιολογία

Η *L. monocytogenes* διαθέτει την ικανότητά να προξενεί ασθένεια σε υγιά και, σε μεγαλύτερο βαθμό, σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Bhunia, 2008). Η ασθένεια αυτή ονομάζεται λιστερίωση και σε πολλές περιπτώσεις οδηγεί στο θάνατο (Bhunia, 2008; Ryan, Hill and Gahan, 2008). Υπολογίζεται ότι 98% των περιστατικών λιστερίωσης οφείλονται στη δράση των ορότυπων 1/2a, 1/2b και 4b (Bhunia, 2008; EFSA BIOHAZ Panel *et al.*, 2018). Στον τελευταίο, μάλιστα, έχει αποδοθεί η πλειοψηφία των καταγεγραμμένων λοιμώξεων (Bhunia, 2008). Η δηλούμενη επίπτωση της ασθένειας είναι σχετικά χαμηλή, προσβάλλοντας 0,1-10 ανά 1.000.000 άτομα το χρόνο παγκοσμίως, ανάλογα με την περιοχή (World Health Organization, 2018). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με την πιο πρόσφατη αναφορά του Ευρωπαϊκού Κέντρου Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων, το 2017 καταγράφηκαν στην Ευρώπη 4,7 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού, ενώ ο Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας αναφέρει κατά μέσο όρο 1 κρούσμα ανά 1.000.000 κατοίκους κατά το έτος 2019 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2020; Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας, 2020). Πρέπει βέβαια να ληφθεί υπόψιν το ενδεχόμενο υποτίμησης του πραγματικού αριθμού των κρουσμάτων, εξαιτίας της υποδήλωσής τους στα συστήματα επιτήρησης (EFSA BIOHAZ Panel *et al.*, 2018). Παρά τον χαμηλό επιπολασμό της λιστερίωσης, το ποσοστό θνητότητας είναι αρκετά υψηλό, καθώς ανέρχεται στο 20-30%, όντας σημαντικά μεγαλύτερο συγκριτικά με άλλα τροφιμογενή νοσήματα (Bhunia, 2008; Κοτζεκίδου-Ρουκά, 2009; Gao and Liu, 2014; World Health Organization, 2018).

Η *L. monocytogenes* συνιστά κίνδυνο κυρίως για τις ευαίσθητες πληθυσμιακές ομάδες, δηλαδή για τις εγκυμονούσες, τα νεογνά, τους ηλικιωμένους και τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα, όπως οι καρκινοπαθείς ή όσοι λαμβάνουν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, όπως οι φορείς του ιού HIV (Κοτζεκίδου-Ρουκά, 2009; EFSA BIOHAZ Panel *et al.*, 2018; World Health Organization, 2018). Ο χρόνος επώασης του βακτηρίου επίσης ποικίλει ανάλογα με την ευαισθησία του ξενιστή και τον αριθμό των προσλαμβανόμενων κυττάρων (Bhunια, 2008; Food and Drug Administration, 2012). Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι εκδήλωσης της ασθένειας: ένας μη διεισδυτικός και ένας διεισδυτικός τύπος (Bhunια, 2008). Ο μη διεισδυτικός τύπος λιστερίωσης, που είναι και ο ηπιότερος, επηρεάζει, στο μεγαλύτερο βαθμό, υγιή άτομα στα οποία προξενεί συμπτώματα παρόμοια με αυτά της γαστρεντερίτιδας, δηλαδή διάρροια, ναυτία, εμετό, μυαλγίες, πονοκέφαλο και πυρετό (Bhunια, 2008; Food and Drug Administration, 2012; EFSA BIOHAZ Panel *et al.*, 2018). Αντίθετα, ο διεισδυτικός τύπος αποτελεί την σοβαρότερη και εν δυνάμει θανατηφόρα μορφή λιστερίωσης, που επηρεάζει τους ευαίσθητους πληθυσμούς και σχετίζεται με την πρόκληση μυαλγίας, πυρετού, σηψαιμίας και μηνιγγίτιδας (Bhunια, 2008; Food and Drug Administration, 2012). Επιπλέον, ευθύνεται για αποβολές στις εγκυμονούσες και πρόκληση εγκεφαλίτιδας, μηνιγγίτιδας και θανάτου στα νεογνά που αυτές γεννούν (Bhunια, 2008; Food and Drug Administration, 2012).

1.2. Μηχανισμός παθογένειας

Ο μολυσματικός μηχανισμός της *L. monocytogenes* είναι κοινός στους ανθρώπους και στα ζώα. Η είσοδος του παθογόνου συμβαίνει, στο 99% των περιπτώσεων, μέσω της στοματικής οδού, λόγω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων (Food and Drug Administration, 2012). Το παθογόνο οδηγείται από το στομάχι στο λεπτό έντερο, όπου παραμένει για σύντομο χρονικό διάστημα, έως ότου διαπεράσει το τοίχωμα του εντερικού σωλήνα και εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος ή της λέμφου (Bhunια, 2008; EFSA BIOHAZ Panel *et al.*, 2018). Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του κυκλοφορικού ή του λεμφατικού συστήματος κατευθύνεται προς τα ζωτικά όργανα, δηλαδή στο ήπαρ, στο σπλήνα και στη χοληδόχο κύστη, ενώ δύναται να αποικίσει και στους λεμφαδένες (Bhunια, 2008; EFSA BIOHAZ Panel *et al.*, 2018). Από εκεί, το παθογόνο είναι ικανό να εισέλθει εκ νέου στην κυκλοφορία του αίματος και, συνεχίζοντας την πορεία μετάδοσης να φτάσει στον εγκέφαλο, προξενώντας μηνιγγίτιδα ή εγκεφαλίτιδα, ή, στην περίπτωση των εγκύων, να διαπεράσει το τοίχωμα του πλακούντα, προκαλώντας τερματισμό της κύησης (Bhunια, 2008; Food and Drug Administration, 2012; EFSA BIOHAZ Panel, 2018).

Προκειμένου η *Listeria* να ασκήσει τη λοιμογόνο δράση της, απαιτείται αρχικά να επιβιώσει από τους ανοσοποιητικούς μηχανισμούς του ξενιστή (Ryan, Hill and Gahan, 2008; Gahan and Hill, 2014). Αυτό το επιτυγχάνει με την ενεργοποίηση μιας σειράς συστημάτων απόκρισης, τα οποία ρυθμίζονται σε μοριακό επίπεδο από τον παράγοντα σ^B (Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2004; Ryan, Hill and Gahan, 2008; Gahan and Hill, 2014; Arcari *et al.*, 2020). Ένα από τα κυριότερα συστήματα απόκρισης είναι αυτό της γλουταμινικής αποκαρβοξυλάσης ή, αλλιώς, σύστημα GAD, το οποίο συνιστά ένα μηχανισμό άμυνας στην όξινη καταπόνηση (Ryan, Hill and Gahan,

2008; Karatzas, Suur and O'Byrne, 2012; Arcari *et al.*, 2020). Σημαντικό ρόλο έχουν επίσης το σύστημα αποκλεισμού της χολής και το ένζυμο υδρολάση των χολικών αλάτων, τα οποία κωδικοποιούνται από τα γονίδια *bilE* και *bsh* αντίστοιχα και σχετίζονται με την άμυνα έναντι των χολικών αλάτων όπως και η πρωτεΐνη OpuC, που παρέχει προστασία απέναντι στην ωσμωτική καταπόνηση (Cotter, Gahan and Hill, 2001; Karatzas, Suur and O'Byrne, 2012; Arcari *et al.*, 2020; Boura, Brenson and Karatzas, 2020).

Το πέρασμα της *L. monocytogenes* από τον εντερικό βλεννογόνο στην κυκλοφορία του αίματος σηματοδοτεί τον τερματισμό της εντερικής φάσης της λοίμωξης. Τα παθογόνα διεισδύουν στα κύτταρα του εντέρου και, ακολούθως, εισέρχονται του στην κυκλοφορία του αίματος, με σκοπό την έναρξη της συστημικής φάσης. Σε αυτήν, ο μικροοργανισμός μεταδίδεται στον οργανισμό του ξενιστή από κύτταρο σε κύτταρο και προσβάλλει τα ζωτικά όργανα, τον εγκέφαλο και, πιθανόν, τον πλακούντα. Προαπαιτούμενο για τη μετάδοση του βακτηρίου είναι η προσκόλληση και η είσοδος του βακτηρίου στο κύτταρο-ξενιστή. Στην περίπτωση των φαγοκυττάρων, αυτό συμβαίνει μέσω της εγκόλπωσης του στην πλασματική μεμβράνη και του εγκλεισμού του στο εσωτερικό ενός κυστιδίου (vacuole) (Bhunja, 2008; Bonazzi, Lecuit and Cossart, 2009). Στα μη φαγοκυτταρικά κύτταρα, όπως στα επιθηλιακά, η διείσδυση πραγματοποιείται με τη συμβολή μεμβρανικών πρωτεϊνών, των ιντερναλινών A και B, οι οποίες αλληλοεπιδρούν με τους υποδοχείς των κυττάρων στόχων, μέσω του χαρακτηριστικού αμινοτελικού άκρου τους, που είναι πλούσιο σε υπολείμματα λευκίνης (Sousa *et al.*, 2004; Bierne *et al.*, 2007; Bonazzi, Lecuit and Cossart, 2009; Lecuit, 2020). Η ιντερναλίνη A (InlA) συνδέεται με την E-καδερίνη, μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη 882 αμινοξέων που υπό φυσιολογικές συνθήκες συμμετέχει στο σχηματισμό συνδέσεων μεταξύ γειτονικών κυττάρων, μέσω μιας αλληλεπίδρασης που εξαρτάται από την παρουσία κατιόντων ασβεστίου (Sousa *et al.*, 2004; Bierne *et al.*, 2007; Bhunja, 2008; Bonazzi, Lecuit and Cossart, 2009; Priest, Shafraz and Sivasankar, 2017; Lecuit, 2020). Η E-καδερίνη συνδέεται ενδοκυτταρικά με μια άλλη πρωτεΐνη, τη β-κατενίνη, η οποία με τη σειρά της σχηματίζει δεσμό με την α-κατενίνη, που συνδέεται στον κυτταρικό σκελετό μέσω της ακτίνης (Bierne *et al.*, 2007). Επομένως, η ιντερναλίνη A και η ακτίνη συνενώνονται με μια πρωτεϊνική αλυσίδα (Bierne *et al.*, 2007). Η δομή αυτή είναι απαραίτητη για την εγκόλπωση του παθογόνου στο ευκαρυωτικό κύτταρο (Bierne *et al.*, 2007). Από την άλλη πλευρά, η ιντερναλίνη B (InlB) επάγει την ενδοκύττωση, μέσω της αλληλεπίδρασής της με μια κινάση της τυροσίνης, τον κυτταρικό δέκτη Met, που καταλήγει και πάλι στον ανασχηματισμό του κυτταρικού σκελετού (Sousa *et al.*, 2004; Bierne *et al.*, 2007; Bhunja, 2008; Bonazzi, Lecuit and Cossart, 2009). Η είσοδος του βακτηρίου στο κύτταρο-ξενιστή πραγματοποιείται με την περίκλεισή του σε ένα κυτταρικό κυστίδιο που ονομάζεται ενδόσωμα, το οποίο και διασπά, εκκρίνοντας τη λυτική πρωτεΐνη λιστεριολυσίνη (LLO) (Bhunja, 2008; Bonazzi, Lecuit and Cossart, 2009; Lecuit, 2020). Ως αποτέλεσμα, το παθογόνο εκλύεται στο κυτταρόπλασμα, όντας ελεύθερο πλέον να ασκήσει τη μολυσματική του δράση (Bhunja, 2008; Bonazzi, Lecuit and Cossart, 2009). Η μετακίνηση του βακτηρίου επιτελείται μέσω της σύνθεσης πολυμερών που καλούνται κομήτες ακτίνης και λειτουργούν ως ένα είδος προωθητικού μηχανισμού τόσο ενδοκυτταρικά, όσο και στον εξωκυτταριο χώρο (Bhunja, 2008; Bonazzi, Lecuit and Cossart, 2009; Lecuit,

2020). Με αυτόν τον τρόπο, η *Listeria* προσεγγίζει τα γειτονικά κύτταρα και ο κύκλος επαναλαμβάνεται, έως ότου να εξαπλωθεί σε όλα τα σημεία δράσης της (Bonazzi, Lecuit and Cossart, 2009).

Η μολυσματικότητα της *L. monocytogenes* οφείλεται στην έκφραση μιας ομάδας γονιδίων που, στην πλειονότητά τους, εντοπίζονται σε μια περιοχή του DNA που ονομάζεται νησίδα παθογένειας (LIPI-1) (Scortti *et al.*, 2007; Bhunia, 2008). Η περιοχή αυτή έχει μήκος 9.000 ζεύγη βάσεων και περιλαμβάνει τα γονίδια *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* και *plcB* (Bhunia, 2008; Dussurget, 2008; Dorey *et al.*, 2019). Η έκφρασή των ελέγχεται από τον ρυθμιστικό παράγοντα A ή PrfA, που κωδικοποιείται από το πρώτο γονίδιο της νησίδας παθογένειας (Bhunia, 2008; Dussurget, 2008). Ο PrfA επάγει τη μεταγραφή με το να προσδένεται σε μία παλίνδρομη αλληλουχία-υποκινητή μήκους 14 ζευγών βάσεων, της μορφής TTAACANNTGTTAA, η οποία βρίσκεται ανάντη των μεταγραφόμενων γονιδίων και, πιο συγκεκριμένα στην -41.5 θέση (Scortti *et al.*, 2007; Dussurget, 2008). Ο PrfA ρυθμίζει την έκφραση και άλλων γονιδίων μολυσματικότητας, όπως των *inlA* και *inlB* – τα οποία είναι οργανωμένα στο οπερόνιο *inlAB* (Dorey *et al.*, 2019). Συνολικά, ο PrfA ελέγχει τη μεταγραφή 73 γονιδίων (Dussurget, 2008). Στη ρύθμιση της μολυσματικότητας συμμετέχει και ο παράγοντας σ^B, ο οποίος ελέγχει την έκφραση γονιδίων όπως των *inlA* και *inlB*, μαζί με τον PrfA (Dussurget, 2008; Dorey *et al.*, 2019). Επιπλέον, επιδρά στο *prfA*, καθώς προσδένεται σε έναν από τους τρεις υποκινητές του γονιδίου, προωθώντας τη μεταγραφή του (Scortti *et al.*, 2007; Dorey *et al.*, 2019). Ασκεί λοιπόν τόσο θετικό, όσο και αρνητικό μεταγραφικό έλεγχο π.χ. αναστέλλοντάς την έκφραση του γονιδίου όταν η συγκέντρωση του PrfA στο κυτταρόπλασμα βρίσκεται σε υψηλό επίπεδο (Scortti *et al.*, 2007; Dussurget, 2008; Dorey *et al.*, 2019; Lecuit, 2020).

1.3. Παρουσία στη βιομηχανία τροφίμων και νομοθετική ισχύς

Το βακτήριο *L. monocytogenes* συναντάται σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα: στο χόμα, στο νερό, στα λύματα, στη βλάστηση που βρίσκεται σε διαδικασία αποσύνθεσης και στον εντερικό σωλήνα πολλών ζώων εκτροφής, είτε με τη μορφή μεμονωμένων κυττάρων, είτε σχηματίζοντας ζεύγη (Bhunia, 2008; Κοτζεκίδου-Ρουκά, 2009; Gao and Liu, 2014). Επιβιώνει και να αναπτύσσεται σε εύρος pH, από 4,1 έως 9,6, και σε περιβάλλοντα με αλατότητα έως και 10%. Επιπλέον είναι ανθεκτικό στο ψύχος, αλλά όχι στις υψηλές θερμοκρασίες, εμφανίζοντας εύρος ανάπτυξης από 1° έως 45 °C (Bhunia, 2008; Κοτζεκίδου-Ρουκά, 2009).

Ως περιβαλλοντικό παθογόνο, η *Listeria* απαντάται συχνά σε περιβάλλοντα μεταποίησης και επεξεργασίας τροφίμων, στα οποία αποτελεί παράγοντα διασταυρούμενης επιμόλυνσης (Κοτζεκίδου-Ρουκά, 2009; Overney *et al.*, 2017; Stoller *et al.*, 2019). Η εισαγωγή της πραγματοποιείται μέσω των εισερχόμενων πρώτων υλών, του νερού και των ζώων, ενώ η ανάπτυξή της υποβοηθάται από το υγρό και ψυχρό περιβάλλον που επικρατεί σε αυτά (Κοτζεκίδου-Ρουκά, 2009; Food and Drug Administration, 2012; Gao and Liu, 2014; EFSA

BIOHAZ Panel *et al.*, 2018; Stoller *et al.*, 2019). Μάλιστα, δεν είναι σπάνια η απομόνωση των βακτηρίων ακόμα και αρκετά χρόνια μετά την αρχική εισαγωγή τους στα περιβάλλοντα επεξεργασίας, καθώς επιβιώνουν καταφεύγοντας σε κοιλότητες και άλλα δυσπρόσιτα σημεία του περιβάλλοντος επεξεργασίας. (Overney *et al.*, 2017; EFSA BIOHAZ Panel *et al.*, 2018; Stoller *et al.*, 2019; Brauge *et al.*, 2020; Duze, Marimani and Patel, 2021)

Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την ικανότητά του να επιβιώνει υπό συνθήκες ψύξης αλλά όχι έναντι της θερμικής επεξεργασίας που επιδέχονται πολλά τρόφιμα αιτιολογεί την παρουσία του σε προϊόντα που συντηρούνται μακροχρόνια υπό ψύξη, σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα και σε προϊόντα ήπιας επεξεργασίας (Bhunia, 2008). Ειδικότερα, η *L. monocytogenes* έχει συσχετιστεί με ζυμούμενα προϊόντα κρέατος, πατέ, καπνιστά ψάρια, μαλακά τυριά και τυριά που έχουν παρασκευαστεί από μη παστεριωμένο γάλα (Bhunia, 2008; Food and Drug Administration, 2012). Το μη παστεριωμένο ή ανεπαρκώς παστεριωμένο γάλα, το παγωτό, τα ωμά λαχανικά καθώς και διάφορα άλλα είδη κρέατος συγκαταλέγονται, επίσης, στα επιρρεπή τρόφιμα (Bhunia, 2008; Food and Drug Administration, 2012).

Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψιν τον κίνδυνο που συνιστά το βακτήριο *L. monocytogenes* για τη δημόσια υγεία, τις συνθήκες κάτω από τις οποίες επιβιώνει και αναπτύσσεται, καθώς και τα τρόφιμα από τα οποία απομονώνεται συχνότερα, ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός ΕΚ 2073/2005 ορίζει τα μικροβιολογικά κριτήρια ως προς τα οποία καλούνται να συμμορφώνονται οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων, όπως αυτά αναγράφονται στον Πίνακα 3.4.1.

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί/οι τοξίνες και οι μεταβολίτες τους	Πλάνο δειγματοληψίας (1)		Όρια (2)		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς (3)	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
		n	c	m	M		
1.1. Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς (4)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Απουσία σε 25 g		EN/ISO 11290-1	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.2. Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση κανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g (5)		EN/ISO 11290-2 (6)	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
		5	0	Απουσία σε 25 g (7)		EN/ISO 11290-1	Πριν το τρώσιμο αποδεδειχτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επεξεργασίας τροφίμων που το παρήγαγε
1.3. Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση μη κανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς (4) (8)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g		EN/ISO 11290-2 (6)	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους

Πίνακας 3.4.1. Μικροβιολογικά κριτήρια για το τροφιογενές παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes*

2. Η βακτηριακή καταπόνηση

Το περιβάλλον στο οποίο τα βακτήρια ζουν και αναπτύσσονται είναι δυναμικό (Ron, 2006). Αυτό σημαίνει, ότι παράμετροι, όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση σε θρεπτικά συστατικά και η παρουσία διάφορων χημικών ουσιών, μεταβάλλονται τοπικά ή και χρονικά, με αποτέλεσμα να διαμορφώνουν ένα περιβάλλον που είναι ευνοϊκό ή δυσμενές για την ανάπτυξη και την επιβίωση των μικροοργανισμών (Ron, 2006; Bucur *et al.*, 2018). Στην περίπτωση που οι συνθήκες καταστούν δυσμενείς, τα βακτήρια υφίστανται καταπόνηση (stress) (Ron, 2006; Nicolò and Guglielmino, 2012; Bucur *et al.*, 2018). Σύμφωνα με τους Yousef and Courtney (2003) ως καταπόνηση ορίζεται «κάθε επιβλαβής παράγοντας ή κατάσταση που επιδρά δυσμενώς στη βακτηριακή ανάπτυξη και επιβίωση».

2.1. Είδη καταπόνησης

Η φύση του επιβλαβή παράγοντα καθορίζει το είδος της καταπόνησης (Yousef and Courtney, 2003). Έτσι, οι φυσικές κατεργασίες όπως η θέρμανση, η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, η διατάραξη του ωσμωτικού δυναμικού και η ακτινοβολία προξενούν τη φυσική καταπόνηση των βακτηρίων (Yousef and Courtney, 2003). Αντίστοιχα, η οι όξινες και οξειδωτικές ενώσεις ή τα άλατα προκαλούν χημική καταπόνηση, ενώ ο ανταγωνισμός με άλλους μικροοργανισμούς και η επίδραση με μικροβιακούς μεταβολίτες λογίζεται βιολογική καταπόνηση (Yousef and Courtney, 2003). Επίσης, ανάλογα με την ένταση της, η καταπόνηση διακρίνεται σε ήπια, μέτρια ή ακραία. Κάθε μία από αυτές τις κατηγορίες έχει και τις ανάλογες επιπτώσεις (Yousef and Courtney, 2003). Η ήπια καταπόνηση δεν επιδρά στη βιωσιμότητα του βακτηριακού πληθυσμού, παρά μόνο προξενεί τη μείωση ή και το μηδενισμό του ρυθμού ανάπτυξής του (Yousef and Courtney, 2003). Αντίθετα, η μέτρια καταπόνηση επηρεάζει αρνητικά τη ζωτικότητα των κυττάρων, ενώ μία ακραία έχει ως αποτέλεσμα τη θανάτωση της πλειονότητας αυτών (Yousef and Courtney, 2003). Επιπροσθέτως, σημασία έχει και ο τρόπος εφαρμογής της καταπόνησης, αν δηλαδή αυτή εφαρμόζεται βαθμιαία στα κύτταρα ή απότομα, οπότε πρόκειται για σοκ (Yousef and Courtney, 2003).

2.2. Απόκριση στην καταπόνηση

Κατή την εξέταση ενός ισογενή βακτηριακού πληθυσμού, δηλαδή ενός πληθυσμού βακτηρίων που έχουν τον ίδια γονίδια, που δέχεται την επίδραση ενός ή περισσότερων παραγόντων καταπόνησης, παρατηρείται ότι κάθε βακτήριο ανταποκρίνεται διαφορετικά, ανάλογα με τη φύση του καθώς και ανάλογα με το είδος, την ένταση και τον τρόπο εφαρμογής της καταπόνησης (Trevors, 2011; Institute of Science and Technology Austria, 2017). Ορισμένα βακτήρια θανατώνονται, ενώ άλλα επιβιώνουν σε κατάσταση τραυματισμού ή στρες (Yousef

and Courtney, 2003; Trevors, 2011). Τα τραυματισμένα κύτταρα, δηλαδή όσα έχουν υποστεί δομική ή λειτουργική βλάβη, χαρακτηρίζονται από μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, και παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε ηπίως βλαβερούς παράγοντες, σε σύγκριση με τα υγιή κύτταρα (Yousef and Courtney, 2003). Όσο περισσότερα μεμονωμένα κύτταρα επιδεικνύουν ένα συγκεκριμένο τύπο αντίδρασης, τόσο πιο εμφανώς αυτή εκφράζεται σε επίπεδο πληθυσμού, διότι η συμπεριφορά του βακτηριακού πληθυσμού αποτελεί τη συνισταμένη των αποκρίσεων των βακτηρίων, που τον συνιστούν (Skandamis and Jeanson, 2015).

Προκειμένου λοιπόν τα βακτήρια να αποφύγουν την θανάτωση, ενεργοποιούν μια σειρά από μηχανισμούς προστασίας οι οποίοι συνιστούν την «απόκριση στην καταπόνηση» (Yousef and Courtney, 2003). Η απόκριση στην καταπόνηση έχει μοριακή βάση, καθώς βασικό ρόλο σε αυτήν έχει η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης προς σύνθεση των κατάλληλων πρωτεϊνών ρύθμισης και απόκρισης (Boor, 2006; Nicolò and Guglielmino, 2012). Η μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης των βακτηρίων λαμβάνει χώρα, σε μεγάλο βαθμό, στο επίπεδο της μεταγραφής, όπου επιτελείται επιλεκτική σύνδεση της βασικής υπομονάδας της RNA πολυμεράσης με τους παράγοντες σίγμα (Boor, 2006; Ron, 2006). Οι παράγοντες σίγμα αποτελούν μία κατηγορία υπομονάδων του ολοενζύμου της RNA πολυμεράσης, που έχουν την ικανότητα, συνδεδεμένοι αντιστρεπτά με την κύρια υπομονάδα, να ρυθμίζουν την πρόσδεσή της σε διαφορετικούς γονιδιακούς υποκινητές, κατευθύνοντας έτσι τη μεταγραφή, ανάλογα με την κατάσταση (Yousef and Courtney, 2003; Boor, 2006). Επιπλέον, έχουν ρόλο στην αποδιάταξη του DNA. Οι παράγοντες σίγμα διακρίνονται σε δύο οικογένειες: στην σ^{54} και στην σ^{70} . Οι παράγοντες σίγμα που συμμετέχουν στη γονιδιακή ρύθμιση σε συνθήκες καταπόνησης ανήκουν στην οικογένεια σ^{70} και ονομάζονται «εναλλακτικοί παράγοντες σίγμα». Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται οι παράγοντες σ^S και σ^B , οι οποίοι συμμετέχουν στη γενική απόκριση στην καταπόνηση των αρνητικών και των θετικών κατά Gram βακτηρίων όπως και μια ομάδα παραγόντων σίγμα εξωκυτταροπλασματικής λειτουργίας, οι οποίοι ευθύνονται για τη ρύθμιση της κυτταρικής απόκρισης με βάση τις συνθήκες που επικρατούν στην μεμβράνη, στο περίπλασμα και στον εξωκυττάριο χώρο (Boor, 2006).

Οι μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση έχουν αντίκτυπο στον φαινότυπο των βακτηρίων, καθώς προκαλούν αλλαγές στη μορφολογία ή στον μεταβολισμό τους (Nicolò and Guglielmino, 2012). Για παράδειγμα, πολλά βακτήρια μεταβάλλουν τη σύσταση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης τους ως απόκριση στις χαμηλές θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, αυξάνουν την περιεκτικότητα της κυτταρικής τους μεμβράνης σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, γεγονός που συμβάλλει στη διατήρηση της ρευστότητάς της στις συνθήκες ψύχους, επάγοντας έτσι την προσαρμογή του βακτηριακού πληθυσμού στη δυσμενή κατάσταση (Bucur *et al.*, 2018; Ultee *et al.*, 2019).

Η απόκριση στην καταπόνηση δύναται να καταστήσει τα βακτήρια ανθεκτικά όχι μόνο στον ίδιο, αλλά και διαφορετικούς τύπους καταπόνησης, μιας και οι μηχανισμοί των διαφορετικών αποκρίσεων συνδέονται στο μοριακό επίπεδο (Yousef and Courtney, 2003). Παραδείγματος χάριν, η επώαση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε χαμηλές θερμοκρασίες ενισχύει την ανθεκτικότητά του στην ωσμωτική καταπόνηση, στην οποία υπόκειται σε

περιβάλλοντα με υψηλή συγκέντρωση άλατος (Bucur *et al.*, 2018). Η προσαρμογή των βακτηρίων σε δυσμενείς για την ανάπτυξή τους συνθήκες επιδιώκεται ή αποφεύγεται, ανάλογα με τον εκάστοτε στόχο. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι η προσαρμογή των παθογόνων βακτηρίων σε συνθήκες καταπόνησης πιθανώς ενισχύει την παθογένειά τους. Αντίθετα, καθώς η προσαρμογή των προβιοτικών βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* στην όξινη καταπόνηση διευκολύνει την επιβίωσή τους στα όξινα προϊόντα γαλακτικής ζύμωσης, αυξάνοντας τη θρεπτική τους αξία, η προσαρμογή θεωρείται επιθυμητή (Yousef and Courtney, 2003).

Το εκάστοτε είδος καταπόνησης πυροδοτεί διαφορετικές βακτηριακές αντιδράσεις. Ορισμένα βακτήρια ενεργοποιούν βιοχημικούς μηχανισμούς παράκαμψης της άμυνας του ξενιστή ή μηχανισμούς καταπολέμησης του επιβλαβή παράγοντα, ενώ άλλα υφίστανται γενετικές μεταλλάξεις (Yousef and Courtney, 2003). Έναν ιδιαίτερο τύπο άμυνας συνιστά η επαγωγή ορισμένων μικροοργανισμών σε κατάσταση ληθάργου (Yousef and Courtney, 2003). Μία τέτοια περίπτωση αποτελεί ο σχηματισμός ενδοσπορίων από μία μερίδα θετικών κατά Gram βακτηρίων, π.χ. στα γένη *Bacillus* και *Clostridium* (Nicolò and Guglielmino, 2012; Pinto, Santos and Chambel, 2015). Τα ενδοσπόρια συνιστούν έναν τύπο αφυδατωμένων κυττάρων, με μηδενικό μεταβολικό ρυθμό και αυξημένη ανθεκτικότητα στις φυσικές και μηχανικές διεργασίες. Η δημιουργία ενδοσπορίων επιτρέπει στα κύτταρα να επιβιώνουν κάτω από δυσμενείς συνθήκες για μεγάλο χρονικό διάστημα, ενώ όταν το περιβάλλον καταστεί ξανά ευνοϊκό, να εκβλαστώνουν, επιστρέφοντας στην πρότερη κατάσταση (Nicolò and Guglielmino, 2012). Ένας επιπλέον τύπος ληθάργου είναι η κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» ή VBNC, στην οποία μεταπίπτουν συγκεκριμένα είδη μη σποριογόνων βακτηρίων (Nicolò and Guglielmino, 2012; Pinto, Santos and Chambel, 2015). Όπως και στα ενδοσπόρια, στα VBNC κύτταρα ο μεταβολικός ρυθμός είναι μειωμένος και τα κύτταρα παρουσιάζουν διαφοροποιημένη μορφολογία (Oliver, 2010; Trevors, 2011; Nicolò and Guglielmino, 2012; Pinto, Santos and Chambel, 2015). Αν και τα VBNC βακτήρια δεν αναπτύσσουν αποικίες στα καλλιεργητικά μέσα, δύνανται να επανέλθουν στην καλλιεργήσιμη αρχική τους κατάσταση όταν βρεθούν στο κατάλληλο περιβάλλον (Oliver, 2010; Trevors, 2011; Nicolò and Guglielmino, 2012; Pinto, Santos and Chambel, 2015).

Συνοπτικά, τα βακτήρια έχουν αναπτύξει μια σειρά από μηχανισμούς άμυνας που τους επιτρέπουν να επιβιώνουν σε εχθρικά για αυτά περιβάλλοντα. Η ενεργοποίηση των μηχανισμών αυτών καλείται «απόκριση στην καταπόνηση». Η απόκριση στην καταπόνηση έχει τη βάση της στο μοριακό επίπεδο του κυττάρου, όπου λαμβάνει χώρα η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και εκφράζεται φαινοτυπικά. Η έκφραση αυτή μπορεί να είναι κοινή για πολλούς τύπους καταπόνησης (γενική απόκριση στην καταπόνηση), ή να διαφέρει ανάλογα με τον παράγοντα πρόκλησης του στρες (ειδική απόκριση στην καταπόνηση). Ως αποτέλεσμα, τα βακτήρια καθίστανται πιο ανθεκτικά στις δυσμενείς συνθήκες, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η αδρανοποίησή τους κατά την επεξεργασία των τροφίμων, γεγονός που αφενός θέτει σε κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών και αφετέρου, οδηγεί σε πιθανή υποβάθμιση της ποιότητά τους και σε μείωση της διατηρησιμότητάς τους.

3. Η κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα»

Η κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» ή κατάσταση VBNC συνιστά μία κατάσταση μειωμένης ζωτικότητας, που επιτρέπει στα βακτήρια να ανταπεξέρχονται σε δυσμενείς για αυτά συνθήκες (Lin *et al.*, 2017a; Ferro, Amorico and Deo, 2018). Κατά την μετάβαση στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα», η μορφολογία και η φυσιολογία των βακτηρίων μεταβάλλονται, ενώ ο μεταβολικός τους ρυθμός μειώνεται (Oliver, 2010; Ayrapetyan and Oliver, 2016; Ferro, Amorico and Deo, 2018; Brauge *et al.*, 2020). Επιπλέον, τα βακτήρια σταματούν να προβαίνουν στην διαδικασία της μίτωσης, με αποτέλεσμα να μην αναπτύσσονται στα καλλιεργητικά μέσα όπου, υπό ευνοϊκότερες συνθήκες, θα σχημάτιζαν αποικίες (Oliver, 2010; Nicolò and Guglielmino, 2012; Ayrapetyan and Oliver, 2016; Lin *et al.*, 2017a; Brauge *et al.*, 2020). Οι παραπάνω μεταβολές, βέβαια, δεν επηρεάζουν την ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης καθώς και το δυναμικό της, το οποίο διατηρείται σε υψηλό επίπεδο (Oliver, 2010; Ayrapetyan and Oliver, 2016). Γίνεται συνεπώς εμφανές ότι η επαγωγή στην κατάσταση VBNC συνιστά ένα ιδιαίτερο τύπο βακτηριακής απόκρισης, που προσδίδει αντοχή σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις, όπως στην έλλειψη του υποστρώματος σε θρεπτικά συστατικά, στην αυξημένη ή η εξαιρετικά χαμηλή θερμοκρασία, στο ωσμωτικό και στο οξειδωτικό στρες, στην ακτινοβολία λευκού φωτός, στην παρουσία βαρέων μετάλλων, συντηρητικών ουσιών κ.α. (Oliver, 2010; Nicolò and Guglielmino, 2012; Ayrapetyan and Oliver, 2016; Lin *et al.*, 2017b; Ferro, Amorico and Deo, 2018; Highmore *et al.*, 2018; Brauge *et al.*, 2020).

Ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια έχουν εντοπιστεί σε πληθώρα μέσων: στο θαλασσινό νερό, σε νερό ποταμών και στο χώμα (Dreux *et al.*, 2007; Pinto, Santos and Chambel, 2015). Επίσης, έχει αναφερθεί η παρουσία τους σε ποτά, όπως το πόσιμο νερό, το κρασί και οι χυμοί, αλλά και σε τρόφιμα όπως ο σολομός ή τα φύλλα μαϊντανού (Dreux *et al.*, 2007; Pinto, Santos and Chambel, 2015). Αυτό δεν πρέπει να προκαλεί έκπληξη, μιας και τα τρόφιμα φιλοξενούν πλήθος βακτηρίων, τα οποία, δύνανται να μεταβούν στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα». Πολλές από τις μεθόδους επεξεργασίας και αποθήκευσης των τροφίμων πυροδοτούν απώλεια της καλλιεργησιμότητας σε πολλά τροφιμογενή βακτήρια (Nicolò and Guglielmino, 2012; Ayrapetyan and Oliver, 2016).

Η κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» έχει αναφερθεί για πληθώρα παθογόνων βακτηρίων. Ορισμένα από αυτά ανήκουν στα γένη *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. και *Vibrio* spp., καθώς και τα είδη *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas aeruginosa*, ενώ η λίστα ολοένα και επεκτείνεται (Cappelier *et al.*, 2007; Oliver, 2010; Pinto, Santos and Chambel, 2015; Ferro, Amorico and Deo, 2018). Συγκεκριμένα, η επαγωγή της *L. monocytogenes* στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» αναφέρεται σε αρκετές μελέτες. Για παράδειγμα, οι Besnard *et al.*, το 2002, διερεύνησαν μεταξύ άλλων, την επίδραση της περιβαλλοντικής θερμοκρασίας και αλατότητας

σε στελέχη *L. monocytogenes*, κατά την επώασή τους υπό συνθήκες λιμού. Τα αποτελέσματα της έρευνας κατέδειξαν την απώλεια της καλλιεργησιμότητας 10^6 CFU/mL του στελέχους CNL 895807, μέσα σε τέσσερις εβδομάδες από τη έναρξη της επώασής του στους 20°C , σε νερό χωρίς προσθήκη NaCl και σε έξι εβδομάδες, σε νερό με 7% περιεκτικότητα σε NaCl καθώς και του στελέχους Scott A, που έπαψε να δημιουργεί αποικίες σε έξι εβδομάδες, κατά τη επώασή του σε νερό 4°C . Παρά την απώλεια της καλλιεργησιμότητάς τους, τα βακτήρια διατήρησαν την μεταβολική τους δραστηριότητα σε επίπεδο πληθυσμού 10^4 - 10^5 CFU/mL, γεγονός που είναι αποδεικνύει την ύπαρξη ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων στον πληθυσμό (Besnard *et al.*, 2002). Οι Robben *et al.* (2018) κατέδειξαν επίσης τη γένεση ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων, από ισογενή πληθυσμό *L. monocytogenes*, έπειτα από τη συνδυαστική κατεργασία του με ανόργανα άλατα και μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες.

Τα ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια είναι ικανά να διατηρούν τη μολυσματικότητά τους στην κατάσταση του ληθάργου, ή να την ανακτούν κατά την ανάκαμψή τους από την κατάσταση VBNC (βλ. 2.4.2. και 2.5.) (Reissbrodt *et al.*, 2002; Cappelier *et al.*, 2007; Oliver, 2010; Nicolò and Guglielmino, 2012; Ramamurthy *et al.*, 2014; Pinto, Santos and Chambel, 2015; Ayrapetyan and Oliver, 2016). Η ανάκτηση της παθογένειας είναι δυνατόν να συμβεί είτε πριν την κατανάλωση, κατά τη διανομή και την αποθήκευση των τροφίμων στα σημεία πώλησης, είτε και κατόπιν αυτής, στον οργανισμό του ξενιστή, οδηγώντας σε ασθένεια αυτού (Nicolò and Guglielmino, 2012; Pinto, Santos and Chambel, 2015; Ayrapetyan and Oliver, 2016). Για τους παραπάνω λόγους, τα ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια αποτελούν κίνδυνο όχι μόνο για τη δημόσια υγεία, αλλά και για τη βιομηχανία τροφίμων, η οποία, σε περίπτωση τροφιμογενούς κρούσματος, καλείται να αντιμετωπίσει το οικονομικό κόστος της ανάκληση των ύποπτων προϊόντων (Nicolò and Guglielmino, 2012). Η μελέτη των βακτηρίων που μεταπίπτουν στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» και ιδιαίτερα όσων είναι παθογόνα, είναι το πρώτο βήμα για την αντιμετώπιση των κινδύνων που αυτά ελλοχεύουν.

3.1. Η επαγωγή στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα»

Η βακτηριακή μετάπτωση στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» πιθανότατα έχει μοριακή βάση. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ο ρόλος των συστημάτων τοξίνης/αντιτοξίνης και ιδιαίτερα των συστημάτων τύπου II. Στα συστήματα αυτά, η αύξηση των βακτηρίων ελέγχεται μέσω της ισορροπίας μιας τοξίνης και μιας αντιτοξίνης, οι οποίες συνήθως κωδικοποιούνται από ένα οπερόνιο δύο γονιδίων (Ayrapetyan *et al.*, 2015). Η τοξίνη είναι πάντα μια πρωτεΐνη, ενώ η αντιτοξίνη μπορεί να είναι είτε πρωτεΐνη, είτε RNA (Maisonneuve and Gerdes, 2014). Η τοξίνη έχει την ικανότητα να διακόπτει τη γονιδιακή έκφραση των βακτηρίων μέσω της αποδιάταξης των mRNA και tRNA ή της αδρανοποίησης ενζύμων, όπως της γυράσης του DNA ή της γλουταμινικής συνθετάσης του tRNA, προξενώντας έτσι στάση της βακτηριακής αύξησης (Ayrapetyan and Oliver, 2016). Από την άλλη πλευρά, η αντιτοξίνη αλληλοεπιδρά με την τοξίνη

και την αδρανοποιεί (Maisonneuve and Gerdes, 2014; Ayrapetyan *et al.*, 2015; Ayrapetyan and Oliver, 2016). Όταν το κύτταρο βρίσκεται υπό συνθήκες καταπόνησης, πρωτεάσες, όπως η Lon ή η Clp, αποικοδομούν την αντιτοξίνη, απελευθερώνοντας την τοξίνη και επιτρέποντάς της να ασκήσει την ανασταλτική της δράση (Ayrapetyan and Oliver, 2016).

Έχει ακόμαδειχθεί η επαγωγή στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» ως απόρροια της αδρανοποίησης της βακτηριακής καταλάσης υπό συνθήκες καταπόνησης (Ayrapetyan and Oliver, 2016). Το φαινόμενο αυτό, σε συνδυασμό με την παραγωγή ROS στα καλλιεργητικά μέσα κατά τη διάρκεια της επώασης υπό την παρουσία ενώσεων όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου, οδηγεί στην αναχαίτηση της αύξησης των βακτηρίων σε αυτά, μιας και τα βακτήρια δε δέχονται πλέον την προστατευτική δράση του ενζύμου (Ayrapetyan and Oliver, 2016). Επίσης, η επαγωγή των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων μπορεί να λάβει χώρα και στο εσωτερικό των βιοϋμενίων (Brauge *et al.*, 2020).

Πιθανολογείται πως η δημιουργία των μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων δεν προκύπτει αποκλειστικά ως συνέπεια κάποιας καταπόνησης, αλλά συμβαίνει και στοχαστικά. Οι Ayrapetyan και Oliver (2016) πρότειναν τη μόνιμη ύπαρξη ενός υποπληθυσμού μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων εντός του κύριου πληθυσμού, ανεξάρτητα από τις εξωτερικές συνθήκες. Με αφορμή αυτό, υπέθεσαν ότι ο συγκεκριμένος μηχανισμός εξασφαλίζει την επιβίωση ποσοστού του πληθυσμού στην περίπτωση που τα καλλιεργήσιμα βακτήρια δεν προλάβουν να ρυθμίσουν την γονιδιακή τους έκφραση, ώστε να μεταπέσουν στην κατάσταση VBNC πριν τη θανάτωσή τους από τον δυσμενή παράγοντα.

3.2. Διάκριση της κατάστασης «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» από άλλες καταστάσεις ληθάργου

3.2.1. Κατάσταση VBNC και σποριογονία

Είναι σημαντικό η κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» να μη συγχέεται με άλλες καταστάσεις βακτηριακού ληθάργου. Η πρώτη βιβλιογραφική αναφορά σχετικά με την ύπαρξη των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων χρονολογείται το 1982 (Pinto, Santos and Chambel, 2015). Ορισμένοι ερευνητές είχαν αρχικά υποθέσει πως η κατάσταση VBNC αποτελούσε μία συνθήκη ληθάργου, ανάλογη με τη σποριογονία. Πλέον, η επιστημονική κοινότητα διαχωρίζει τις δύο καταστάσεις, στηριζόμενη στις διαφορές της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων (Ramamurthy *et al.*, 2014; Pinto, Santos and Chambel, 2015). Ο μεταβολισμός των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων, αν και επιτελείται με χαμηλό ρυθμό, είναι υπαρκτός. Αντίθετα, στα ενδοσπόρια η μεταβολική δραστηριότητα απουσιάζει. Επιπλέον, απαντώνται και μορφολογικές διαφορές. Κατά τη δημιουργία των ενδοσπορίων, τα κύτταρα αφυδατώνονται και αποκτούν μία εμφανώς διαφοροποιημένη δομή σε σχέση με τη

βλαστική μορφή τους, σε αντιδιαστολή με τα VBNC βακτήρια, που εμφανίζουν περισσότερες μορφολογικές ομοιότητες με τα αντίστοιχα καλλιεργήσιμα (Pinto, Santos and Chambel, 2015).

3.2.2. Κατάσταση VBNC και persisters

Δυσκολίες παρουσιάζει και ο διαχωρισμός μεταξύ των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων και των «ανθεκτικών» βακτηρίων (persisters). Τα «ανθεκτικά» βακτήρια αποτελούν έναν ιδιαίτερο τύπο κυττάρων, τα οποία έχουν διαφοροποιηθεί από τον μητρικό, ισογενή πληθυσμό, αποκτώντας έτσι αυξημένη ικανότητα επιβίωσης έναντι της αντιβιοτικής καταπόνησης (Maisonneuve and Gerdes, 2014; Pinto, Santos and Chambel, 2015). Το είδος της «ανθεκτικότητας» (persistence) που περιγράφεται σε αυτήν την παράγραφο διαφέρει από την «ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά» (antibiotic resistance), επειδή, αφενός, τα βακτήρια δεν υπόκεινται σε γενετικές μεταλλάξεις, παρά μόνο σε φαινοτυπικές μορφοποιήσεις και, αφετέρου, δεν είναι ικανά να πολλαπλασιαστούν παρουσία αντιβιοτικών, παρά μόνο να επιβιώσουν (Maisonneuve and Gerdes, 2014). Αντίθετα, τα «ανθεκτικά στα αντιβιοτικά» κύτταρα έχουν μεταβάλλει τον γενετικό τους κώδικα με τέτοιο τρόπο, ώστε να διατηρούν την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους σε κάθε περίπτωση (Maisonneuve and Gerdes, 2014; Ayrapetyan and Oliver, 2016). Το ποσοστό των βακτηρίων που μεταπίπτουν στην κατάσταση ανθεκτικότητας (persistence) είναι αρκετά μικρό. Κατά πάσα πιθανότητα η διαφοροποίησή των βακτηρίων λαμβάνει χώρα στοχαστικά, παράλληλα με την αύξηση του κύριου πληθυσμού (Maisonneuve and Gerdes, 2014; Ayrapetyan and Oliver, 2016). Εντούτοις, δεν αποκλείεται, ένα ποσοστό ανθεκτικών βακτηρίων να προκύπτει μετά την εφαρμογή της καταπόνησης (Ayrapetyan and Oliver, 2016). Αν και οι μηχανισμοί αυτοί δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, μάλλον τόσο η γένεση των «ανθεκτικών» βακτηρίων, όσο και η επαναφορά τους στην αρχική κατάσταση ελέγχεται με βάση συστήματα τοξίνης/αντιτοξίνης του κυττάρου (Curtis, Takeuchi and Knudsen, no date; Maisonneuve and Gerdes, 2014; Ayrapetyan *et al.*, 2015; Pinto, Santos and Chambel, 2015; Ayrapetyan and Oliver, 2016).

Ένα από αυτά τα συστήματα είναι το σύστημα MazEF της *E. coli* (Nikolic *et al.*, 2018). Το γονίδιο *mazF* κωδικοποιεί μια ενδοριβονουκλεάση, η οποία κόβει το RNA του βακτηρίου, στα σημεία όπου απαντάται η αλληλουχία ACA (Nikolic *et al.*, 2018). Από την άλλη πλευρά, το *mazE* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που λειτουργεί ως αντιτοξίνη για τη MazF, καθώς ενώνεται με αυτή και την απενεργοποιεί. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι δύο πρωτεΐνες παραμένουν ενωμένες, ενώ το πρωτεϊνικό σύμπλοκο παρεμποδίζει την έκφραση του οπερονίου *mazEF* (Nikolic *et al.*, 2018). Αντίθετα, όταν το βακτηριακό περιβάλλον καταστεί δυσμενές, οι ενδογενείς πρωτεάσες Lon και ClpP αποικοδομούν τη MazE, με αποτέλεσμα η MazF να μπορεί πλέον να ασκήσει τη δράση της ως ριβονουκλεάση (Nikolic *et al.*, 2018). Η αποικοδόμηση του RNA από τη MazF προξενεί τη διακοπή της μεταφραστικής δραστηριότητας των κυττάρων και συνεπώς αναστολή της ανάπτυξής τους (Nikolic *et al.*, 2018). Έτσι, τα βακτήρια χάνουν την ικανότητα να σχηματίζουν αποικίες στα θρεπτικά εργαστηριακά μέσα, το οποίο συνιστά ιδίον

των Ζώντων αλλά Μη Καλλιεργήσιμων Κυττάρων (Nikolic *et al.*, 2018). Σε κάθε περίπτωση, έχει αποδειχθεί ότι τα εν λόγω κύτταρα κατέχουν ένα είδος παροδικής ανθεκτικότητας έναντι των αντιβιοτικών, η οποία αποδίδεται εν μέρει, στον αρκετά μειωμένο μεταβολικό τους ρυθμό (Ayrapetyan *et al.*, 2015). Τα βακτήρια αυτά δεν έχουν ικανότητα πολλαπλασιασμού, μπορούν όμως να ανακάμψουν μετά την άρση της καταπόνησης και την επαναφορά τους στην αρχική κατάσταση. Παρόμοια συστήματα τοξίνης-αντιτοξίνης έχουν εντοπιστεί και σε άλλα βακτήρια, όπως στον *S. aureus*, όπου η αποικοδόμηση της αντιτοξίνης επιτελείται από την πρωτεάση ClpP και στην *L. monocytogenes*, στην οποία το πρωτεϊνικό σύστημα MazEF κωδικοποιείται από τα γονίδια *lmo 0887-lmo0888* (Curtis *et al.*, 2017; Nikolic *et al.*, 2018).

Οι ομοιότητες μεταξύ των «ανθεκτικών» και των VBNC κυττάρων υπονοούν κάποια σύνδεση μεταξύ τους. Πράγματι, μία μερίδα ερευνητών υποστηρίζει ότι ταυτίζονται. Εξάλλου, και οι δύο τύποι βακτηρίων που δημιουργούνται λόγω της επίδρασης ενός ή και περισσότερων στρεσογόνων παραγόντων, έχουν συσχετισθεί με την πρόκληση χρόνιων ασθενειών και έχουν εντοπιστεί σε βιοϋμένια. Επιπλέον, αναφέρεται ότι παρουσιάζουν φαινοτυπικές ομοιότητες, συγκεκριμένα το σφαιρικό σχήμα που αποκτούν κατά την επώαση σε εχθρικές για αυτά συνθήκες. Οι Kim *et al.* (2018) υποστηρίζουν ότι τα «ανθεκτικά» και τα ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια αποτελούν τον ίδιο φαινότυπο και ότι η αδυναμία των δευτέρων να ανανήψουν οφείλεται, στην πραγματικότητα, στο θάνατό τους. Έχει δείχθει ότι τα συστήματα τοξίνης/αντιτοξίνης πιθανώς έχουν ρόλο και στη δημιουργία των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων κυττάρων (Ayrapetyan and Oliver, 2016).

Παρά τις ομοιότητες, τα ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα και τα «ανθεκτικά» βακτήρια πρεσβεύουν δύο διακριτές καταστάσεις. Γενικότερα, η κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει ένα στάδιο βαθύτερου ληθάργου σε σχέση με τη «συνθήκη ανθεκτικότητας» των βακτηρίων, μιας η επαναφορά των τελευταίων στην αρχική κατάσταση μπορεί να επιτευχθεί με απομάκρυνση της καταπόνησης σε διάστημα μικρότερο των είκοσι τεσσάρων ωρών (Ayrapetyan *et al.*, 2015). Αντίθετα, η ανάκαμψη (βλ. 2.5.) των VBNC βακτηρίων απαιτεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και, σε πολλές περιπτώσεις, ειδικά διαμορφωμένες συνθήκες (Maisonneuve and Gerdes, 2014; Ayrapetyan *et al.*, 2015; Pinto, Santos and Chambel, 2015; Y. Jia *et al.*, 2020)

3.3. Μορφολογία και φυσιολογία στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα»

Οι κύριες μορφολογικές διαφορές ανάμεσα στα καλλιεργήσιμα και στα ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια εντοπίζονται στο επίπεδο του κυτταρικού τοιχώματος. Έχει παρατηρηθεί ότι τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, κατά την μετάπτωσή τους στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα», τείνουν να αποκτούν παχύτερο κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο τους προσδίδει αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι των περιβαλλοντικών καταπονήσεων. Σημειωτέο, η πάχυνση των τοιχωμάτων συμβαίνει και κατά την μετάβαση των βακτηρίων από την εκθετική στην στατική φάση ανάπτυξης. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του βακτηρίου

Vibrio parahaemolyticus, το οποίο κατά την μετάβασή του στην κατάσταση VBNC εμφάνισε πάχυνση των κυτταρικών του τοιχωμάτων (Su, Jane and Wong, 2013). Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις δημιουργούνται κύστες στην επιφάνεια των κυττάρων, λόγω της αποκόλλησης του κυτταρικού τους τοιχώματος από το κυτταρόπλασμα (Signoretto *et al.*, 2000). Ένα παρόμοιο φαινόμενο έχει καταγραφεί και για τον μη καλλιεργήσιμο *Rhodococcus biphennylicivorans*, ένα θετικό κατά Gram βάκιλο, έπειτα από κατεργασία του με το αντιβιοτικό νορφλοξασίνη (Y. Jia *et al.*, 2020). Πέραν από την πάχυνση του τοιχώματος, διαπιστώθηκε και αλλαγή στην υφή του, καθώς αυτό έγινε τραχύτερο και απέκτησε ανομοιόμορφες πτυχές στην επιφάνειά του (Y. Jia *et al.*, 2020).

Η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος μεταβάλλεται όταν τα βακτήρια εισέρχονται στην μη καλλιεργήσιμη κατάσταση. Οι Signoretto *et al.* (2000) αναφέρουν ότι κατά την είσοδό του *Enterococcus faecalis* στην κατάσταση VBNC, το κυτταρικό του τοίχωμα υφίσταται βιοχημικές αλλαγές. Συγκεκριμένα, δέχεται αύξηση των σταυροδεσμών στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης όπως και εμπλουτισμό σε διασταυρούμενα πολυπεπτίδια του N-ακετυλομουραμικού οξέος, τα οποία ανήκουν σε τάξεις πολυμερισμού, ανώτερης από αυτή των διμερών (Signoretto *et al.*, 2000). Επιπλέον, έχει καταγραφεί η αύξηση της συγκέντρωσης του τοιχώματος σε λιποτειχοϊκά οξέα, αλλά και του ποσοστού O-ακετυλίωσης του έκτου ατόμου άνθρακα των υπολειμμάτων του N-ακετυλομουραμικού οξέος (Pfeffer *et al.*, 2006). Η εν λόγω τροποποίηση της πεπτιδογλυκάνης, προστατεύει το κυτταρικό τοίχωμα από τη δράση ενδογενών ή εξωγενών λυτικών ενζύμων και λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια πολλών γνωστών βακτηριακών ειδών, όπως των *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae* καθώς και ορισμένα είδη των γενών *Proteus*, *Providencia* και *Morganella* (Pfeffer *et al.*, 2006).

Διακυμάνσεις παρατηρούνται και σε επίπεδο πρωτεϊνών, π.χ. αύξηση της συγκέντρωσης ορισμένων πρωτεϊνών δέσμευσης της πενικιλίνης (PBPs) του *E. faecalis* (Signoretto *et al.*, 2000; Y. Jia *et al.*, 2020). Οι PBPs αποτελούν μία κατηγορία ενζύμων που συμμετέχουν στον πολυμερισμό της πεπτιδογλυκάνης, ενώ ταυτόχρονα φέρουν την ικανότητα να δεσμεύουν τα μόρια της πενικιλίνης με διαφορετική συνάφεια (Signoretto *et al.*, 2000; Y. Jia *et al.*, 2020). Τα ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια χαρακτηρίζονται σε πολλές περιπτώσεις από ενισχυμένη παραγωγή ενζύμων αυτόλυσης, γεγονός που προδίδει όχι μόνο τον ρόλο τους στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, καθώς απελευθερώνουν θέσεις πολυμερισμού της πεπτιδογλυκάνης, αλλά και την πιθανή σημασία τους για την έξοδο των βακτηρίων από την κατάσταση VBNC (Signoretto *et al.*, 2000; Y. Jia *et al.*, 2020).

Έχει προταθεί ότι οι αλλαγές στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος έχουν αντίκτυπο στο σχήμα των βακτηρίων και ιδιαίτερα των βακίλων, που εισέρχονται στην κατάσταση VBNC, οι οποίοι μικραίνουν σε μέγεθος και λαμβάνουν κοκκοειδή μορφή (Barer *et al.*, 1993; Oliver, 2010; Kim *et al.*, 2018; Y. Jia *et al.*, 2020). Θεωρείται πιθανόν, ότι αυτός ο μετασχηματισμός συνιστά ένα μηχανισμό προστασίας από τους επιβλαβείς παράγοντες, όπως η μειωμένη θερμοκρασία (Pinto, Santos and Chambel, 2015). Το μειωμένο μέγεθος προσδίδει στα βακτήρια μεγαλύτερη

ειδική επιφάνεια, διευκολύνοντας έτσι την πρόσληψη τροφής, ειδικά την περίπτωση που η επαγωγή τους στη φάση των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων απορρέει από τον αποκλεισμό τους από θρεπτικά στοιχεία (Pinto, Santos and Chambel, 2015). Σε ορισμένες περιπτώσεις, η μεταβολή του σχήματος συνοδεύεται και από συσσωμάτωση των βακτηριακών κυττάρων (Shleeva *et al.*, 2004). Λιγότερες μεταβολές έχουν αναφερθεί στο επίπεδο της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, οι οποίες αφορούν κυρίως τη σύστασή της σε λιπαρά οξέα, φαινόμενο που χαρακτηρίζει, γενικά, πολλά καταπονημένα κύτταρα (Oliver, 2010; Pinto, Santos and Chambel, 2015; Kim *et al.*, 2018).

3.4. Γονιδιακή έκφραση στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα»

3.4.1. Η γονιδιακή έκφραση στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα»

Αποτελέσματα που έχουν εξαχθεί μέσω της χρήσης τεχνικών, όπως η qPCR αποδεικνύουν ότι η γονιδιακή έκφραση στα ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια είναι συνεχής, κάτι που επιβεβαιώνει τη βιωσιμότητά τους (Hill *et al.*, 2002; Oliver, 2010). Επίσης, έχει δειχθεί πως εξακολουθούν να συνθέτουν rRNA όπως και πριν την καταπόνησή τους, επομένως παραμένουν και μεταβολικά ενεργά, αν και, όπως προαναφέρθηκε, σε μικρότερο βαθμό από ότι προηγουμένως (Hill *et al.*, 2002; Oliver, 2010). Στην παρατήρηση αυτή στηρίζεται, μάλιστα, η ποσοτικοποίηση του 16S rRNA για την αξιολόγηση της επαγωγής των βακτηρίων στην κατάσταση VBNC (Hill *et al.*, 2002; Oliver, 2010).

Πέρα από τις παραπάνω ομοιότητες, η γονιδιακή έκφραση των καλλιεργήσιμων και των ζωντανών αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων παρουσιάζει αρκετές τροποποιήσεις. Οι Asakura *et al.* (2006), παρατήρησαν την ύπαρξη αξιοσημείωτων διαφορών στην έκφραση των γονιδίων του μικροοργανισμού *Vibrio cholerae* κατά τη μετάπτωσή του στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα». Οι μεγαλύτερες διαφορές αναφέρθηκαν σε γονίδια κωδικοποίησης μεμβρανικών πρωτεϊνών, πρωτεϊνών μεταφοράς και πρωτεϊνικών μορίων που συμμετέχουν στον ενεργειακό μεταβολισμό. Τα γονίδια αυτά αφορούσαν ακόμη πρωτεΐνες που θεωρούνται υπεύθυνες για το μεταβολισμό του DNA όπως και για άλλες κυτταρικές διεργασίες (Asakura *et al.*, 2006). Αντίστοιχης έκτασης έρευνα διεξήγαγαν και οι Lai *et al.* (2009) οι οποίοι πραγματοποίησαν πρωτεομική ανάλυση σε κύτταρα *Vibrio parahaemolyticus*, τα οποία είχαν μεταπέσει στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» έπειτα από επώαση σε αραιό διάλυμα NaCl, στους 4° C. Η ανάλυση έδειξε ότι στα κύτταρα υπήρχαν σε αυξημένη συγκέντρωση δεκατέσσερις πρωτεΐνες, οι δεκατρείς εκ των οποίων είναι γνωστό ότι συνδέονται με λειτουργίες όπως η μεταγραφή και η μετάφραση του DNA, η γλυκονεογένεση, η σύνθεση ATP και η αντιοξειδωτική ικανότητα (Lai *et al.*, 2009).

Έχει καταγραφεί, ακόμη, η υπερέκφραση του γονιδίου *rpoS*, με βάση το οποίο συντίθεται ο εναλλακτικός παράγοντας σίγμα σ^{38} , που είναι αρμόδιος για τη ρύθμιση της γενικής απόκρισης στην καταπόνηση των γ -πρωτεοβακτηρίων, στα μη καλλιεργήσιμα κύτταρα (Kusumoto, Miyashita and Kawamoto, 2013; Lin *et al.*, 2017a). Βέβαια, η υπερβολική συσσώρευση της RpoS ενδέχεται να επιφέρει τα αντίθετα αποτελέσματα. Οι Kusumoto *et al.* (2013) διαπίστωσαν ότι μεταλλάγματα *Salmonella enterica*, που έπαψαν να συνθέτουν την ΑΤΡάση ClpX, η οποία λειτουργεί ως συνοδός πρωτεΐνη της πρωτεάσης ClpP, αδυνατούσαν να αποικοδομήσουν την RpoS, με αποτέλεσμα αυτή να συσσωρευτεί στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον και να οδηγήσει σε καθυστέρηση της εισόδου του βακτηρίου στην κατάσταση VBNC. Αξίζει να σημειωθεί πως η πρωτεάση ClpP αποτελεί μέρος της οικογένειας πρωτεασών Clp, οι οποίες απαντώνται τόσο σε θετικά κατά Gram, όσο και σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια και συμμετέχουν στην κυτταρική απόκριση στην καταπόνηση, αποικοδομώντας τις πρωτεΐνες που έχουν καταστεί μη λειτουργικές κάτω από τις συνθήκες του στρες (Hill *et al.*, 2002). Επομένως, η ClpP δε συντίθεται μόνο από τα βακτήρια του γένους *Salmonella*, αλλά και από το βακτήριο *L. monocytogenes*, στο οποίο απαιτείται για την ανάπτυξη κάτω από συνθήκες καταπόνησης, ενώ εικάζεται ότι έχει ρόλο και στη μολυσματικότητα του βακτηρίου, καθώς επηρεάζει τη δραστηριότητα της λιστεριολυσίνης (Gaillot *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2002). Σε κάθε περίπτωση, βέβαια, διαφαίνεται η σημασία που κατέχει ο εναλλακτικός παράγοντας σ^{38} για τα βακτήρια που εισέρχονται και βρίσκονται στην μη καλλιεργήσιμη κατάσταση (Kusumoto, Miyashita and Kawamoto, 2013; Lin *et al.*, 2017a).

Η έκφραση του γονιδίου *relA* υπόκειται σε θετική ρύθμιση σε ορισμένα βακτήρια που δέχονται καταπόνηση ή που βρίσκονται στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα», όπως το *V. cholerae* (Okada *et al.*, 2002; Gonzalez-Escalona *et al.*, 2006; Pinto, Santos and Chambel, 2015). Η συντιθέμενη από αυτό πρωτεΐνη RelA, που ονομάζεται και συνθετάση I του ppGpp, ενεργοποιείται κάτω από συνθήκες καταπόνησης, από τη σύνδεση στα ριβοσώματα του κυττάρου μη φορτισμένων μορίων tRNA (Schreibers *et al.*, 1991; Pausch *et al.*, 2020). Η ανίχνευση των μη φορτισμένων tRNAs ενεργοποιεί τη RelA, η οποία συνθέτει (p)ppGpp, με την προσθήκη της διφωσφορικής ομάδας ενός μορίου ATP σε ένα μόριο GTP ή GDP (Schreibers *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 2007; Atkinson, Tenson and Haurlyiuk, 2011). Το pppGpp υδρολύεται μέσω μιας φωσφορικής υδρολάσης σε ppGpp, επάγοντας μια σειρά από αντιδράσεις (ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, απόκριση στην όξινη καταπόνηση κ.α.) που καταλήγουν σε παύση της πρωτεϊνοσύνθεσης και διακοπή της ανάπτυξης των βακτηρίων και πιθανότατα σε τροποποίηση της μολυσματικότητας των παθογόνων (stringent response) (Schreibers *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 2007; Atkinson, Tenson and Haurlyiuk, 2011; Maisonneuve and Gerdes, 2014; Pausch *et al.*, 2020). Χαρακτηριστικά, αναφέρεται αύξηση του mRNA του *relA*, σε κύτταρα *V. cholerae* που εισήλθαν στην κατάσταση VBNC αποκρινόμενα στο ψυχρό σοκ, κατά 3,2 φορές (Gonzalez-Escalona *et al.*, 2006). Επιπλέον, έχει αναφερθεί θετική ρύθμιση στην έκφραση του *relA* σε βακτήρια *L. monocytogenes* που βρίσκονταν υπό την επίδραση ωσμωτικής καταπόνησης (Okada *et al.*, 2002).

Ορισμένοι μελετητές στράφηκαν και στη μελέτη της γονιδιακής μεταγραφής, στο πλαίσιο των ειδικών αποκρίσεων στην καταπόνηση. Οι Asakura et al. (2008) μελέτησαν το βακτήριο *Escherichia coli* O157:H7, το οποίο είχε μεταπέσει στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» κατά την υποβολή του σε οξειδωτική καταπόνηση. Στο εν λόγω βακτήριο εκφράζεται το γονίδιο *ompW*, το οποίο κωδικοποιεί μία εξωμεμβρανική πρωτεΐνη, που εμπλέκεται στη δέσμευση της κολισίνης S4, μιας βακτηριοσίνης (Asakura et al., 2008). Αν και ο ρόλος της *OmpW*, όσον αφορά την κατάσταση VBNC δεν ήταν ξεκάθαρος, οι ερευνητές υπέθεσαν ότι σχετίζεται με την ενεργοποίηση της απόκρισης ενός άλλου εναλλακτικού παράγοντα σίγμα, του RpoE, ο οποίος είναι επιφορτισμένος με την προστασία του κυτταρικού φακέλου από τις εξωτερικές απειλές, στις οποίες ανήκουν οι παράγοντες οξείδωσης (Asakura et al., 2008).

3.4.2. Μελέτη γονιδίων μολυσματικότητας

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με τη μολυσματικότητα των παθογόνων, ζωντανών αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων. Η πιθανότητα πρόκλησης ασθενειών από βακτήρια εντός της κατάστασης VBNC έχει αποτελέσει πηγή επιστημονικής αντιπαράθεσης. Ορισμένες έρευνες υποστηρίζουν την ύπαρξη βακτηριακών ειδών που δε διακόπτουν τη σύνθεση των μορίων μολυσματικότητας, ακόμα και μετά την είσοδό τους στην κατάσταση ληθάργου, αν και πιθανότατα με βραδύτερο ρυθμό (Kusumoto, Miyashita and Kawamoto, 2013; Chen et al., 2018; Ferro, Amorico and Deo, 2018). Στην έρευνα των Asakura et al. (2006) υποστηρίχθηκε ότι το βακτήριο *V. cholerae* συνεχίζει την έκφραση των γονιδίων μολυσματικότητάς του, ενώ βρίσκεται στην κατάσταση VBNC. Επίσης, σχετικές μελέτες αναφέρουν ότι τα ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια των ειδών *Legionella pneumophila* και *E. coli* εξακολουθούν να συνθέτουν μόρια μολυσματικότητας. Συγκεκριμένα, οι Liu et al. (2010) διαπίστωσαν την παραγωγή Shiga-toxins από ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια *E. coli* O157:H7, τα οποία είχαν επωαστεί σε νερό που είχε υποστεί χλωραμίνωση. Οι Shiga-toxins είναι κυτταροτοξίνες που παράγονται κατά την εγκατάσταση του παθογόνου στο παχύ έντερο και ευθύνονται για τα συμπτώματα του αιμολυτικού ουρεμικού συνδρόμου (HUS) και της αιμορραγικής κολίτιδας (HC) (Liu et al., 2010b). Οι Alleron et al. (2013) επίσης αναφέρουν την ικανότητα των VBNC κυττάρων *L. pneumophila* να συνθέτουν πρωτεΐνες μολυσματικότητας, όπως τον «ενισχυτή της μολυσματικότητας των μακροφάγων» (*mip*). Ο *mip*, ο οποίος εντοπίζεται στην επιφάνεια των βακτηρίων, συμμετέχει στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, βοηθώντας στην πρόσδεση και στη διείσδυση της *Legionella* στα κύτταρα ξενιστές (Alleron et al., 2013).

Αν και πολλά βακτήρια που βρίσκονται στην κατάσταση VBNC δεν προβαίνουν σε παραγωγή τοξινών ή άλλων παραγόντων μολυσματικότητας, δεν παύουν να είναι παθογόνα. Αυτό αποδεικνύεται από την επανεκκίνηση της μολυσματικής έκφρασης κατά την επαναφορά τους

στην αρχική, καλλιεργήσιμη κατάσταση (βλ. **Παράγραφο 4.2.**), ένα φαινόμενο που, αν πραγματοποιηθεί *in vivo*, μπορεί να οδηγήσει σε ασθένεια του ξενιστή (Asakura *et al.*, 2006; Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009; Oliver, 2010; Ayrapetyan *et al.*, 2015; Ferro, Amorico and Deo, 2018). Με αυτήν την πρόταση συμφωνούν τα αποτελέσματα της μελέτης των Sun *et al.* (2008) οι οποίοι παρατήρησαν ότι η αποσιώπηση του γονιδίου της αιμολυσίνης του *Vibrio harveyi*, όταν αυτό βρισκόταν στην μη καλλιεργήσιμη κατάσταση, ήταν προσωρινή, καθώς το βακτήριο επανεκκίνησε την έκφραση του γονιδίου, έπειτα από την επαναφορά του στην προτέρα φυσιολογική κατάσταση. Αξιοσημείωτη είναι και η έρευνα των Cappelletti *et al.* (2007), μιας και κατέδειξαν την ανάκαμψη της μολυσματικότητας της *L. monocytogenes* παράλληλα με την ανάκαμψή της από την κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα».

Η μολυσματικότητα των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων θεωρείται ότι επηρεάζεται από τις συνθήκες που επικρατούν κατά την επαγωγή τους στην κατάσταση VBNC (Nicolò and Guglielmino, 2012). Επιπλέον, οι περιβαλλοντικές παράμετροι καθορίζουν την ικανότητα ανάκαμψης των βακτηρίων από την κατάσταση ληθάργου (βλ. **2.5.**), γεγονός που σε πολλές περιπτώσεις αποτελεί προϋπόθεση για την ανάκτηση της παθογένειας (Cappelletti *et al.*, 2007; Nicolò and Guglielmino, 2012). Επομένως, η μελέτη των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων χρειάζεται να πραγματοποιηθεί κάτω από διαφορετικούς συνδυασμούς περιβαλλοντικών παραγόντων, προκειμένου να μπορέσει να εξαχθεί ένα έγκυρο πόρισμα σχετικά με τη μολυσματικότητά τους.

3.5. Ανάκαμψη των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων

Η απόδειξη της υπόθεσης ότι τα ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια είναι όντως ζωντανά προκύπτει από τη μελέτη της επονομαζόμενης «ανάκαμψης» (resuscitation) (Erkmen, 2022). Η ανάκαμψη είναι η ικανότητα των μη καλλιεργήσιμων κυττάρων να ενεργοποιούνται, και να επανέρχονται στην αρχική, βλαστική τους κατάσταση, όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος γίνουν ξανά ευνοϊκές (Nicolò and Guglielmino, 2012; Ayrapetyan and Oliver, 2016; Ferro, Amorico and Deo, 2018). Με την ανάκαμψη λοιπόν τα κύτταρα ανακτούν τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά τους, ενώ καθίσταται και πάλι ικανά να καλλιεργηθούν στα εργαστηριακά μέσα (Nicolò and Guglielmino, 2012).

Οι συνθήκες που επάγουν την ανάκαμψη δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστές (Ayrapetyan and Oliver, 2016). Σε αυτό παίζει ρόλο το γεγονός, ότι οι συνθήκες που απαιτούνται διαφέρουν μεταξύ των διάφορων βακτηριακών ειδών. Ορισμένα βακτήρια ανακάμπτουν απλά και μόνο με την απομάκρυνση του παράγοντα καταπόνησης, π.χ. της χαμηλής θερμοκρασίας ή της απουσίας του υποστρώματος σε θρεπτικά συστατικά (Wang *et al.*, 2020). Στη δεύτερη περίπτωση αρκεί η επώαση των κυττάρων σε μέσο που είναι πλούσιο σε θρεπτικά στοιχεία (Ramamurthy *et al.*, 2014). Άλλα βακτήρια απαιτούν πιο περίπλοκους χειρισμούς (Ayrapetyan and Oliver, 2016). Στην πρώτη περίπτωση, ανήκουν πολλά από τα βακτήρια του γένους *Vibrio*, τα οποία

μεταπίπτουν στην κατάσταση «ζώντα, μη καλλιεργήσιμα» κατά την επώασή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ο Oliver (2010) αναφέρει χαρακτηριστικά την επαγωγή του *Vibrio vulnificus* στην κατάσταση VBNC, στους 10 °C. Για την επαναφορά αυτών των βακτηρίων στην καλλιεργήσιμη κατάσταση αρκεί η ρύθμιση της θερμοκρασίας σε υψηλότερες τιμές. Επίσης, οι Jia et al. (2020) προξένησαν ανάκαμψη μη καλλιεργήσιμων κύτταρων *Rhodococcus biphennylicivorans* που είχαν κατεργαστεί με νορφλοξασίνη, επαναιωρώντας τα σε ρευστό υπόστρωμα που δεν περιείχε το αντιβιοτικό.

Αντιθέτως, η απλή απομάκρυνση της καταπόνησης δεν αρκεί για βακτήρια όπως το *V. cholerae*, το οποίο οι Asakura et al. (2006) κατάφεραν να ανακάμψουν, *in vivo*, μέσω του εμβολιασμού ποντικών που είχαν προηγουμένως λάβει δεξτράνη σιδήρου, παρόλο που η μετάβασή του στο λήθαργο είχε συμβεί κατά την επώασή του σε τεχνητό θαλασσινό νερό στους 4 °C. Σε αντίστοιχη περίπτωση, οι Sun et al. (2008), προκειμένου να επαναφέρουν το *V. harveyi* στην βλαστική κατάσταση, χρειάστηκε να το επώασουν παρουσία εκχυλίσματος ζύμης και Tween 20 ή βιταμίνης B. Όσον αφορά την *L. monocytogenes*, η ανάκαμψή της φαίνεται να μπορεί να επιτευχθεί υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Στην έρευνα των (Cappelletti et al., 2007) αναφέρεται η ανάκαμψη του βακτηρίου *L. monocytogenes* από την κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» σε αυγά κότας που περιείχαν έμβρυο. Είναι πιθανό η ανάκαμψη της *Listeria* να κατέστη δυνατή λόγω της δράσης μορίων σηματοδότησης.

Η ανάνηψη των βακτηρίων από την μη καλλιεργήσιμη κατάσταση έχει αποδοθεί, μέχρι στιγμής, στη δράση δύο κατηγοριών μορίων: των «παραγόντων προώθησης της ανάκαμψης» ή RpfS και των «αυτό-επαγωγών της ανάπτυξης» (autoinducers of growth) (Hett et al., 2007; Oliver, 2010; Nicolò and Guglielmino, 2012; Pinto, Santos and Chambel, 2015). Οι RpfS αποτελούν μια ομάδα εξωκυτταρικών κυτοκινών, δηλαδή πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος από το ένα κύτταρο στο άλλο (Pinto, Santos and Chambel, 2015). Η έκκριση των RpfS έχει αναφερθεί από πολλά βακτηριακά γένη, όπως τα *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium* spp., *Corynebacterium* spp., *Streptomyces* spp. καθώς και από τα είδη *L. monocytogenes*, *Tomitella bififormata* και *S. enterica* ser. *Typhimurium*. (Hett et al., 2007; Ramamurthy et al., 2014; Pinto, Santos and Chambel, 2015). Οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί σχετικά με την άρση της κατάστασης VBNC από τους RpfS είναι δύο. Αφενός, έχει προταθεί η αλληλεπίδραση των RpfS με το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων, προς απελευθέρωση ενός μορίου που είναι ικανό να επάγει μια σειρά από αλληλεπιδράσεις που οδηγούν στην έξοδο των κυττάρων από την κατάσταση VBNC (Oliver, 2010; Pinto, Santos and Chambel, 2015). Αφετέρου, έχει υποστηριχθεί ότι η ανάκαμψη των βακτηρίων εκκινείται λόγω της λύσης της πεπτιδογλυκάνης από τους RpfS, που με αυτόν τον τρόπο γκρεμίζουν το μηχανικό φράγμα του κυτταρικού τοιχώματος, επιτρέποντας τη διαίρεση των κυττάρων (Hett et al., 2007; Pinto, Santos and Chambel, 2015). Θεωρήθηκε επίσης πιθανό, οι RpfS να δρουν σε συνδυασμό με άλλα μόρια, όπως με μια υδρολάση, την RipA, που έχει εντοπιστεί στην εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων και στα σέπτα των μυκοβακτηρίων (Hett et al., 2007). Προτάθηκε λοιπόν πως οι RpfS και οι RipAs, δρώντας μαζί με άλλες υδρολάσες της πεπτιδογλυκάνης την διασπούν, απελευθερώνοντας μόρια μouroπεπτιδίων, τα οποία στη

συνέχεια δρουν ως σηματοδότες, μέσω των μονοπατιών μεταγωγής σήματος των βακτηρίων ή του ξενιστή (Hett *et al.*, 2007; Ramamurthy *et al.*, 2014; Pinto, Santos and Chambel, 2015)

Από την άλλη πλευρά, οι αυτό-επαγωγείς ανάπτυξης συνιστούν μια οικογένεια θερμικά σταθερών μορίων σηματοδότησης, τα οποία μάλιστα θεωρούνται ως ένα νέο σύστημα *quorum sensing*, με το όνομα AI-3 (Oliver, 2010; Nicolò and Guglielmino, 2012). Η παραγωγή των συγκεκριμένων μορίων διεγείρεται από την παρουσία της νορεπινεφρίνης, μίας ορμόνης που ανήκει στην κατηγορία των κατεχολαμινών και που εκκρίνεται από τα θηλαστικά σε καταστάσεις στρες, όπως έπειτα από σοβαρό τραυματισμό των ιστών τους (Oliver, 2010; Nicolò *et al.*, 2011; Pinto, Santos and Chambel, 2015; Ferro, Amorico and Deo, 2018). Παρομοίως, το AI-3 επάγει τη βακτηριακή αύξηση υπό συνθήκες στρες καθώς και διεγείρει την ανάκαμψη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Reissbrodt *et al.*, 2002; Ayrapetyan and Oliver, 2016). Έχει παρατηρηθεί επίσης, αύξηση στη βακτηριακή έκκριση του AI-3, όταν η επώασή επιτελείται υπό την παρουσία νορεπινεφρίνης, είτε πρόκειται για θετικά, είτε για αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Θεωρείται εν τέλει πιθανό, τόσο η νορεπινεφρίνη, όσο και το AI-3 να μοιράζονται τα ίδια μονοπάτια σηματοδότησης και να αδρανοποιούνται και από τους ίδιους αδρενεργικούς ανταγωνιστές (Sperandio *et al.*, 2003).

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι εάν ένας πληθυσμός μη καλλιεργήσιμων κυττάρων ανακτήσει την ικανότητα να σχηματίζει αποικίες στα εργαστηριακά μέσα, έχει ανακάμψει από την κατάσταση VBNC. Ωστόσο, αυτό δεν ισχύει πάντα. Είναι πιθανό, η εκ νέου ανάπτυξη των αποικιών να μην οφείλεται σε ανάκαμψη των μη καλλιεργήσιμων κυττάρων, αλλά, στην πραγματικότητα, στην αύξηση ενός εξαιρετικά μικρού πληθυσμού καλλιεργήσιμων βακτηρίων, που προϋπήρχαν στον αρχικό πληθυσμό (Besnard *et al.*, 2002; Trevors, 2011). Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί κυρίως σε πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν μικτές καλλιέργειες, όπου ο βακτηριακός ανταγωνισμός είναι εντονότερος. Επομένως, ο σχεδιασμός των πειραμάτων ανάκαμψης χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, ώστε να αποφευχθούν τυχόν τεχνικά σφάλματα.

3.6. Μέθοδοι ανίχνευσης και μελέτης των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων

Η βιωσιμότητα των βακτηρίων αξιολογείται, κατά κύριο λόγο, με βάση την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται σε γενικά ή σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα, (Breeuwer and Abee, 2000; Gracias and McKillip, 2004). Είναι προφανές, ότι οι συγκεκριμένες τεχνικές δεν είναι κατάλληλες για την ανίχνευση των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων που, εξ ορισμού, αδυνατούν να πολλαπλασιαστούν στα παραδοσιακά καλλιεργητικά υποστρώματα. Η ανίχνευση και η καταμέτρηση των VBNC βακτηρίων απαιτεί, συνεπώς, την επιστράτευση εναλλακτικών μεθόδων (Jia *et al.*, 2020).

3.6.1. Μικροσκοπία φθορισμού

Κάποιες από τις συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους εξέτασης των VBNC βακτηρίων βασίζονται σε ένα συνδυασμό φθορίζουσας χρώσης και επακόλουθης εξέτασής τους με μικροσκοπία φθορισμού (Flow cytometry- FC) (Barer et al., 1993; Hammes, Berney and Egli, 2010; Gao et al., 2021). Η μικροσκοπία φθορισμού συνιστά μια μέθοδο παρατήρησης φθορίζοντων αντικειμένων, που επιτρέπει την εξέταση των χρωσμένων βακτηρίων σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου, με ακρίβεια και ευαισθησία (Rost, 2017). Η εν λόγω μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση σημάτων φθορισμού που εκπέμπονται κατόπιν της φωτεινής διέγερσης των φθορίζουσών ουσιών, μέσω μονοχρωματικού φωτός μικρού μήκους κύματος και της ακόλουθης επαναφοράς τους στην βασική κατάσταση (Sanderson et al., 2014; Bridier et al., 2015; Rost, 2017). Το βακτηριακό δείγμα εξετάζεται με τη βοήθεια ενός φίλτρου που απορροφά την ακτινοβολία διέγερσης και επιτρέπει τη μεταφορά μόνο της ακτινοβολίας εκπομπής, με αποτέλεσμα τα βακτήρια να εμφανίζονται ως φθορίζοντα αντικείμενα σε σκοτεινό φόντο. Ο ορθός συνδυασμός φίλτρων διέγερσης και εκπομπής δύναται να αυξήσει σημαντικά την ευαισθησία της μεθόδου (Rost, 2017). Η μικροσκοπία φθορισμού μπορεί να συνδυαστεί με τη λήψη φωτογραφιών ή βίντεο και τα αποτελέσματα να αναλυθούν με image analysis (Rost, 2017). Λόγω της περιπλοκότητας της μεθόδου, χρειάζεται προσοχή στην ανάλυση και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ώστε να αποφευχθεί πιθανή παραπλάνηση (Rost, 2017).

Ανάλογα με το είδος της χρώσης, η βιωσιμότητα των μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων δύναται να αξιολογηθεί με βάση την αναπνευστική ή την ενζυμική τους δραστηριότητα, την περιεκτικότητά τους σε ATP, την ακεραιότητα του γενετικού τους υλικού, αλλά και των μεμβρανών τους, το δυναμικό της κυτταροπλασματικής μεμβράνης τους κ.α. (Nocker, Sossa and Camper, 2007) Γενικά, προτιμάται εξετάζονται παράλληλα δύο ή και περισσότερες παράμετροι, ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη ακρίβεια (Nocker et al., 2011).

Η Άμεση Καταμέτρηση των Ζώντων μικροοργανισμών ή DVC είναι μία μέθοδος που βασίζεται στην εξέταση των κυττάρων, χρησιμοποιώντας ως κριτήριο τις μεταβολές στη μορφολογία τους (Gao et al., 2021). Η συγκεκριμένη τεχνική, που αναπτύχθηκε από τους Kogure, Simidu και Taga, το 1979, στηρίζεται στην επιμήκυνση των ζωντανών βακτηρίων, η οποία προκαλείται κατά την επώασή τους σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει εκχύλισμα ζύμης, παρουσία του αντιμικροβιακού παράγοντα ναλιδιξικό οξύ (Barer et al., 1993; Ramamurthy et al., 2014; Gao et al., 2021). Το ναλιδιξικό οξύ αναστέλλει τη δράση της DNA γυράσης, μιας τοποϊσομεράσης, παρεμποδίζοντας έτσι την διαίρεση των κυττάρων και οδηγώντας στην επιμήκυνσή τους (Barer et al., 1993; Ramamurthy et al., 2014; Gao et al., 2021). Έτσι λοιπόν, αποτρέπει τη διαίρεση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, ωστόσο δεν είναι το ίδιο αποτελεσματικό έναντι στα θετικά κατά Gram βακτήρια (Barer et al., 1993; Ramamurthy et al., 2014; Gao et al., 2021). Για το λόγο αυτό, στην περίπτωση των θετικών κατά Gram βακτηρίων το ναλιδιξικό οξύ αντικαθίσταται με αντιβιοτικά όπως η σιπροφλοξασίνη (Ramamurthy et al., 2014; Gao et al., 2021). Τα ζωντανά κύτταρα, αν και αναπτύσσονται στο θρεπτικό μέσο, δεν μπορούν να διαιρεθούν, οπότε επιμηκύνονται (Barer et al., 1993; Gao et al., 2021). Η παρατήρηση των βακτηρίων επιτελείται

στο μικροσκόπιο, έπειτα από χρώση με πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης ή 4'6-διαμιδεϊνο-2-2-φαινυλινδόλη (DAPI) (Ramamurthy et al., 2014; Gao et al., 2021).

Τα βακτήρια μπορούν επίσης να ταξινομηθούν και με βάση το μεταβολικό τους ρυθμό (Pinto, Santos and Chambel, 2015; Gao et al., 2021). Για τον σκοπό αυτό, επιστρατεύεται η χρώση τους με άλατα του τετραζολίου, τα οποία δρουν ως αποδέκτες των ηλεκτρονίων που ρέουν μέσα στη μεταβολική αλυσίδα (Nicolò and Guglielmino, 2012). Το γνωστότερο από αυτά είναι το 5-κυανο-2,3-διτολυλο χλωριούχο τετραζόλιο (CTC), το οποίο ανάγεται μέσω μιας βακτηριακής αφυδρογονάσης σε ένα ερυθρό φθορίζον προϊόν φορμαζάνης, βάφοντας τα μεταβολικά ενεργά - και άρα ζωντανά- κύτταρα κόκκινα (Nicolò and Guglielmino, 2012; Pinto, Santos and Chambel, 2015; Gao et al., 2021). Το CTC εφαρμόζεται συνήθως σε συνδυασμό με το DAPI, που βάφει μη εκλεκτικά τόσο τα ζωντανά, όσο και τα νεκρά κύτταρα με μπλε χρωματισμό, επιτυγχάνοντας έτσι το διαχωρισμό των ζωντανών, ερυθρών βακτηρίων από τα νεκρά, μπλε βακτήρια (Nicolò and Guglielmino, 2012; Ramamurthy et al., 2014; Gao et al., 2021).

Συχνή είναι και η διάκριση των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων από τα νεκρά, αξιοποιώντας ως κριτήριο την ακεραιότητα της εξωτερικής τους μεμβράνης (Bridier et al., 2015; Gao et al., 2021). Γενικά, θεωρείται ότι τα ζωντανά κύτταρα φέρουν αέριες μεμβράνες, ενώ τα νεκρά τραυματισμένες (Breeuwer and Abee, 2000). Η διάκριση αυτή γίνεται με τη συνδυασμένη χρήση των χρωστικών SYTO, όπως το SYTO 9, το SYTO 11 κ.α., ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide-PI) και βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium bromide-EB) (Breeuwer and Abee, 2000; Nicolò and Guglielmino, 2012; Ramamurthy et al., 2014; Bridier et al., 2015; Gao et al., 2021). Τα SYTO έχουν την ικανότητα να εισέρχονται στα βακτήρια διαμέσου της μεμβράνης, να δεσμεύονται στο DNA και να τους προσδίδουν πράσινο χρωματισμό (Ramamurthy et al., 2014; Gao et al., 2021). Επομένως βάφουν όχι μόνο τα νεκρά, αλλά και τα ζωντανά βακτήρια (Nicolò and Guglielmino, 2012; Ramamurthy et al., 2014; Gao et al., 2021). Αντιθέτως, το PI και το EB αδυνατούν να διαπεράσουν τον κυτταρικό φάκελο και για αυτό χρωματίζουν ερυθρά και πορτοκαλόχρωμα αντίστοιχα μόνο τα τραυματισμένα κύτταρα (Nicolò and Guglielmino, 2012; Ramamurthy et al., 2014; S. Jia et al., 2020; Gao et al., 2021). Έτσι δύνανται να καταμετρηθούν τα ολικά αλλά και τα ζωντανά βακτήρια.

Η διοξική καρβοξυφλουροσκεΐνη (cFDA) είναι μια φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται και αυτή, για τη διπλή χρώση των μη καλλιεργήσιμων κυττάρων, μαζί με το PI και το EB (Gao et al., 2021). Το μόριο της cFDA έχει λιπόφιλο χαρακτήρα, ο οποίος του προσδίδει την ικανότητα να διαπερνά τις περισσότερες βακτηριακές μεμβράνες και να εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα (Gao et al., 2021). Εκεί, μέσω της δράσης μη εξειδικευμένων βακτηριακών εστερασών, διασπάται σε διοξικό ιόν και σε καρβοξυφλουροσκεΐνη (cF) (Gorokhova, Mattsson and Sundström, 2012; Gao et al., 2021). Η cF δεν διαθέτει ικανότητα μεταφοράς μέσω της πλασματικής μεμβράνης, συνεπώς, στην περίπτωση που η μεμβράνη δεν έχει τραυματιστεί, παραμένει στο εσωτερικό του κυττάρου, χρωματίζοντάς το (Gorokhova, Mattsson and Sundström, 2012; Gao et al., 2021). Εάν το βακτήριο έχει υποστεί τραυματισμό, χρωματίζεται ερυθρό, από το PI ή το EB (Gao et al., 2021).

3.6.2. Αντίδραση Πολυμεράσης με Αντίστροφη Μεταγραφή

Η μελέτη των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων επιτελείται και με την εφαρμογή μοριακών μεθόδων που βασίζονται στην τεχνολογία της RT-qPCR. Η «Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης με Αντίστροφη Μεταγραφή» στηρίζεται στην κλασσική μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης ή PCR. Η PCR επινοήθηκε το 1983 και έκτοτε συνιστά ένα από τα ισχυρότερα εργαλεία της μοριακής βιολογίας (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Η χρήση της PCR παρέχει στον ερευνητή την ικανότητα να πολλαπλασιάσει, ή αλλιώς, να ενισχύσει ένα τμήμα DNA έως και εκατομμύρια φορές (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Στην RT-PCR πραγματοποιείται ενίσχυση μιας αλυσίδας DNA, η οποία έχει συντεθεί από μία συμπληρωματική της αλυσίδα RNA που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο (Dorak, 2006; Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Η RT-qPCR βασίζεται στη συνεχή συλλογή σημάτων φθορισμού, τα οποία παράγονται με το πέρας κάθε κύκλου μίας ή και περισσότερων δοκιμών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για ένα ορισμένο εύρος κύκλων . και στην εξαγωγή ποσοτικών αποτελεσμάτων από αυτά (Dorak, 2006).

Συγκεκριμένα, η RT-qPCR περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής

Η αντίστροφη μεταγραφή συνιστά το πρώτο στάδιο της RT-PCR. Όπως αναγράφεται παραπάνω, σε αυτό το στάδιο ένα τμήμα RNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού τμήματος DNA (Dorak, 2006; Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Το νεοσυντιθέμενο DNA ονομάζεται συμπληρωματικό ή cDNA και σύνθεση διενεργείται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση ή αντίστροφη τρανσκριπτάση, που στη φύση εντοπίζεται στους ρετροϊούς (Dorak, 2006; Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Είναι σημαντικό, το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης που επιλέγεται για την RT-PCR, να έχει λειτουργία RNάσης, ώστε να μπορεί να απελευθερώνει την αλυσίδα RNA από το σύμπλοκο RNA-DNA και να συνεχίζεται η αντίστροφη μεταγραφή (Dorak, 2006). Τελικά προκύπτει ένα δίκλωνο μόριο cDNA (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015).

2. Το στάδιο της PCR

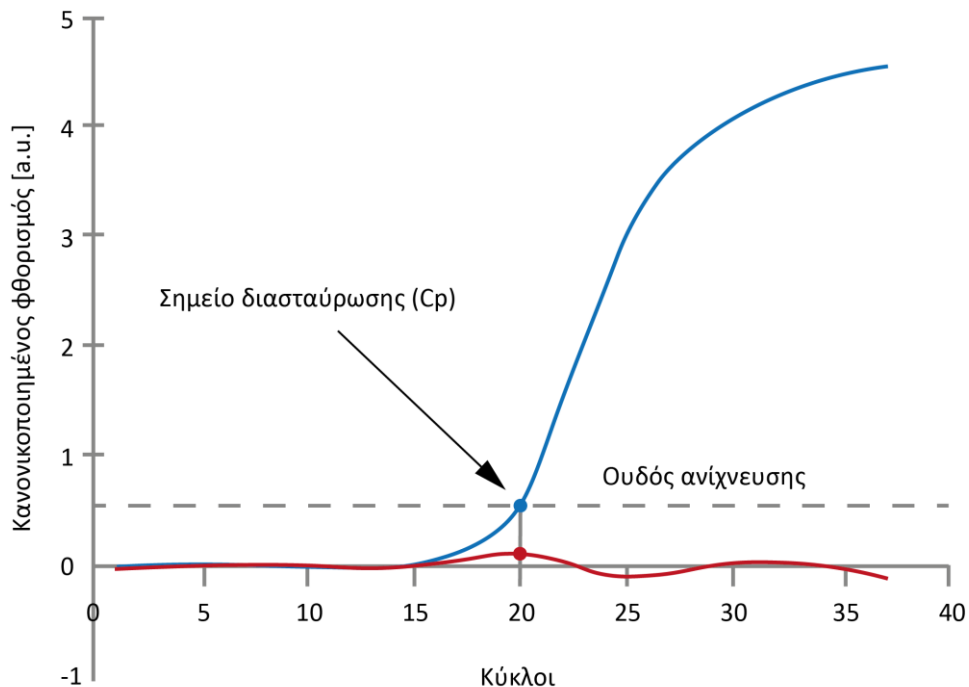
Η αντίστροφη μεταγραφή ακολουθείται από την ενίσχυση του προκύπτοντος DNA σε ένα εξειδικευμένο όργανο που ονομάζεται θερμικός κυκλοποιητής (thermal cyclers) (Dorak, 2006; Tropp, 2014; Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Ο θερμικός κυκλοποιητής επιτρέπει τον προγραμματισμό της θερμοκρασίας στις επιθυμητές τιμές, του χρόνου παραμονής σε αυτές, καθώς και τη διαδοχή των σταδίων της PCR, ανάλογα με το εκάστοτε πρωτόκολλο (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελείται από τρία στάδια (Tropp, 2014; Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Αρχικά πραγματοποιείται αποδιάταξη του δίκλωνου cDNA που χρησιμοποιείται ως

μήτρα, το οποίο ακολουθείται από το στάδιο του υβριδισμού των εκκινητών κατά το οποίο μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 20-30 βάσεων που ονομάζονται εκκινητές προσδένονται στα άκρα των αποδιαταγμένων αλυσίδων DNA μέσω του κανόνα της συμπληρωματικότητας (Tropp, 2014; Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Τέλος, στο στάδιο της επιμήκυνσης η Taq πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές στο 3' άκρο τους, προσθέτοντας προσεγγιστικά 1000 δεοξυριβονουκλεοτίδια ανά λεπτό, σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας, με αποτέλεσμα να προκύπτουν δύο νέα δίκλιωνα τμήματα DNA από κάθε μητρικό κλώνο (Tropp, 2014; Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Τα τρία παραπάνω στάδια συναποτελούν έναν κύκλο πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας-στόχου ή αλλιώς έναν κύκλο PCR (Tropp, 2014). Σε μία τυπική PCR λαμβάνουν χώρα 25-35 θερμοκοί κύκλοι (Dorak, 2006; Tropp, 2014; Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015).

3. Παραλαβή αποτελεσμάτων

Η real-time RT-PCR επιτρέπει τη συνεχή συλλογή των αποτελεσμάτων με βάση την ανίχνευση σημάτων φθορισμού, που εκπέμπονται από φθορίζουσες χρωστικές (Dorak, 2006). Μία δημοφιλής φθορίζουσα χρωστική είναι το SYBR® Green I, που έχει την ικανότητα να προσδένεται στα δίκλιωνα μόρια DNA, εκπέμποντας ισχυρά σήματα φθορισμού (Wang and Seed, 2003; Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Η ένταση των σημάτων φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας των προϊόντων της PCR, κάτι το οποίο επιτρέπει την ποσοτικοποίησή τους (Dorak, 2006; Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015).

Σύμφωνα με τους Παλαιολόγου κ.ά. (2015), τα αποτελέσματα της real-time PCR παραλαμβάνονται με τη μορφή καμπυλών, όπως αυτές που απεικονίζονται στην εικόνα 2.4.1.1. Στις καμπύλες αυτές, φαίνεται και η κινητική της αντίδρασης της PCR. Συνοπτικά, η PCR αποτελείται από τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση πλατώ. Η εκθετική φάση παρατηρείται κατά την έναρξη της PCR. Τότε όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε περίσσεια και η παραγωγή των προϊόντων της ενίσχυσης συμβαίνει με υψηλό ρυθμό. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η γραμμική φάση, κατά την οποία η μείωση των διαθέσιμων αντιδραστηρίων επιφέρει πτώση στην παραγωγή των αντιγράφων. Καθώς η συνεχής κατανάλωση των αντιδραστηρίων προκαλεί την εξάντλησή τους, η σύνθεση νέων τμημάτων DNA σταματά, οπότε και επέρχεται η φάση του πλατώ (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015).



Εικόνα 2.4.1.1. Καμπύλη real-time PCR. Η διακοπτόμενη γραμμή αντιστοιχεί στο κατώφλι ανίχνευσης (threshold), δηλαδή στο επίπεδο, όπου ο φθορισμός των προϊόντων της PCR αρχίζει να ξεπερνά το βασικό επίπεδο (baseline) και να διακρίνεται από το θόρυβο του οργάνου. Ο κύκλος στον οποίο αυτό συμβαίνει αντιστοιχεί στην τιμή C_t ή στο σημείο C_p που είναι γνωστό και ως σημείο διασταύρωσης. Οι τιμές C_t και C_p χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση των γονιδίων του δείγματος. Τα δείγματα που διαθέτουν πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερα C_t και C_p από τα δείγματα με τα λιγότερα αντίγραφα. $C_t=0-15$ βασικό επίπεδο, $C_t=15-20$ εκθετική φάση, $C_t=20-35$ γραμμική φάση, $C_t>35$ φάση πλατώ (αναμένεται επιπεδοποίηση της καμπύλης) (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015).

Τα αντιδραστήρια που χρειάζονται για την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης qPCR είναι η DNA πολυμεράση, οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές, το cDNA, τα δεοξυριβονουκλεοτίδια, το ρυθμιστικό διάλυμα και τα ιόντα Mg^{2+} (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Αν και η real-time RT-PCR θεωρείται ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος, δεν είναι σπάνια η ύπαρξη σφαλμάτων (Wang and Seed, 2003). Προκειμένου λοιπόν να περιοριστούν αυτά τα σφάλματα είναι απαραίτητο να γίνονται σωστοί χειρισμοί καθόλα τα στάδια της προετοιμασίας των αντιδραστηρίων της.

DNA πολυμεράση

Όπως αναλύθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, το ένζυμο που προτιμάται στην PCR είναι η Taq πολυμεράση, η οποία παραμένει ενεργή ακόμα και στους $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ και φέρει ικανότητα 3'-5' εξωνουκλεάσης (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Μπορεί δηλαδή να

αφαιρεί τα νουκλεοτίδια που η ίδια πρόσθεσε ενάντια στον κανόνα της συμπληρωματικότητας (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Η ικανότητά τους αυτή μειώνει την πιθανότητα λάθους σε 1/1.000.000 βάσεις, από 1/100.000 της απλής πολυμεράσης (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015).

Εκκινητές

Μία από τις βασικές λειτουργίες των εκκινητών (primers) είναι να οριοθετούν το τμήμα του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί (Wang and Seed, 2003). Ο λανθασμένος σχεδιασμός των εκκινητών μπορεί να οδηγήσει σε ενίσχυση τμημάτων DNA που διαφέρουν από τις αλληλουχίες-στόχους (Wang and Seed, 2003). Επομένως, ο σωστός σχεδιασμός είναι καθοριστικός για την παραγωγή των επιθυμητών προϊόντων (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Ο σχεδιασμός των εκκινητών επιτελείται με τη βοήθεια ειδικών λογισμικών, τα οποία στηρίζονται σε δεδομένα που έχουν καταχωρηθεί από ερευνητές (Wang and Seed, 2003; Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Στην περίπτωση όμως που αυτά τα λογισμικά δεν καλύπτουν τις ανάγκες του πειράματος, τότε οι ερευνητές καλούνται να σχεδιάσουν οι ίδιοι τους εκκινητές που θα χρησιμοποιήσουν (Wang and Seed, 2003; Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015).

Ο σχεδιασμός των εκκινητών γίνεται με βάση κάποιες αρχές. Το μήκος τους πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 18-30 βάσεων, καθώς οι κοντότεροι εκκινητές είναι επιρρεπείς στον μη ειδικό υβριδισμό, ενώ οι μεγαλύτερες αλληλουχίες ενδέχεται να οδηγήσουν σε σχηματισμό δευτερογενών δομών μέσα στην ίδια αλληλουχία (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Επίσης, πρέπει να μην είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό διμερών και άρα σε μειωμένη αποτελεσματικότητα της αντίδρασης (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Ένα ακόμη σημαντικό κριτήριο συνιστά η θερμοκρασία τήξης ή T_m , στην οποία το 50% των τμημάτων DNA απαντάται σε μονόκλωνη μορφή (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015). Η τιμή της T_m εξαρτάται από τη σύσταση του DNA και μπορεί να υπολογιστεί με τον παρακάτω τύπο:

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C) \quad \text{[Εξίσωση 1]}$$

Επιδιώκεται οι εκκινητές να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης, που να διαφέρουν κατά 3-5 °C κατά μέγιστο (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015).

Όσον αφορά το cDNA, μπορεί να συντεθεί από τυχαίους εκκινητές, ειδικούς εκκινητές ή ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες dT (Bustin *et al.*, 2005; Dorak, 2006). Αν και η χρήση τυχαίων εκκινητών προτείνεται όταν η αλληλουχία στόχος δεν εντοπίζεται σε πολλά αντίγραφα του RNA, προκαλεί την παραγωγή cDNA όχι μόνο από mRNA, αλλά και από rRNA και tRNA, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή ανεπιθύμητων προϊόντων κατά την PCR (Bustin *et al.*, 2005; Dorak, 2006). Ακόμη, ενδέχεται ο υβριδισμός των εκκινητών να πραγματοποιηθεί στο εσωτερικό της αλληλουχίας στόχου, παρεμποδίζοντας έτσι τον μετέπειτα πολλαπλασιασμό και εντοπισμό της (Dorak, 2006). Αντίθετα, οι εκκινητές που είναι εξειδικευμένοι προς τις

αλληλουχίες στόχους προσδίδουν μεγαλύτερη ακρίβεια (Bustin *et al.*, 2005). Η συγκεκριμένη μέθοδος προτιμάται όταν υπάρχει άφθονο RNA, καθώς κάθε γονίδιο-στόχος απαιτεί από μία ξεχωριστή αντίδραση (Bustin *et al.*, 2005; Dorak, 2006). Τα ολιγονουκλεοτίδια dT επιλέγονται περίπου στο 40% των περιπτώσεων, λόγω της ικανότητάς τους να στοχεύουν κυρίως στα mRNA (Bustin *et al.*, 2005). Ωστόσο, το γεγονός ότι προϋποθέτουν την ύπαρξη αλληλουχιών νουκλεοτιδίων αδενίνης στο άκρο της αλληλουχίας-στόχου περιορίζει τη χρήση τους, μιας και δεν έχουν όλα τα τμήματα RNA αυτό το χαρακτηριστικό ((Bustin *et al.*, 2005; Dorak, 2006).

Γενετικό υλικό

Έχει αναφερθεί ότι σε αρκετές περιπτώσεις τα πειράματα της real-time RT-PCR χαρακτηρίζονται από έλλειψη επαναληψιμότητας (Bustin *et al.*, 2005). Το πρόβλημα πηγάζει σε μεγάλο βαθμό από την παραλλακτικότητα της ποσότητας του RNA ή του DNA που χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία στις αντιδράσεις της αντίστροφης μεταγραφής και της PCR αντίστοιχα. Η παραλλακτικότητα αυτή αφενός οφείλεται στην φυσιολογική παραλλακτικότητα της περιεκτικότητας του RNA στα κύτταρα, καθώς και στην εγγενή αστάθειά του που το καθιστά ευαίσθητο στους εργαστηριακούς χειρισμούς (Bustin *et al.*, 2005; Huggett *et al.*, 2005). Αφετέρου η αιτία εντοπίζεται σε τυχόν πειραματικά σφάλματα κατά την εκχύλιση και την επεξεργασία του RNA, π.χ. στον μη αποτελεσματικό καθαρισμό του από ουσίες-αναστολείς της μεταγραφής (Huggett *et al.*, 2005; Dorak, 2006). Επιπλέον, πρέπει να συνυπολογιστεί ο ρόλος της αποτελεσματικότητας της αντίστροφης μεταγραφής, η οποία επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την αφθονία στην οποία υπάρχει η αλληλουχία από την οποία επιδιώκεται να συντεθεί το cDNA, καθώς και της PCR. (Huggett *et al.*, 2005; Dorak, 2006).

Πέρα από τον προσεκτικό πειραματικό σχεδιασμό και το σωστό χειρισμό του γενετικού υλικού, ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία αντιμετώπισης της παραλλακτικότητας της PCR είναι η κανονικοποίηση των δεδομένων. Η κανονικοποίηση των δεδομένων μπορεί να επιτευχθεί με βάση μεταβλητές όπως το μέγεθος του δείγματος ή τη συνολική ποσότητα RNA (Huggett *et al.*, 2005). Μία δημοφιλής μέθοδος κανονικοποίησης βασίζεται στην παράλληλη χρήση τμημάτων RNA που κωδικοποιούνται από γονίδια αναφοράς (reference genes) (Huggett *et al.*, 2005). Τα γονίδια αυτά εκφράζονται συνεχώς με υψηλό ρυθμό στα κύτταρα και συνήθως σχετίζονται με βασικές λειτουργίες του κυττάρου (Huggett *et al.*, 2005). Αυτά τα τμήματα mRNA υφίστανται την ίδια ακριβώς επεξεργασία με τα mRNA που προέρχονται από τα γονίδια-στόχους και λειτουργούν ως ένας τύπος εσωτερικού ελέγχου της διαδικασίας (Huggett *et al.*, 2005). Η επιλογή των γονιδίων γίνεται με τη χρήση ειδικών λογισμικών (Huggett *et al.*, 2005). Σε μία αντίδραση PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν ένα ή και περισσότερα γονίδια αναφοράς (Huggett *et al.*, 2005; Dorak, 2006).

Νουκλεοτίδια

Τα δεοξυριβονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται στην RT-PCR παρέχονται ως ένα ισομομοριακό μίγμα ATP, TTP, CTP και GTP, το οποίο απαιτείται να έχει συγκέντρωση από 80-800 μ M (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015).

Ρυθμιστικό διάλυμα και Mg²⁺

Το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί το pH σταθερό, στα βέλτιστα επίπεδα για την PCR, ενώ τα ιόντα Mg²⁺ αποτελούν απαραίτητο συμπράγοντα της Taq πολυμεράσης. (Παλαιολόγου, Κατσαρέλη and Παπανικολάου, 2015).

Η RT-qPCR εφαρμόζεται για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων μέσω της ποσοτικοποίησης του mRNA τους, το οποίο, ως ασταθέστερο από το DNA, χαρακτηρίζεται από χρόνο ημιζωής κατώτερο των δύο λεπτών (Ramamurthy *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2021). Η ανικανότητα των νεκρών κυττάρων να συνθέσουν mRNA, σε συνδυασμό με την ταχεία αποικοδόμησή του, συντελούν στην έντονη διαφοροποίηση της περιεκτικότητάς του στα ζωντανά και στα νεκρά κύτταρα (Gao *et al.*, 2021). Παρόμοια διαφοροποίηση κυριαρχεί και ως προς το rRNA, μιας και τα ζωντανά βακτήρια διατηρούν την ικανότητα σύνθεσής του, ενώ τα νεκρά όχι. Επομένως, η ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων μεταγραφόμενων γονιδίων, όπως το *relA* ή το *rpoS*, αλλά και του 16SrRNA παρέχουν στοιχεία για την βιωσιμότητα των βακτηρίων, ακόμα και αν αυτά δεν μπορούν πλέον να ανιχνευτούν στα καλλιεργητικά μέσα (Ramamurthy *et al.*, 2014; Ferro, Amorico and Deo, 2018; Gao *et al.*, 2021).

Επιπλέον, η RT-qPCR χρησιμοποιείται για την μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων (Oliver, 2010; Pinto, Santos and Chambel, 2015). Η γονιδιακή έκφραση αναφέρεται στη ροή της γενετικής πληροφορίας από τα γονίδια στις πρωτεΐνες (Tropp, 2014). Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν αυτή τη ροή ανάλογα με τις ανάγκες τους, ενεργοποιώντας ή απενεργοποιώντας την έκφραση ορισμένων γονιδίων, μέσω μορίων που ονομάζονται ενεργοποιητές και καταστολείς αντίστοιχα (Tropp, 2014). Όταν η έκφραση ενός γονιδίου επιταχύνεται, τότε αυτό υπόκειται σε θετική ρύθμιση (Tropp, 2014). Αντίθετα, όταν η ροή της γενετικής πληροφορίας επιβραδύνεται ή σταματά, τότε το γονίδιο δέχεται αρνητική ρύθμιση (Tropp, 2014). Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των βακτηρίων που βρίσκονται στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς επαγωγής τους στη συγκεκριμένη κατάσταση ληθάργου, την αντοχή των βακτηρίων αυτών στις καταπονήσεις, την παθογένειά τους (Oliver, 2010; Pinto, Santos and Chambel, 2015).

Συνοψίζοντας τα όσα αναλύθηκαν παραπάνω, η κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» συνιστά μία βακτηριακή συνθήκη μειωμένης ζωτικότητας, η οποία πιθανώς πυροδοτείται από την ύπαρξη εν δυνάμει βακτηριοκτόνων παραγόντων. Όσα βακτήρια εισέρχονται στην κατάσταση αυτή τροποποιούν τη φυσιολογία τους με συνέπεια να χάνουν την καλλιεργησιμότητά τους. Το γεγονός ότι τα ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια δεν ανιχνεύονται μέσω των καλλιεργητικών τεχνικών οδηγεί σε συστηματική υποεκτίμηση του βακτηριακού φορτίου κατά τον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων. Αν μάλιστα ληφθεί υπόψιν πως όταν οι συνθήκες ξαναγίνουν ευνοϊκές, τα βακτήρια δύνανται να ανακάμψουν και ανακτήσουν τη βλαστική τους μορφή, την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους και, στην περίπτωση που πρόκειται για παθογόνα, τη μολυσματική τους δράση γίνεται προφανές ότι τα ζώντα αλλά μη

καλλιεργήσιμα βακτήρια διακυβεύουν την υγιεινή των τροφίμων και θέτουν σε κίνδυνο την ασφάλεια των καταναλωτών. Επομένως, ανάπτυξη και η υιοθέτηση εναλλακτικών μεθόδων μικροβιακής ανάλυσης κρίνονται απαραίτητες για τη διασφάλιση της υγιεινής των τροφίμων.

4. Απολυμαντικά στη βιομηχανία τροφίμων

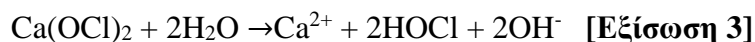
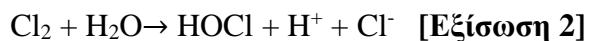
Σύμφωνα με τη Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας, τα απολυμαντικά ορίζονται ως μία κατηγορία ενώσεων που προστίθενται σε υδατικά διαλύματα και χρησιμοποιούνται με σκοπό την εξάλειψη ή τη μείωση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα, κατά το πλύσιμο και τις λοιπές κατεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την παραγωγή και την επεξεργασία αυτών (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009). Μάλιστα, η τακτική και ορθή εφαρμογή των απολυμαντικών συνιστά ένα από τα σημαντικότερα μέτρα καταπολέμησης των περιβαλλοντικών παθογόνων, όπως η *L. monocytogenes*, τα οποία, όπως επισημάνθηκε παραπάνω, είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν διαφορετικά (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009; Gao and Liu, 2014).

Τα απολυμαντικά που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες τροφίμων κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες: σε αυτά που βασίζονται στο χλώριο και σε αυτά που δεν βασίζονται στο χλώριο (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009). Στα απολυμαντικά που βασίζονται στο χλώριο περιλαμβάνονται το όξινο διάλυμα χλωριώδους νατρίου, οι Ν-χλωραμίνες, το διοξείδιο του χλωρίου καθώς και το υποχλωριώδες οξύ και τα παράγωγά του, όπως το αέριο του χλωρίου, τα άλατα υποχλωριώδους νατρίου και ασβέστιο και το υποχλωριώδες ιόν (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009). Από την άλλη πλευρά, μερικά απολυμαντικά που δεν έχουν ως βάση το χλώριο είναι τα άλατα του τεταρτοταγούς αμμωνίου, το όζον, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και τα υπεροξυοξέα (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009). Αν και τα περισσότερα απολυμαντικά λειτουργούν ως οξειδωτικά και χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα δράσης, διαφέρουν ως προς την αποτελεσματικότητά τους καθώς και ως προς την οξειδωτική τους δράση (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009). Γενικά, επιδιώκεται να επιλέγονται απολυμαντικά με όσο το δυνατόν ευρύτερο φάσμα δράσης και μικρότερη παραγωγή τοξικών παραπροϊόντων (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009).

4.1. Χλωριούχα απολυμαντικά

Τα απολυμαντικά που έχουν ως βάση το χλώριο είναι από τα πιο διαδεδομένα (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009; Luo *et al.*, 2018; Afari, Liu and Hung, 2019). Η εφαρμογή του χλωρίου στη γραμμή επεξεργασίας τροφίμων ή στο ευρύτερο

περιβάλλον της βιομηχανίας πραγματοποιείται συνήθως έπειτα από τη διάλυσή στο νερό, στο οποίο προστίθεται είτε ως αέριο, είτε με την μορφή των μετά νατρίου ή ασβεστίου αλάτων του υποχλωριώδους οξέος (Harp, 2002; European Commission, 2007; Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009). Έτσι λαμβάνουν χώρα οι ανάλογες αντιδράσεις (Harp, 2002; Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009):



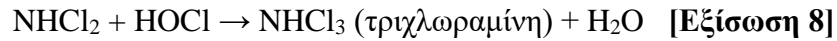
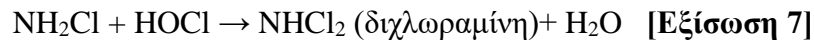
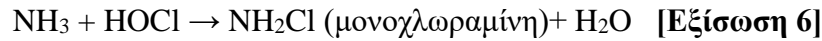
Το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) είναι μια ενεργός μορφή του χλωρίου, που παράγεται κατά την επαφή του αέριου χλωρίου, ή των αλάτων του, με το νερό (Harp, 2002; Robbins *et al.*, 2005). Εκτός το υποχλωριώδες οξύ, παράλληλα σχηματίζεται και το υποχλωριώδες ιόν (OCl⁻), το οποίο βρίσκεται σε ισορροπία με το υποχλωριώδες οξύ, ανάλογα με το pH (European Commission, 2007):



Έτσι σε ένα ουδέτερο υδατικό διάλυμα, με pH≈7.4 τα δύο προϊόντα συνυπάρχουν σχεδόν ισόποσα (Harp, 2002). Καθώς όμως η αλκαλικότητα αυξάνεται, η ισορροπία στρέφεται προς την παραγωγή του υποχλωριώδους ιόντος ενώ το υποχλωριώδες οξύ παραγκωνίζεται (European Commission, 2007; Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009). Αντίθετα σε pH<7 κυριαρχεί το υποχλωριώδες οξύ, το οποίο είναι και το πιο δραστικό αντιμικροβιακό από τα δύο (Harp, 2002; Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009). Βέβαια η υπέρμετρη μείωση του pH πρέπει να αποφεύγεται, διότι σε τιμές μικρότερες του 5 εννοείται η παραγωγή αέριου χλωρίου, το οποίο είναι τοξικό (European Commission, 2007; Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009; Luo *et al.*, 2018).

Το είδος των ενώσεων που παράγονται από την επαφή του υποχλωριώδους οξέος και των αλάτων του με το νερό καθορίζεται και από την παρουσία οργανικής ύλης σε αυτό (Afari, Liu and Hung, 2019). Έχει παρατηρηθεί ότι τα χλωριούχα απολυμαντικά έχουν την τάση να αντιδρούν με τις οργανικές ουσίες και να σχηματίζουν παραπροϊόντα (DBPs) (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009). Η δημιουργία των DBPs επιτελείται μέσω ενός πολύπλοκου χημικού μηχανισμού, που περιλαμβάνει αντιδράσεις αλογόνωσης και οξειδωσης (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009). Οι αντιδράσεις αλογόνωσης, που είναι οι επικρατέστερες, καταλήγουν στην παραγωγή οργανικών μορίων όπως τα τριαλομεθάνια (CHX₃), με πιο δημοφιλές το χλωροφόρμιο (CHCl₃) και τα αλοοξικά οξέα (HAAs), τα οποία στην πλειονότητά τους είναι τοξικά ή καρκινογόνα (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009; Luo *et al.*, 2018).

Από την άλλη πλευρά, από την οξείδωση των οργανικών μορίων προκύπτουν αλδεΐδες, κετόνες και καρβοξυλικά οξέα, ενώ υπό την παρουσία οργανικών αμινών ή αμμωνίας, παράγονται χλωραμίνες, οι οποίες διαθέτουν απολυμαντική ικανότητα, αν και είναι λιγότερο δραστικές από το υποχλωριώδες οξύ (Harp, 2002; Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009).



Το ποσό του χλωρίου που δεσμεύεται από την οργανική ύλη ονομάζεται «δεσμευμένο χλώριο» και διαθέτει μικρότερη απολυμαντική ικανότητα συγκριτικά με τα μη δεσμευμένα μόρια του υποχλωριώδους οξέος και τα υποχλωριώδη ιόντα που συνιστούν το «ελεύθερο χλώριο» (Oliver, Dagher and Linden, 2005; Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009; Afari, Liu and Hung, 2019).

Οι ενώσεις του υποχλωριώδους οξέος βασίζονται στην απολυμαντική τους ικανότητα στην οξειδωτική τους δράση, καθώς διαταράσσουν το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των βακτηριακών κυττάρων, με συνέπεια να επιφέρουν βλάβες στις μεμβράνες, στα νουκλεϊκά οξέα, στις πρωτεΐνες, στα αμινοξέα, στα λιπίδια και στο κυτταρικό τοίχωμά, θανατώνοντάς τα (Highmore *et al.*, 2018; Cheswick *et al.*, 2020; Gu *et al.*, 2020; S. Jia *et al.*, 2020). Συγκεκριμένα, οι Denyer and Stewart (1998) αναφέρουν την οξείδωση των ενζύμων που περιέχουν ομάδες θειολών και εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ή στο κυτταρικό τοίχωμα, ενώ οι Bucur *et al.*, (2018) τονίζουν οξείδωση των θειούχων αμινοξέων μεθειονίνη και κυστεΐνη. Στη μελέτη των Highmore *et al.*, το 2018, υποστηρίζεται πως το χλώριο παρεμβαίνει, επιπροσθέτως, στην ικανότητα διαμεμβρανικής μεταφοράς και στην αντιγραφή του DNA καθώς και ότι προκαλεί απώλεια ATP στο κύτταρο.

Τα χλωριούχα απολυμαντικά είναι αποτελεσματικά έναντι ενός ευρέος φάσματος βακτηρίων, είναι εύχρηστα και έχουν χαμηλό κόστος (Meireles, Giaouris and Simões, 2016). Για το λόγο αυτό αξιοποιούνται σε ποικίλες εφαρμογές, όπως για την απολύμανση του πόσιμου νερού (Lin *et al.*, 2017a). Συνήθως, το χλώριο προστίθεται στο νερό σε συγκεντρώσεις μερικών mg/L, με στόχο τη διατήρηση του πληθυσμού των υδατογενών βακτηρίων σε επίπεδα μικρότερα των 100 CFU/mL (Lin *et al.*, 2017a). Παράλληλα, επιδιώκεται η παραμονή 0,2-0,5 mg/L υπολειμματικού ενεργού χλωρίου στο νερό, ώστε να αποτραπεί τυχόν μελλοντική βακτηριακή ανάπτυξη στο δίκτυο διανομής (Lin *et al.*, 2017a). Όπου είναι απαραίτητο, το πόσιμο νερό εμπλουτίζεται με επιπλέον ποσότητα χλωρίου έως ότου αποκτήσει συγκέντρωση έως 200 mg/L, προκειμένου να μειώσει το βακτηριακό φορτίο στο νερό πλυσίματος των φρέσκων φρούτων και λαχανικών, αποτρέποντας τη μεταξύ τους επιμόλυνση (Meireles, Giaouris and Simões, 2016). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εφαρμογή του πυκνού χλωριούχου διαλύματος στην καταπολέμηση των περιβαλλοντικών παθογόνων, καθώς συνιστά ένα από τα πιο διαδεδομένα μέσα εξυγίανσης

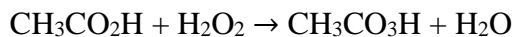
των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, κατά τις διαδικασίες καθαρισμού και απολύμανσης (C&D) μονάδων επεξεργασίας πουλερικών, ερυθρού κρέατος, αλιευμάτων και οπωροκηπευτικών (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009; Overney *et al.*, 2017). Όσον αφορά τη *L. monocytogenes*, το χλώριο εφαρμόζεται συχνά για την καταπολέμησή της κατά το πλύσιμο των νωπών οπωροκηπευτικών και των εγκαταστάσεων παραγωγής και επεξεργασίας των τροφίμων στα οποία εντοπίζεται συχνά, όπως τα κρεατοσκευάσματα (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009; Gao and Liu, 2014; Meireles, Giaouris and Simões, 2016; Overney *et al.*, 2017; Highmore *et al.*, 2018; Afari, Liu and Hung, 2019).

Αν και το διάλυμα που επιστρατεύεται για την απολύμανση των επιφανειών είναι αρκετά ισχυρό, ενδέχεται να αποδειχθεί ανεπαρκές στην περίπτωση που το pH είναι ιδιαίτερα υψηλό, το βακτηριακό φορτίο είναι μεγάλο και αν οι επιφάνειες δεν έχουν καθαριστεί επαρκώς, με συνέπεια να υπάρχουν υπολείμματα τροφίμων (Luo *et al.*, 2018; Afari, Liu and Hung, 2019). Το γεγονός αυτό μπορεί να επιφέρει την έκθεση των βακτηρίων της *Listeria* σε υποθανάτιες δόσεις της δραστικής ουσίας και επομένως όχι μόνο να μην τη θανατώσει, αλλά, πιθανώς, να επάγει την ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Overney *et al.*, 2017; Bansal *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2018). Ένα ακόμα θέμα που αφορά την ασφάλεια είναι το ενδεχόμενο οι ενεργές ουσίες του χλωρίου να προξενούν την μετάπτωση των βακτηρίων της *L. monocytogenes* στην κατάσταση ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα, που δύναται να προκαλέσει υποεκτίμηση της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης. Πράγματι, μια σειρά από πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν την ικανότητα των χλωριούχων απολυμαντικών να επάγουν την ικανότητα «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» σε βακτήρια όπως τα *E. coli*, *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes* (Oliver, Dagher and Linden, 2005; Lin *et al.*, 2017b; Overney *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Highmore *et al.*, 2018; Afari, Liu and Hung, 2019; Ye *et al.*, 2020). Ωστόσο, η περίπτωση της *L. monocytogenes* δεν έχει διερευνηθεί ακόμα ευρέως.

4.2. Υπεροξικό οξύ

Αρκετά από τα απολυμαντικά που δε βασίζονται στο χλώριο, έχουν ως βάση το οξυγόνο (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το όζον, τα υπεροξειδία και τα υπεροξοξέα (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009). Τόσο τα υπεροξειδία, όσο και τα υπεροξοξέα ανήκουν στις ενώσεις του υπεροξειδίου, που σημαίνει ότι περιέχουν τουλάχιστον δύο άτομα οξυγόνου ενωμένα με ομοιοπολικό δεσμό (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009). Το υπεροξικό οξύ (PAA) ή υπεροξειδίο του οξικού οξέος ($\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$), είναι μία οργανική απολυμαντική ένωση, που συντίθεται μέσω της αντίδρασης του οξικού οξέος ή του άνυδρου οξικού οξέος με το υπεροξειδίο του υδρογόνου, χρησιμοποιώντας

το θειικό οξύ ως καταλύτη, σύμφωνα με την αντίδραση (Kitis, 2004; Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009; Gawande *et al.*, 2013; Luukkonen and Pehkonen, 2017; Ao *et al.*, 2021):



Πρόκειται για ένα ισχυρό οξειδωτικό, με πρότυπο δυναμικό αναγωγής $E^0 = 1.96 \text{ V}$ (Gawande *et al.*, 2013; Ao *et al.*, 2021). Όπως και οι υπόλοιπες ενώσεις που περιέχουν ρίζες υπεροξειδίου, είναι θερμοδυναμικά ασταθές, γεγονός που συντελεί στην εύκολη διάσπασή του είτε μέσω υδρόλυσης, είτε μέσω αποικοδόμησης (Kitis, 2004). Η αποικοδόμηση του υπεροξικού οξέος σε οξικό οξύ και οξυγόνο συμβαίνει αυθόρμητα, ενώ η αντίδραση επιταχύνεται όταν η θερμοκρασία ξεπεράσει τους 30° C (Ao *et al.*, 2021). Στο εύρος $\text{pH} = 5,5-8,2$ το υπεροξικό οξύ αποδιατάσσεται ως ανωτέρω, αλλά αν το pH ξεπεράσει την τιμή $\text{pK}_a = 8,2$ το οξύ υφίσταται πέρα από την αποικοδόμηση και υδρόλυση, παράγοντας οξικό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου (Kitis, 2004; Ao *et al.*, 2021).

Το υπεροξικό οξύ διαθέτει έντονη αντιμικροβιακή ικανότητα, καθώς θανατώνει βακτήρια, σπόρια βακτηρίων, ιούς και πρωτόζωα με την εξής σειρά αποτελεσματικότητας: βακτήρια > ιοί > βακτηριακά σπόρια > κύστες πρωτόζωων (Kitis, 2004). Θεωρείται πιθανό, ότι το υπεροξικό οξύ ασκεί την οξειδωτική του δράση μέσω της πρωτονιομένης μορφής του, PAA^0 , η οποία κυριαρχεί σε τιμές $\text{pH} < 8,2$ και λειτουργεί ως βιοκτόνο, έναντι της μη πρωτονιομένης μορφής PAA^- , που δε δρα ως αντιμικροβιακό (Ao *et al.*, 2021). Καθώς τα οργανικά υπεροξοξέα τείνουν να επιτίθονται σε θέσεις που είναι πλούσιες σε ηλεκτρόνια, εικάζεται ότι το PAA^0 επιδρά στις σουλφυδρυλικές και στις δισουλφιδικές ομάδες των πρωτεϊνών, των αμινοξέων και των ενζύμων, οξειδώνοντάς τις και καθιστώντας τα μόρια που τις περιέχουν μη λειτουργικά (Kitis, 2004; Gu *et al.*, 2020; Ao *et al.*, 2021). Επιπροσθέτως, το υπεροξικό οξύ διαταράσσει το χημικό και ωσμωτικό δυναμικό των βακτηρίων, μέσω της θραύσης των κυτταρικών τους τοιχωμάτων (Ao *et al.*, 2021). Αν και ο τρόπος με τον οποίο συμβαίνει η θραύση δεν είναι απολύτως γνωστός, είναι πιθανό ότι αυτή επιτυγχάνεται εν μέρει μέσω της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών της πλασματικής μεμβράνης (Kitis, 2004).

Η βιοκτόνος δράση του υπεροξικού οξέος στηρίζεται επίσης στην απελευθέρωση ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), όπως ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες δρουν οξειδώνοντας την κυτταροπλασματική μεμβράνη των βακτηρίων και μόρια όπως το DNA (Kitis, 2004; Gawande *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2020). Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης του υπεροξικού οξέος παρουσιάζει ομοιότητες με αυτόν του υπεροξειδίου του υδρογόνου, το PAA έχει έναν πρόσθετο μηχανισμό δράσης. Αυτός προκύπτει από το γεγονός ότι το υπεροξικό οξύ είναι ένα οργανικό οξύ, γεγονός που του επιτρέπει να διεισδύει στο εσωτερικό των κυττάρων και να ασκεί τον οξειδωτικό του ρόλο όχι μόνο από έξω προς τα μέσα, αλλά και αντίρροπα (Gawande *et al.*, 2013; Ao *et al.*, 2021). Έτσι, το PAA δύναται να προκαλέσει βλάβες σε ένζυμα που συμμετέχουν σε βασικά μεταβολικά μονοπάτια ή να εμπλακεί στην ακεραιότητα και στη μεταφορική λειτουργία πολλών μεμβρανών (Gawande *et al.*, 2013). Σημαντικό ρόλο στη

βακτηριακή αδρανοποίηση κατέχει και η απενεργοποίηση του ενζύμου καταλάση, που προστατεύει το βακτήριο από την τοξική επίδραση των ελεύθερων ριζών (Kitis, 2004; Ao *et al.*, 2021).

Η αποτελεσματικότητα του υπεροξικού οξέος το καθιστά ιδιαίτερα δημοφιλές στη βιομηχανία τροφίμων, στην οποία διατίθεται εμπορικά με τη μορφή ενός πυκνού, ισόποσου μίγματος οξικού οξέος, υπεροξειδίου του υδρογόνου, υπεροξικού οξέος και νερού, με συγκέντρωση σε υπεροξικό οξύ από 10-15% (Kitis, 2004). Καθώς το μίγμα είναι επιρρεπές στην αποικοδόμηση, σταθεροποιείται με ενώσεις όπως πολυφωσφορικά παράγωγα αλκαλίων, 1-υδροξυαιθυλιδενό-1,1-διφωσφονικό οξύ (HEDP), διπικολινικό οξύ (DPA) ή κινολίνη (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009; Gawande *et al.*, 2013; Luukkonen and Pehkonen, 2017; Ao *et al.*, 2021). Οι εφαρμογές του υπεροξικού οξέος περιλαμβάνουν την απολύμανση μονάδων παραγωγής και επεξεργασίας κρέατος, πουλερικών, ιχθυηρών και φρούτων και λαχανικών (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009; Gawande *et al.*, 2013). Ακόμη, επιστρατεύεται για την απολύμανση παστεριωτήρων και άλλων ειδών εξοπλισμού σε συστήματα clean in place σε ζυθοποιεία, οινοποιεία και μονάδες παραγωγής αναψυκτικών, ενώ προστίθεται στο νερό πλυσίματος των φρέσκων οπωροκηπευτικών με στόχο την καταπολέμηση των βακτηρίων και των μυκήτων (Gawande *et al.*, 2013; Luukkonen and Pehkonen, 2017). Πριν τη χρήση το πυκνό διάλυμα υπεροξικού οξέος διαλύεται σε πόσιμο νερό, προκειμένου να αποκτήσει την επιθυμητή συγκέντρωση (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009). Ο FDA ορίζει την μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση υπεροξικού οξέος για χρήση σε ελαφρώς επεξεργασμένα φρούτα και λαχανικά τα 80 mg/L (Lee *et al.*, 2020). Συνήθως, το διάλυμα PAA που χρησιμοποιείται για την απολύμανση επιφανειών του εξοπλισμού είναι ισχυρότερο, με συγκέντρωση που κυμαίνεται από 80-200 mg/L (Kitis, 2004; Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009; Gawande *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017; Luukkonen and Pehkonen, 2017; Gu *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2020).

Η χρήση του υπεροξικού οξέος έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Το υπεροξικό οξύ διατηρεί την αποτελεσματικότητά του τόσο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, όσο και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Gawande *et al.*, 2013). Κατά την επαφή του με το νερό, αποικοδομείται πλήρως σε οξικό οξύ, υπεροξειδίο του υδρογόνου, οξυγόνο και νερό, παράγοντας ελάχιστα ή μηδενικά αλογονωμένα παραπροϊόντα απολύμανσης, ακόμα και υπό την παρουσία οργανικής ύλης (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009; Gawande *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2020; Ao *et al.*, 2021). Το γεγονός ότι δεν παράγει τοξικά ή καρκινογόνα παραπροϊόντα συνιστά και το κυριότερο πλεονέκτημά του συγκριτικά με τα απολυμαντικά που έχουν ως βάση το χλώριο, διότι σημαίνει πως μπορεί να εφαρμοστεί για την απολύμανση επιφανειών χωρίς μετέπειτα ξέπλυμα, με αποτέλεσμα να εξοικονομούνται πόροι και χρόνος (Gawande *et al.*, 2013; Luukkonen and Pehkonen, 2017; Lee *et al.*, 2020).

Από την άλλη πλευρά, το υπεροξικό οξύ είναι ιδιαίτερος διαβρωτικό, επομένως συστήνεται να αποφεύγεται η επαφή του με μέταλλα πέραν του ανοξειδωτού χάλυβα και του

επικασσιτερωμένου σιδήρου (Kitis, 2004; Luukkonen and Pehkonen, 2017; Ao *et al.*, 2021). Επιπροσθέτως, είναι θερμοδυναμικά ασταθές και εύφλεκτο (Kitis, 2004; Luukkonen and Pehkonen, 2017; World Health Organization, 2018). Η τάση του υπεροξικού οξέος να αποικοδομείται σε οξικό οξύ θέτει και ένα ζήτημα μικροβιακής ασφάλειας, καθώς το εν λόγω οργανικό οξύ δύναται να λειτουργήσει ως τροφή για τους παθογόνους και τους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς και να προωθήσει την επανανάπτυξή τους (Kitis, 2004).

Το υπεροξικό οξύ, ανά τα χρόνια, έχει επιδείξει βιοκτόνο δράση έναντι πλήθους βακτηρίων, περιλαμβανομένων των *Bacillus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Enterococcus faecium*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* κ.α (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009; Gawande *et al.*, 2013). Ενδεικτικά, οι Gu *et al.* (2020) αναφέρουν την ύπαρξη, κυρίως θετικών κατά Gram, σπορογόνων βακτηρίων που αντιστέκονται τόσο στη δράση του χλωρίου όσο και στο υπεροξικό οξύ καθώς και την παρουσία βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* που ενώ θανατώθηκαν από το χλώριο, αποδείχθηκαν ανθεκτικά στο PAA. Επισημαίνεται, ότι στην ίδια έρευνα πιθανολογείται πως παθογόνα βακτήρια των ειδών *E. coli*, *L. monocytogenes* και *S. enterica* μετέπεσαν στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες που προκλήθηκε λόγω του απολυμαντικού (Gu *et al.*, 2020).

Εν κατακλείδι, το χλώριο και το υπεροξικό οξύ είναι απολυμαντικά που χρησιμοποιούνται ευρέως για την εξυγίανση των μονάδων παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων. Αν και, καθότι οξειδωτικά, ο μηχανισμός δράσης τους είναι παρόμοιος, το χλώριο θεωρείται το ισχυρότερο βιοκτόνο. (Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2009). Βέβαια, η τάση του να αντιδρά με τις αζωτούχες οργανικές ενώσεις και να σχηματίζει καρκινογόνα παραπροϊόντα δυσχεραίνει τη χρήση του. Αντίθετα το υπεροξικό οξύ αποικοδομείται πλήρως στα συστατικά του, κανένα εκ των οποίων δεν είναι τοξικό. Με αφορμή μια σειρά από μελέτες που καταδεικνύουν την ύπαρξη βακτηρίων, ανθεκτικών στα παραπάνω απολυμαντικά και συγκεκριμένα την πιθανότητα επαγωγής των στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα», η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στη διερεύνηση της επαγωγής του βακτηρίου *L. monocytogenes* στην εν λόγω κατάσταση ληθάργου, εξ' αιτίας της κατεργασίας της με άλας του υποχλωριώδους νατρίου και με εμπορικό σκεύασμα υπεροξικού οξέος.

Υπόθεση εργασίας

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της στοχαστικής επαγωγής των βακτηριακών κυττάρων στην κατάσταση «ζώντα Αλλά Μη Καλλιεργήσιμα», υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης και καταπόνησης λιμού και η μελέτη των βιολογικών μηχανισμών που συμμετέχουν σε αυτήν.

Για το σκοπό αυτό, πληθυσμός 10^7 CFU/mL του στελέχους Scott A του βακτηρίου *L. monocytogenes* επωάζεται σε δύο διαφορετικά διαλύματα απολυμαντικών: σε ένα διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου και σε ένα διάλυμα υπεροξικού οξέος σε Ringer, 0.5, 5, 10, 20, 30 και 40 ppm στους 20 °C και στους 4 °C. Έτσι, τα βακτήρια υφίστανται οξειδωτική καταπόνηση, αλλά και καταπόνηση λιμού, καθώς τα διαλύματα απολυμαντικών δεν περιέχουν θρεπτικά

συστατικά. Σε καθορισμένες χρονικές στιγμές έως και το πέρας του διαστήματος καταπόνησης, επιτελούνται δειγματοληψίες, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε ένα γενικό (TSA-Ye) και σε ένα επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα (TSA-Ye + NaCl) και επωάζονται στους 37 °C για δύο και για πέντε ημέρες. Από την παρατήρηση των τρυβλίων προκύπτει η απεικόνιση της κινητικής θανάτωσης των βακτηρίων, ενώ από τη συγκριτική αξιολόγηση των τρυβλίων που περιέχουν TSA-Ye και TSA-Ye + NaCl υπολογίζεται ο υποθανάτιος τραυματισμός.

Η επαγωγή της κατάστασης «ζώντα Αλλά Μη Καλλιεργήσιμα» εξετάστηκε μέσω της παράλληλης αξιολόγησης της καλλιεργησιμότητας και της μεταβολικής ενεργότητας των κυττάρων. Για την επίτευξη αυτού, 10^9 CFU/mL του βακτηριακού στελέχους Scott A επωάζονται σε θερμοκρασία 20 °C σε διαλύματα υπεροξικού οξέος, συγκεντρώσεων 20, 30 και 40 ppm. Ακολουθεί επίστρωση σε τρυβλία TSA-Ye και TSA-Ye+ 5%NaCl, παράλληλη χρώση με τις φθορίζουσες χρωστικές cFDA και PI και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού, προκειμένου να προσδιοριστεί το ποσοστό των ζωντανών, νεκρών και τραυματισμένων βακτηρίων. Τα κύτταρα που διατηρούν τη μεταβολική τους ενεργότητα (CFDA+/PI-), αλλά δεν παράγουν αποικίες χαρακτηρίζονται ως «ζώντα Αλλά Μη Καλλιεργήσιμα».

Η αξιολόγηση της ανάκαμψης των τραυματισμένων και των VBNC βακτηρίων, μετά το πέρας της καταπόνησης. Η ικανότητα της ανάκαμψης των κυττάρων εξετάστηκε σε TSA-Ye, σε σταθερή θερμοκρασία (37 °C), για συνολικό διάστημα 6 ωρών.

Τέλος, εξετάζονται οι μοριακοί μηχανισμοί που συνδέονται με την απόκριση του βακτηρίου *L. monocytogenes* στην καταπόνηση και με την επαγωγή του στην κατάσταση VBNC. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της μελέτης της γονιδιακής έκφρασης των βακτηρίων με RT-qPCR. Πριν από την έναρξη της διαδικασίας της RT-qPCR, ο βακτηριακός πληθυσμός των 10^9 CFU/mL επωάζεται σε 6 mL διαλύματος υπεροξικού οξέος για τρεις ώρες και οι δειγματοληψίες λαμβάνουν χώρα κάθε μία ώρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως log₂ της μεταβολής της έκφρασης.

Στοιχείο πρωτοτυπίας της παρούσας έρευνας είναι ότι η μελέτη των βακτηρίων δεν επιτελείται μόνο σε επίπεδο πληθυσμού, αλλά και σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Επιπλέον, το γεγονός ότι εστιάζει στο τροφιμογενές, παθογόνο *L. monocytogenes* αναμένεται να την καταστήσει άξια προσθήκη στην ήδη υπάρχουσα καταγεγραμμένη έρευνα, η οποία μέχρι σήμερα αφορούσε, κατά κύριο λόγο, άλλα βακτηριακά είδη και γένη

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Υλικά και εξοπλισμός

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Σκανδάμη. Ο εξοπλισμός, οι μικροοργανισμοί, τα αντιδραστήρια και τα λοιπά αναλώσιμα υλικά

που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα που περιγράφονται στη συγκεκριμένη μελέτη αποτελούν ιδιοκτησία του εργαστηρίου.

1.1.Στελέχη μικροοργανισμών και φύλαξή τους

Στα πειράματα της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του βακτηρίου *L. monocytogenes* και συγκεκριμένα το στέλεχος Scott A το οποίο ανήκει στον ορότυπο 4b. Τα εν λόγω κύτταρα φυλάσσονταν μέσα σε διάλυμα που θρεπτικού μέσου Tryptone Soy Broth (Oxoid CM0129), εμπλουτισμένο με εκχύλισμα ζύμης (Oxoid LP0021) σε περιεκτικότητα 0,6% και γλυκερόλης και διατηρούνταν υπό κατάψυξη στους -20 °C (reference stock).

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της μελέτης προέρχονταν από ένα νέο stock. Για την παρασκευή του, αρχικά έγιναν δύο διαδοχικές ανανεώσεις ώστε τα κύτταρα να ανακτήσουν τη φυσιολογική κατάσταση που είχαν πριν από την κατάψυξη. Για την πρώτη ανανέωση, λήφθηκαν 100 μL από το reference stock και επαναιωρήθηκαν σε 10 mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου TSB, ενισχυμένου με 0,6% εκχύλισμα ζύμης (TSB-Ye). Ακολούθησε καλή ανάδευση με vortex και επώαση στους 30 °C για 24 h. Μετά το πέρας των 24 ωρών, 100 μL από το διάλυμα της πρώτης ανανέωσης προστέθηκαν σε 10 mL αποστειρωμένου TSB-Ye και τα βακτήρια επώαστηκαν στους 30 °C για 18 h. Ακολούθως, με τη χρήση κρίκου εμβολιασμού (loop), έγινε γραμμική εξάπλωση (streaking) σε τρυβλία petri με Tryptone Soy Agar (Oxoid, CM0131) εμπλουτισμένο με 0,6% εκχύλισμα ζύμης (TSA-Ye), με σκοπό τη δημιουργία μεμονωμένων αποικιών. Τα τρυβλία παρέμεναν υπό συντήρηση στους 4 °C για μέχρι τρεις εβδομάδες, όποτε και λάμβανε χώρα η παρασκευή νέου stock από το stock αναφοράς.

1.2.Θρεπτικά υποστρώματα

Γενικά υποστρώματα

Τα γενικά θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το TSB και το TSA, τα οποία ήταν ενισχυμένα με εκχύλισμα ζύμης σε περιεκτικότητα 0.6%. Όλα τα υποστρώματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των προμηθευτών και, μετά την ενυδάτωσή τους με απιονισμένο νερό, αποστειρώθηκαν στους 121°C για 15 λεπτά.

Επιλεκτικά υποστρώματα ανάπτυξης

Το ποσοστό των βακτηρίων που είχαν τραυματιστεί από τη δράση των απολυμαντικών προσδιορίστηκε με την παράλληλη καλλιέργειά τους σε ένα γενικό (TSA-Ye) και σε ένα επιλεκτικό θρεπτικό υποστρώμα, το οποίο είχε παρασκευαστεί από TSA-Ye στο οποίο είχε προστεθεί 5% w/v NaCl. Η συγκεκριμένη περιεκτικότητα είχε βρεθεί από προηγούμενα πειράματα ότι αντιστοιχεί στη μέγιστη συγκέντρωση άλατος που δε δρα ανασταλτικά ως προς την ανάπτυξη των υγιών κυττάρων και παράλληλα δεν επιτρέπει την ανάπτυξη τραυματισμένων κυττάρων. Η παρασκευή ενός λίτρου του επιλεκτικού υποστρώματος έγινε με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε και στην περίπτωση του γενικού υποστρώματος με την διαφορά ότι μετά την ζύγιση του θρεπτικού υποστρώματος TSA-Ye, προστέθηκαν και 50g NaCl. Ακολούθησε η ενυδάτωση και η αποστείρωση του υλικού στους 121°C για 15 λεπτά.

Στην περίπτωση που υπήρχαν αμφιβολίες σχετικά με την καθαρότητα των stock, των εμβολίων ή τη φύση των κάποιων αποικίας, πραγματοποιούταν ταυτοποίηση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στο επιλεκτικό χρωμογόνο μέσο καλλιέργειας ALOA (Oxoid, CM1084), στο οποίο το βακτήριο σχηματίζει χαρακτηριστικές πράσινες αποικίες. Η παρασκευή του επιλεκτικού υποστρώματος έγινε με τον τρόπο που συνιστάται από την εταιρεία και η αποστείρωσή του έγινε στους 121°C για 15 λεπτά. Τα τρυβλία του ALOA επώαστηκαν μετά τον εμβολιασμό τους για δυο ημέρες στους 37°C.

Μετά την αποστείρωση των υποστρωμάτων (άγαρ), τα υλικά επιστρώθηκαν σε τρυβλία petri. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες, μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar) και ο εισαγόμενος όγκος τυποποιήθηκε στα 12,5 ml ανά τρυβλίο. Τα τρυβλία στη συνέχεια έμειναν ανοιχτά μέχρι να πήξουν και να απομακρυνθεί η υγρασία. Σε περίπτωση μη άμεσης χρήσης τους, αποθηκεύτηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 4-8°C, προκειμένου να αποφευχθεί η ανάπτυξη μικροοργανισμών στο εσωτερικό τους.

1.3. Διαλύματα απολυμαντικών

Διάλυμα υπεροξικού οξέος (PAA)

Η παρασκευή των διαλυμάτων του υπεροξικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα (working solutions- WS) έγινε με τη χρήση ενός πυκνού διαλύματος PAA (stock solution-SS). Για το σκοπό αυτό, 50 μL εμπορικού διαλύματος PAA με 15% καθαρότητα (Applichem 143495) προστέθηκαν σε 50 mL ισοτονικού διαλύματος Ringer, το οποίο είχε προηγουμένως παρασκευαστεί μέσω της διάλυσης μιας ταμπλέτας Ringer 1/4 (MilliporeSigma 1.15525) ανά 1 L απιονισμένου ύδατος. Έτσι, προέκυψε ένα διάλυμα υπεροξικού οξέος με συγκέντρωση 150 ppm. Το διάλυμα αυτό αραιώθηκε με κατάλληλους όγκους απιονισμένου νερού, ώστε να δημιουργηθούν διαλύματα PAA με συγκεντρώσεις 0.5 (pH 6.93), 5 (pH 4.96), 10 (pH 4.50), 20 (pH 4.25), 30 (pH 4.10) και 40 (pH 3.98) ppm. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων μετρήθηκε πριν από κάθε πείραμα με τη βοήθεια χρωματομετρικών λωρίδων (peracetic acid test strips; Merck).

Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (SH)

Για την παρασκευή του πυκνού διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου, 100 μL εμπορικού SH με 12% καθαρότητα (MilliporeSigma 1.05614) διαλύθηκαν σε 100 mL ισότονου διαλύματος Ringer, καταλήγοντας στη δημιουργία ενός διαλύματος με συγκέντρωση 120 ppm. Το πυκνό αυτό διάλυμα αραιώθηκε περαιτέρω σε διάλυμα Ringer, ώστε να προκύψουν WS συγκεντρώσεων 0.5 (pH 7.83), 5 (pH 8.68) και 10 (pH 8.91) ppm. Η εκτίμηση της σταθερότητας των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο της N,N-διαιθυλ-p-φαινυλενοδιαμίνης (DPD) με τη χρήση του ηλεκτρονικού οργάνου δοκιμής πισίνας Scuba II. Η συγκέντρωση των WS επιβεβαιώθηκε πριν την εκτέλεση του κάθε πειράματος με τη βοήθεια χρωματομετρικών λωρίδων (chlorine test strips; Merck).

1.4. Διαλύματα φθοροφόρων

Η μικροσκοπική εξέταση των κυττάρων του βακτηρίου *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε με την παρατήρησή τους σε μικροσκόπιο φθορισμού (βλ. 1.5.) μέσω της χρώσης τους με δύο φθοροφόρα, το cFDA (Sigma Aldrich) και το PI (Baclight/ Live Dead kit L7012). Η παρασκευή του διαλύματος του cFDA έγινε με διάλυση 25mg σκόνης σε 1 ml DMSO (c=54mM) προς δημιουργία ενός Stock Solution. Ακολούθησε αραιώση του διαλύματος, με προσθήκη 9.25 μl από αυτό σε 1ml DMSO (c=500μM, Working Solution). Για το διάλυμα του PI, αντίστοιχα, (c_{τελ}= 100μM), 100μl από το Stock Solution (c=20mM) μεταφέρθηκαν σε 1230 μl DMSO (c=1.5mM, Working Solution).

1.5. Εξοπλισμός

Μικροσκόπιο φθορισμού

Η αξιολόγηση του επιπέδου βιωσιμότητας των καταπονημένων κυττάρων, καθώς και η παρατήρηση της επανάκαμψης των τραυματισμένων κυττάρων της *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε με βιντεομικροσκοπία (timelapse) σε Ανάστροφο Μικροσκόπιο Φθορισμού Leica DMi8 με αντίθεση φάσης, με έναν αντικειμενικό φακό εμβάπτισης σε λάδι 100x, με αριθμητικό άνοιγμα NA=1.25. Το μικροσκόπιο συνδυάζει χειροκίνητους χειρισμούς με τη χρήση του λογισμικού LAS X Navigator. Για την αξιολόγηση της κυτταρικής βιωσιμότητας και του βαθμού τραυματισμού, επιστρατεύτηκαν συγκεκριμένα φίλτρα, με σκοπό να απομονώσουν τις ακτινοβολίες με τα κατάλληλα μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής για τις φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν στη χρώση των βακτηριακών κυττάρων (βλ. Πίνακα 1.4.1).

Πίνακας 1.4.1 Φάσματα απορρόφησης και εκπομπής φίλτρων μικροσκοπίου Φθορισμού Leica DMi8

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

Οι εικόνες φθορισμού συλλέχθηκαν μέσω μιας κάμερας DFC 7000 T, η οποία διαθέτει δυνατότητα αυτόματης εστίασης. Οι εικόνες της βιντεομικροσκοπίας μπορούσαν να παρατηρηθούν είτε στον προσοφθάλμιο φακό, είτε στον υπολογιστή όπου μεταδίδονταν μέσω της κάμερας (Inverted Microscope Solution DMi8 S Platform, no date).



2. Πειραματικές μέθοδοι

2.1. Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού και της θανάτωσης των βακτηριακών κυττάρων από τη χρήση των απολυμαντικών

2.1.1. Προετοιμασία εμβολίου

Για την προετοιμασία του εμβολίου ακολουθήθηκε αρχικά η διαδικασία των δύο διαδοχικών ανανεώσεων που αναλύεται στην παράγραφο 1.1. Στο διάστημα των 18 ωρών ο πληθυσμός του βακτηρίου είχε φτάσει στα 10^9 CFU/mL, ενώ τα κύτταρα είχαν φτάσει στη μέση στατική φάση ανάπτυξης, στην οποία παρουσιάζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στις καταπονήσεις. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός του εμβολίου, με στόχο την απομάκρυνση του θρεπτικού υποστρώματος και των μεταβολικών προϊόντων που είχαν παραχθεί κατά την περίοδο της βακτηριακής ανάπτυξης. Έτσι, το διάλυμα της ανανέωσης φυγοκεντρήθηκε στα 3600 rpm για 10 min, στους 4 °C, με αποτέλεσμα τα κύτταρα της *Listeria* είχαν κατακαθίσει στον πάτο του σωλήνα φυγοκέντρησης 15 mL (falcon tube) ως ίζημα (pellet). Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και ακολούθησε προσθήκη 10 mL ισοτονικού διαλύματος Ringer 1/4. Η φυγοκέντρηση και η απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος επαναλήφθηκαν ακόμη μια φορά, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 10 mL του διαλύματος Ringer και ακολούθησε καλή ανάδευση σε vortex.

2.1.2. Έκθεση στην καταπόνηση

Για την έκθεση των κυττάρων στην καταπόνηση, πραγματοποιήθηκε λήψη 100 μL του προαναφερθέντος βακτηριακού εναιωρήματος (βλ. 2.1.) και μεταφορά τους σε falcon tube χωρητικότητας 15 mL, που περιείχε 10 mL από το διάλυμα της καταπόνησης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του βακτηριακού πληθυσμού κατά περίπου δύο λογάριθμους, από τα 10^9 CFU/mL στα 10^7 CFU/mL. Υπενθυμίζεται ότι στην περίπτωση του PAA χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις στα 0,5, 5, 10, 20, 30 και 40 ppm, ενώ στην περίπτωση του SH τρεις συγκεντρώσεις στα 0,5, 5 και 10 ppm. Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν δύο τεχνικές επαναλήψεις (Α και Β), επομένως στην περίπτωση του PAA χρησιμοποιήθηκαν δώδεκα σωλήνες φυγοκέντρησης, ενώ στην περίπτωση του SH, έξι σωλήνες για κάθε βιολογική. Τα κύτταρα παρέμειναν στους 20 και στους 4 °C για συνολικό χρόνο 1800 s, ενώ οι δειγματοληψίες έγιναν σε καθορισμένες χρονικές στιγμές και συγκεκριμένα στα 0, 30, 60, 300, 900 και 1800 s.

2.1.3. Μελέτη της καλλιεργησιμότητας και του υποθανάτιου τραυματισμού

Σε κάθε ορισμένη χρονική στιγμή, 100 μL από τα βακτηριακά εναιωρήματα των απολυμαντικών παραλήφθηκαν και αφού αραιώθηκαν σε διάλυμα Ringer για κατάλληλο αριθμό δεκαδικών αραιώσεων, επιστρώθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν το γενικό θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye και το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye +5% NaCl. Τα τρυβλία με το TSA-Ye παρέμειναν στους 37 °C για 48 h και τα τρυβλία με το TSA-Ye+5% NaCl για 120 h, όποτε και έγινε η καταμέτρηση των αποικιών.

2.1.4. Καταμέτρηση αποικιών και ανάλυση αποτελεσμάτων

Μετά το τέλος της περιόδου επώασης, τα τρυβλία εξήλθαν από τους κλιβάνους προκειμένου να γίνει η καταμέτρηση των ορατών αποικιών. Η καταμέτρηση των αποικιών επιτελείται σε όσα τρυβλία περιέχουν από 10 έως 300 αποικίες, εκφρασμένες σε Colony Forming Units ή CFU. Το μέγεθος του βακτηριακού πληθυσμού που υπήρχε στο αρχικό δείγμα υπολογίζεται από την εξίσωση:

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

Κάθε πειραματική συνθήκη επαναλήφθηκε για δύο βιολογικές επαναλήψεις, ενώ, όπως προαναφέρθηκε, περιλάμβανε δύο τεχνικές επαναλήψεις. Τόσο ο συνολικός πληθυσμός, όσο και ο ανθεκτικός υποπληθυσμός των κυττάρων της *L. monocytogenes* προέκυψε από τον υπολογισμό του μέσου όρου των δύο τεχνικών και των δύο βιολογικών επαναλήψεων για κάθε χρονική στιγμή. Ο αριθμός των τραυματισμένων κυττάρων προσδιορίστηκε από την αφαίρεση του ανθεκτικού υποπληθυσμού από τον ολικό βακτηριακό πληθυσμό κάθε επανάληψης και από τον υπολογισμό του μέσου όρου των επαναλήψεων. Ο όρος «υποπληθυσμός των τραυματισμένων κυττάρων» αναφέρεται στα τραυματισμένα από τα απολυμαντικά κύτταρα, τα οποία δεν κατάφεραν να ξεπεράσουν το επιπλέον εμπόδιο της χαμηλής aw λόγω της παρουσίας του NaCl, ώστε να σχηματίσουν αποικίες. Εφόσον τα κύτταρα αυτά κατάφεραν να σχηματίζουν αποικίες στα γενικά υποστρώματα, θεωρήθηκε ότι είχαν υποστεί υποθανάτιο τραυματισμό. Ο υποθανάτιος τραυματισμός εκφράστηκε ως ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων σε ένα δείγμα. Η αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού πραγματοποιήθηκε με βάση μία τιμή-όριο (threshold). Εφόσον η διαφορά μεταξύ του αριθμού των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο γενικό και στο επιλεκτικό υπόστρωμα βρισκόταν πάνω από αυτήν την τιμή, αναγνωριζόταν η ύπαρξη υποθανάτιου τραυματισμού. Αν η διαφορά ήταν κάτω από αυτήν την τιμή, θεωρούταν ότι ήταν αποτέλεσμα βιολογικής παραλακτικότητας μεταξύ των δειγμάτων.

2.2. Μελέτη της κατάστασης ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα μέσω μικροσκοπίας φθορισμού

2.2.1. Προετοιμασία εμβολίου και έκθεση στην καταπόνηση

Ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.1. έως και το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης κατά τον καθαρισμό του εμβολίου. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και ακολούθησε η επαναιώρηση του βακτηριακού ιζήματος σε 3 mL διαλύματος PAA (20, 30 και 40 ppm) με καλή ανάδευση σε vortex. Πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων στους 20 °C συνολικό διάστημα τριών ωρών και οι χρόνοι δειγματοληψίας ορίστηκαν στις 0, 1, 2 και 3 h.

2.2.2. Μικροσκοπία φθορισμού

Στη βάση των πειραμάτων της παρούσας μελέτης, η μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με τη μέθοδο της επίστρωσης σε τρυβλία που περιείχαν γενικό (TSA-Ye) ή εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα (TSA-Ye+ 5% NaCl), με στόχο την εξέταση της φυσιολογικής κατάστασης των βακτηρίων που επώσθησαν υπό συνθήκες καταπόνησης και την κατάταξή τους σε ζωντανά, τραυματισμένα, ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα και νεκρά. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, αυτό επετεύχθη μέσω της διπλής χρώσης των βακτηρίων με τις φθορίζουσες χρωστικές cFDA και PI. Η διπλή αυτή χρώση επέτρεψε την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των βακτηρίων, καθώς το cFDA βάφει μόνο τα μεταβολικά ενεργά-ζωντανά κύτταρα, ενώ το PI εισχωρεί σε όσα από αυτά διαθέτουν τραυματισμένες μεμβράνες και επομένως θεωρούνται νεκρά. Ο βακτηριακός τραυματισμός και η καλλιεργησιμότητα των κυττάρων μελετήθηκαν στα προηγούμενα πειράματα (βλ. 2.1.) σε επίπεδο πληθυσμού, με την εξέταση των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία. Μία βασική διαφορά μεταξύ της παρατήρησης των αποικιών στα τρυβλία και της εξέτάσής τους με μικροσκοπία φθορισμού είναι ότι η τελευταία επιτρέπει την εξέταση τους σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου. Ακόμη, μέσω της μικροσκοπικής παρατήρησης, καθίστανται διακριτά και ενδιάμεσα στάδια του κυτταρικού θανάτου, καθώς ορισμένα κύτταρα μπορούν να εμφανίζουν διπλή χρώση.

Πριν από την έναρξη των πειραμάτων, κρίθηκε απαραίτητη η επιβεβαίωση της λειτουργικότητας των χρωστικών. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν θετικά διαλύματα ελέγχου. Για τη δημιουργία των εν λόγω διαλυμάτων, αρχικά ολοκληρώθηκε η διαδικασία του καθαρισμού που περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.1. και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 3 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Στη συνέχεια, λήφθηκαν 100 μL από το εναιώρημα προς παρασκευή του κάθε control, δηλαδή συνολικά 200 μL . Για τη δημιουργία του θετικού cFDA control, στα 100 μl εναιωρήματος προστέθηκαν 2 μl cFDA ($C_{\text{τελ}}=10 \mu\text{M}$). Ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά και έπειτα φυγοκέντρηση στα 13.300 rpm για 2 λεπτά. Έγινε απόρριψη του υπερκείμενου, στο οποίο περιεχόταν και η περίσσεια της χρωστικής, τα κύτταρα προστέθηκαν σε 100 μl αποστειρωμένου Ringer και ακολούθησε ανάδευση με vortex. Λήφθηκαν 10 μL από το βακτηριακό διάλυμα και μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα, ώστε να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο. Το control του cFDA αναμένεται να φθορίζει στο πράσινο. Για το θετικό PI control, 100 μl από το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκαν και πάλι στις 13300 στροφές (rpm) για 2 λεπτά και το υπερκείμενο ρευστό απορρίφθηκε. Αυτή τη φορά τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 100 μl αιθανόλης 70% v/v και παρέμειναν σε αυτήν για 30 λεπτά προκειμένου να προκληθεί η θανάτωσή τους. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 13.300 στροφές (rpm) για 2 λεπτά, ώστε να μπορέσει να απομακρυνθεί η αιθανόλη, χρώση με το PI και ξανά φυγοκέντρηση, ώστε να απομακρυνθεί και η περίσσεια του PI και στα κύτταρα προστέθηκαν 100 μl αποστειρωμένου Ringer. Ακολούθησε ανάδευση με vortex, 10 μl του διαλύματος μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και οδηγήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού. Για το θετικό control του PI αναμένεται ερυθρός φθορισμός.

Τα βακτήρια που επιλέχθηκαν προς μικροσκοπική παρατήρηση είχαν δεχθεί καταπόνηση εξ' αιτίας της επαφής τους με το PAA, ώστε να εκδηλώνουν αδυναμία σχηματισμού αποικιών στα θρεπτικά μέσα. Με βάση λοιπόν αυτό το κριτήριο, επιλέχθηκε να εξεταστούν τα κύτταρα της *L. monocytogenes* που είχαν επωαστεί σε 40 ppm του απολυμαντικού και στους 20 °C, καθώς σε αυτό το συνδυασμό συνθηκών φαίνεται να παρουσιάζεται ο μέγιστος βαθμός τραυματισμού (βλ.

Διάγραμμα 1.3.). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία του εμβολίου και την έκθεση στην καταπόνηση περιγράφεται στην παράγραφο 2.1. Τα κύτταρα επωάστηκαν στο απολυμαντικό για 3h στους 20 °C, ενώ οι δειγματοληψίες έγιναν στις καθορισμένες χρονικές στιγμές, την 0^η, 1^η, 2^η και 3^η h. Ακολουθώς, λήφθηκαν 100 μL από το εναιώρημα και αυτό υπέστη φυγοκέντρηση στα 13.300 rpm για 2 λεπτά, προκειμένου να διακοπεί η επίδραση του απολυμαντικού. Μετά τον καθαρισμό του εμβολίου, το σχηματισθέν βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μL αποστειρωμένου, ισότονου διαλύματος Ringer, μέσω ανάδευσης σε vortex και ακολούθησε η προσθήκη των φθοροφόρων. Συγκεκριμένα, στο βακτηριακό εναιώρημα προστέθηκαν 2 μl cFDA ($C_{τελ}=10\mu\text{M}$) και 2 μl PI ($C_{τελ}=30\mu\text{M}$). Τα βακτήρια επωάστηκαν παρουσία των χρωστικών για 20 λεπτά. Μετά το πέρας του ορισμένου χρονικού διαστήματος, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στα 13.300 rpm για 2 λεπτά και το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε, μαζί την περίσσεια από τα φθοροφόρα. Το προκύπτον ίζημα αιωρήθηκε εκ νέου σε 100 μL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer και 10 μL από αυτό μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα, πριν αυτή οδηγηθεί στο μικροσκόπιο φθορισμού.

2.2.3. Ανάκαμψη τραυματισμένων κυττάρων

Για τη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων, τα κύτταρα της *L. monocytogenes* παρέμειναν στα διαλύματα καταπόνησης για τρεις ώρες. Τα διαλύματα καταπόνησης που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή τη σειρά πειραμάτων ήταν τα διαλύματα υπεροξικού οξέος (PAA), συγκεντρώσεων 20, 30 και 40 ppm, ενώ συμπεριλήφθηκε και ένα διάλυμα-μάρτυρας Ringer. Με το πέρας της καταπόνησης, τα βακτηριακά εναιωρήματα του PAA φυγοκεντρήθηκαν στα 13.300 rpm για 2 min, με στόχο τον καθαρισμό του εμβολίου. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε, το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 100 μl ισότονου διαλύματος Ringer και το προκύπτον διάλυμα αραιώθηκε σε Ringer κατά μία δεκαδική αραιώση. Ακολούθησε η παραλαβή 10 μL διαλύματος και η επίστρωσή του με τη βοήθεια κρίκου εμβολιασμού σε ορθογώνιο παραλληλόγραμμο κομμάτι άγαρ TSA-Ye, διαστάσεων 22 x 22 mm το οποίο βρισκόταν στην επιφάνεια αντικειμενοφόρου πλάκας. Το κομμάτι του άγαρ είχε προηγουμένως παραληφθεί από τρυβλίο Petri 9cm, το οποίο ήταν επιστρωμένο με 12,5 mL TSA-Ye. Μετά από την επίστρωση του εμβολίου, το άγαρ παρέμεινε για 15 λεπτά μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής χωρίς επικάλυψη, μέχρι την πλήρη απορρόφηση του εμβολίου, όποτε και καλύφθηκε με καλυπτρίδα και σφραγίστηκε περιφερειακά με σιλικόνη. Η σφράγιση αποσκοπούσε να περιορίσει την απώλεια υγρασίας και συνεπώς τη μεταβολή της ενεργότητας νερού από το υλικό, γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει την ανάκαμψη των τραυματισμένων κυττάρων. Το παρασκεύασμα στη συνέχεια παρακολούθηθηκε με τη με τη χρήση βιντεομικροσκοπίας. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν κατά τη διάρκεια 6 ωρών παραμονής τους στο άγαρ. Για κάθε πείραμα έλαβαν χώρα δύο βιολογικές επαναλήψεις

2.2.4. Ανάλυση εικόνας

Η ανάλυση των εικόνων της βιντεομικροσκοπίας πραγματοποιήθηκε, σε μελλοντικό από τα πειράματα χρόνο, με τη βοήθεια τεχνικών επεξεργασίας εικόνας και μηχανικής μάθησης, οι οποίες επέτρεψαν την απεικόνιση της εξέλιξης του βακτηριακού πληθυσμού στον άξονα του χρόνου, καθώς και τη φαινοτυπική παρατήρηση σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Συγκεκριμένα, για την ανάλυση των εικόνων επιστρατεύτηκε το αναλυτικό εργαλείο BaSCA, ένα λογισμικό που βασίζεται στη χρήση λογαρίθμων, που έχουν τροποποιηθεί ώστε να ανταποκρίνονται στο συγκεκριμένο τύπο εικόνων και στις ανάγκες του μικροπεριβάλλοντος, όπως π.χ. στην παρουσία θορύβου. Η ανάλυση μέσω του BaSCA βασίζεται στην ανάλυση των εικόνων στα συστατικά τους στοιχεία. Αρχικά η εικόνα επεξεργάζεται ώστε ο βακτηριακός πληθυσμός να τμηματοποιηθεί σε επίπεδο μεμονωμένων αποικιών. Ακολούθως, η κάθε αποικία αναλύεται, ώστε να προσδιοριστούν τα χωρικά όρια του κάθε βακτηριακού κυττάρου. Τέλος, το κάθε κύτταρο εξετάζεται ως προς τα χαρακτηριστικά του. Αυτό επέτρεψε από τη μια, την ποσοτικοποίηση των ζωντανών και των νεκρών κυττάρων, ανάλογα με την εκπομπή κόκκινου ή πράσινου φθορισμού, προς εύρεση ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων και από την άλλη, την παρακολούθηση του πολλαπλασιασμού ενός κυττάρου ή μιας ομάδας κυττάρων, αλλά και τον υπολογισμό των χρόνων διαίρεσης στη φάση της βακτηριακής ανάκαμψης (Balomenos *et al.*, 2017).

2.3.Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που συνδέονται με την κατάσταση VBNC μέσω αντίστροφης μεταγραφής PCR σε πραγματικό χρόνο (RT- qPCR)

2.3.1. Προετοιμασία κυττάρων

Και σε αυτό το πείραμα επαναλήφθηκε η διαδικασία προετοιμασίας του εμβολίου που περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.1. έως και το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης. Τον καθαρισμό του εμβολίου ακολούθησε η απόρριψη του υπερκείμενου ρευστού και τα βακτήρια επαναιωρήθηκαν σε 4 mL διαλύματος PAA, συγκέντρωσης 40 ppm. Οι χρόνοι δειγματοληψίας αναφέρονται στην παράγραφο 2.2.1. Το επίπεδο του βακτηριακού πληθυσμού ήταν $\approx 10^9$ CFU/mL.

Σε κάθε δειγματοληψία και για κάθε συγκέντρωση απολυμαντικού, λήφθηκε 1 mL από το βακτηριακό εναιώρημα και οδηγήθηκε για φυγοκέντρηση στα 13.300 rpm, για διάστημα 2 λεπτών, στους 20°C, με στόχο τον διαχωρισμό των βακτηρίων από το διάλυμα της καταπόνησης. Έπειτα από το σχηματισμό του ιζήματος, το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και ακολούθησε η προσθήκη 200μl από το αντιδραστήριο RNA later stabilization (Ambion, Whattham, MA,USA), με σκοπό την προστασία του RNA των βακτηρίων από την αποικοδόμηση, μέσω της αδρανοποίησης των RNAsών και τα δείγματα οδηγήθηκαν στην κατάψυξη, όπου και παρέμειναν στους -20 °C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους. Παράλληλα με τα ανωτέρω δείγματα, η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για βακτήρια που δεν ήταν εναιωρημένα στο διάλυμα καταπόνησης, αλλά σε αποστειρωμένο Ringer (μάρτυρες).

2.3.2 Εκχύλιση RNA

Η εκχύλιση του βακτηριακού RNA έγινε με το πρωτόκολλο που δίνεται από το RNA isolation NucleoSpin RNA. Τα βακτηριακά εναιωρήματα, αφού εξήλθαν από την κατάψυξη, δέχθηκαν ανάδευση σε vortex ώστε να επέλθει διαχωρισμός των βακτηρίων από την υγρή φάση και το υπερκείμενο ρευστό απορρίφθηκε. Στη συνέχεια, ακολούθησε η προσθήκη 350 μL Buffer RA1 και 3,5 μL β -μερκαπτοαιθανόλης, το διάλυμα αναδεύτηκε καλά σε vortex και η εφαρμογή υπερήχων για 3 λεπτά, ώστε να προκληθεί λύση των κυττάρων.

Μετά τη λύση, το διάλυμα πέρασε από φίλτρο NucleoSpin® Filter (ιώδης δακτύλιος) το οποίο ήταν εφαρμοσμένο σε ένα σωλήνα συλλογής, ώστε να ομογενοποιηθεί και να μειωθεί το ιξώδες του και το διηθημένο διάλυμα συγκεντρώθηκε στο άκρο του σωλήνα συλλογής (collection tube) όγκου 2mL. Ακολούθως, αυτό φυγοκεντρήθηκε στις 11,000 x g για 1 λεπτό, ώστε να αφαιρεθούν κυτταρικά υπολείμματα όπως τα θραύσματα των κυτταρικών μεμβρανών ή των τοιχωμάτων, ενώ το φίλτρο απορρίφθηκε. Σε επόμενο στάδιο, το διάλυμα κατεργάστηκε μέσω της προσθήκης 350 μL αιθανόλης (70%), αναδεύτηκε με πέντε διαδοχικά πιπεταρίσματα και μεταγγίστηκε στη στήλη NucleoSpin® RNA Column (γαλάζιος δακτύλιος), η οποία είναι και αυτή προσαρμοσμένη σε ένα σωλήνα συλλογής. Η προσθήκη της αιθανόλης προξενεί την κατακρήμνιση του γενετικού υλικού, δημιουργώντας έτσι τις ευνοϊκές συνθήκες για την πρόσδεση του RNA στη μεμβράνη σιλικόνης της στήλης. Αφού λοιπόν προστέθηκε στη στήλη, το διάλυμα δέχθηκε φυγοκέντρωση για 30 s σε 11.000 x g. Μετά την ολοκλήρωσή της, η στήλη μεταφέρθηκε σε ένα νέο σωλήνα συλλογής, όπου πραγματοποιήθηκε προσθήκη 350 μL του διαλύματος MDB (Membrane Desalting Buffer) και φυγοκέντρωση στις 11.000 x g για 1 λεπτό, με σκοπό να απομακρυνθούν τα προσδεμένα στη μεμβράνη άλατα και να διευκολυνθεί η πέψη του DNA. Το υπερκείμενο ρευστό απομακρύνθηκε η φυγοκέντρωση επαναλήφθηκε ακόμη μια φορά. Η πέψη του DNA έγινε μέσω της κατεργασίας του με ένα αντιδραστήριο DNάσης (DNase reaction mixture). Για την προετοιμασία του, σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα χωρητικότητας 1,5 mL αναμίχθηκαν 10 μL ανασυσταθείσας rDNάσης, με 90 μL Reaction Buffer for rDNase με ελαφρά αναστροφή του σωλήνα. Το αντιδραστήριο της DNάσης εφαρμόστηκε απευθείας στο κέντρο της μεμβράνης σιλικόνης της στήλης και το μίγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

Σε επόμενη φάση, πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός του RNA με τρεις διαδοχικές εκπλύσεις: Η πρώτη έκπλυση έγινε με 200 μL Buffer RAW2, το οποίο προστέθηκε στη στήλη ώστε να αδρανοποιήσει την rDNάση. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 11.000 x g στροφές για ένα λεπτό και η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα συλλογής. Για τη δεύτερη έκπλυση, προστέθηκαν 600 μL Buffer RA3. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 11.000 x g για 30 s και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Τέλος, η τρίτη έκπλυση έγινε με 250 μL Buffer RA3. Η εν συνεχεία φυγοκέντρωση στις 11.000 x g στροφές διήρκησε δύο λεπτά, έως το πλήρες στέγνωμα της μεμβράνης, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και η φυγοκέντρωση ολοκληρώθηκε ακόμα μια φορά. Κατόπιν, στήλη τοποθετήθηκε σε έναν ελεύθερο νουκλεάσης σωλήνα συλλογής, όγκου 1,5 mL,

όπου πραγματοποιήθηκε η έκλουση του RNA με προσθήκη 60 μL H_2O απαλλαγμένο από RNάσες. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 11.000 x g για ένα λεπτό.

Η ποσότητα του RNA που ανακτήθηκε, καταμετρήθηκε με νανοφωτομέτρηση των δειγμάτων. Τα δείγματα του RNA διατηρήθηκαν υπό κατάψυξη, στους -80°C .

2.3.3 Σύνθεση cDNA από RNA με Αντίστροφη Μεταγραφή

Το επόμενο βήμα της πειραματικής διαδικασίας ήταν η μετατροπή του πλέον απομονωμένου RNA σε cDNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής. Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε το PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Takara, RR047A), το οποίο, πριν τη χρήση του, αποθηκευόταν στους -20°C . Το συγκεκριμένο kit επιτρέπει την εξάλειψη του υπολειμματικού DNA μέσω της επώασής του στους 42°C και για δύο λεπτά με ένα αντιδραστήριο αποικοδόμησης του DNA. Στη συνέχεια,, το βακτηριακό RNA μεταγράφηκε αντίστροφα σε cDNA με τη βοήθεια τυχαίων εξαμερών ολιγονουκλεοτιδίων που λειτουργούν ως εκκινητές. Τα τυχαία αυτά εξαμερή, καθώς και τα υπόλοιπα συστατικά του Master Mix που χρησιμοποιείται για την αντίστροφη μεταγραφή αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.3.1.: Σύσταση Master Mix αντίστροφης μεταγραφής

Master mix	15 μl Τελικός όγκος ανά PCR Tube
5x	3
Enzyme	0,75
Random hexamers	0,75
RNA	1
H_2O	9,5

2.3.4. Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Η qPCR πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό προϊόν KAPA SYBR qPCR kit (MilliporeSigma KK4618), Το συγκεκριμένο kit περιέχει τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green, η οποία καθώς συνδέεται με τις αλληλουχίες DNA, επιτρέπει την ανίχνευση των γονιδίων-στόχων. Η σύνθεση του Master Mix φαίνεται στον Πίνακα 2.3.4.1. Οι παράμετροι λειτουργίας του θερμικού κυκλοποιητή, στον οποίο έγινε η qPCR ρυθμίστηκαν όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.3.4.2.

Πίνακας 2.3.4.1.: Προετοιμασία του Master Mix για τη Real Time PCR

Master Mix	10 μl (9 μl Master mix+ 1 μl cDNA αραιωμένο)
------------	---

SYBR	5
Forward Primer	0,5
Reverse Primer	0,5
cDNA	1
H₂O	3
ROX	0,2

Πίνακας 2.3.4.2: Στάδια και παράμετροι qPCR

Παραμονή	
95 °C για 20 s	
40x Κύκλοι	
Αποδιάταξη του DNA	95 °C για 10 s
Υβριδισμός εκκινητών	60 °C για 30 s
Επιμήκυνση εκκινητών	72 °C για 30s

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν με χρήση του λογισμικού PrimerBlast και αναγράφονται στον κατωτέρω πίνακα. Η καταλληλότητα των εκκινητών επαληθεύτηκε μέσω ηλεκτροφόρησης ενός μεμονωμένου τελικού προϊόντος της qPCR σε γέλη αγαρόζης 2%, με την οποία δείχθηκε ότι το παραγόμενο προϊόν είχε το ίδιο μέγεθος με τις αλληλουχίες-στόχους και άρα αποτελούσε προϊόν ενίσχυσης των εξεταζόμενων γονιδίων. Η κανονικοποίηση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με βάση το γονίδιο αναφοράς *tpi*, το οποίο επιλέχθηκε, λόγω της σταθερότητάς του στις συνθήκες εκτέλεσης του πειράματος, με χρήση της εφαρμογής του excel NormFinder, ενώ παράλληλα με τα παραπάνω δείγματα εξετάστηκε και ένα δείγμα-μάρτυρας, το οποίο δεν περιείχε γενετικό υλικό.

Πίνακας 2.3.4.3.: Χαρακτηριστικά των γονιδίων αναφοράς και των γονιδίων στόχων

Γονίδια Αναφοράς	Εκκινητές	Αλληλουχίες εκκινητών (5' -> 3')	Συγκέντρωση (uM)	Μέγεθος αμπλικονίου (bp)	Απόδοση PCR
Tpi	tpi_f	AACACGGCATGACACCAATC	0.5	93	2.004
	tpi_r	CACGGATTTGACCACGTACC	0.5		
Εξεταζόμενα γονίδια					
clpP	clpP_f	ACTATCGGCATGGGTATGGC	0.5	165	2.037
	clpP_r	TAAAATGTGGCGAGCAGCGA	0.5		
inlA	inlA_f	AACTGTGACGCAGCCACTTA	0.5	156	2.059
	inlA_r	GTTTGGGCATCAAACCACCC	0.5		
prfA	prfA_f	GCTATGTGCGATACCGCTTG	0.5	132	2.007
	prfA_r	CTCGGCTCTATTTGCGGTCA	0.5		
sigB	sigB_f	GCCGTAGAAGAGCTGACGAG	0.5	206	2.005
	sigB_r	CCATCATCCGTACCACCAACA	0.5		

relA	relA_f	CGCGAAATACCCAAGCGATG	0.5	160	1.975
	relA_r	TTGCGATGGCGCAGGATATT	0.5		
lmo0887	lmo0887_f	GGCTATGCAGAAATGGCGAC	0.5	130	1.994
	lmo0887_r	ATACGTCACCACGCTTCACC	0.5		
lmo0888	lmo0888_f	AACGATTGACAAACAGCGCC	0.5	163	2.024
	lmo0888_r	ACGTCAGACCCTTTTGTCTG	0.5		

2.3.5. Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Στα πειράματα της RT-qPCR εξετάστηκαν δύο τεχνικές και δύο βιολογικές επαναλήψεις από κάθε δείγμα. Με την ολοκλήρωση της δοκιμής, παραλήφθηκαν τα raw data, τα οποία αναλύθηκαν στη συνέχεια μέσω του Excel. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος $\Delta\Delta Ct$, μέσω της οποίας τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με βάση ένα δείγμα αναφοράς, που δεν κατεργάστηκε με τον παράγοντα καταπόνησης, καθώς και με βάση το γονίδιο αναφοράς. Η χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου προϋποθέτει ότι η αποτελεσματικότητα του εξεταζόμενου γονιδίου και του γονιδίου αναφοράς να είναι ίσες (lifestechnologies, 2014). Αρχικά, οι τιμές Ct των γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου αναφοράς επεξεργάστηκαν, αποκλείοντας τυχόν ακραίες τιμές (outliers), οι οποίες μπορεί να οδηγούσαν σε λανθασμένα πορίσματα και, ακολούθως, αντικαθιστώντας τις απροσδιόριστες τιμές Ct με τη μέση τιμή Ct των υπόλοιπων τεχνικών επαναλήψεων. Αφού λοιπόν αυτό το βήμα ολοκληρώθηκε, ακολούθησε ο υπολογισμός της μέσης τιμής των δύο τεχνικών επαναλήψεων για κάθε βιολογική επανάληψη κάθε γονιδίου. Οι μέσες τιμές κανονικοποιήθηκαν με βάση το δείγμα-μάρτυρα και το γονίδιο αναφοράς, και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως διαφορά δύο λογαρίθμων, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Συγκριτικής Ποσοτικοποίησης- $\Delta\Delta Ct$, εφαρμόζοντας τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\text{Fold difference} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{calibrator}} = \Delta\Delta Ct$$

$$Ct_{\text{GOI}}^s - Ct_{\text{norm}}^s = \Delta Ct_{\text{sample}}$$

$$Ct_{\text{GOI}}^c - Ct_{\text{norm}}^c = \Delta Ct_{\text{calibrator}}$$

Σε επόμενη φάση πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης για τις δύο βιολογικές επαναλήψεις κάθε γονιδίου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

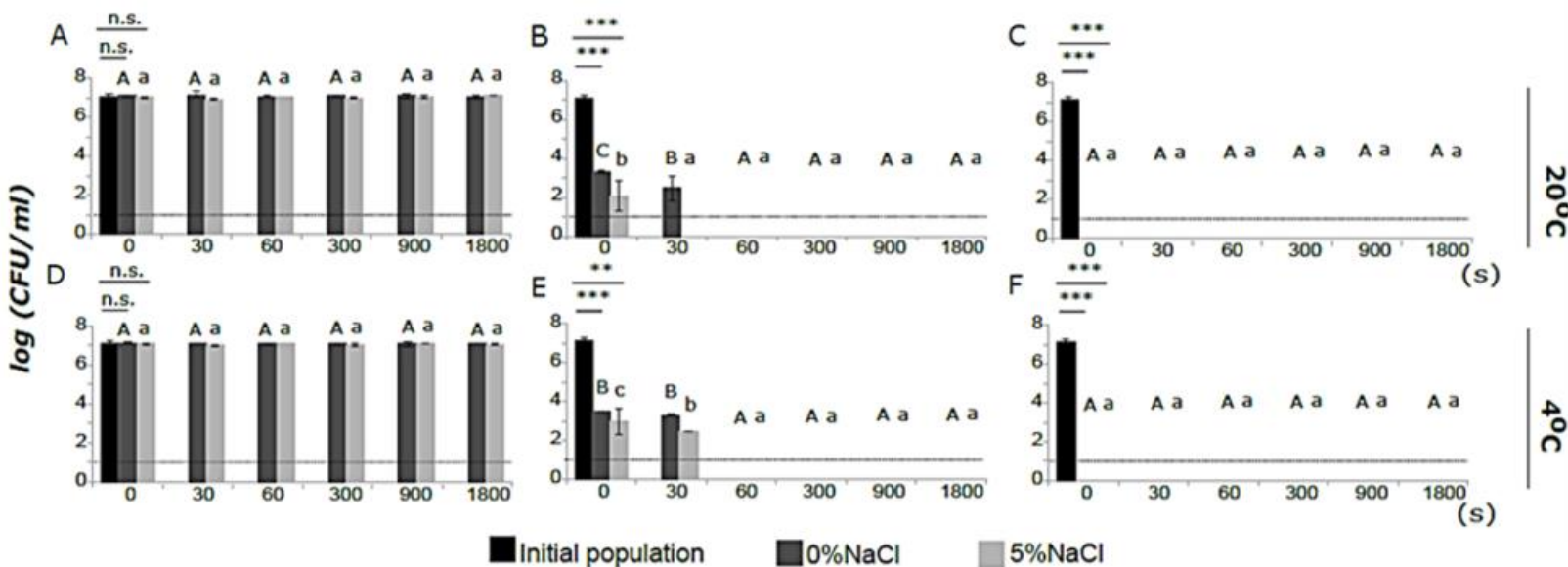
1. Αξιολόγηση του υποθανάτιου τραυματισμού και της κυτταρικής θανάτωσης

Sodium Hypochlorite

0.5ppm

5ppm

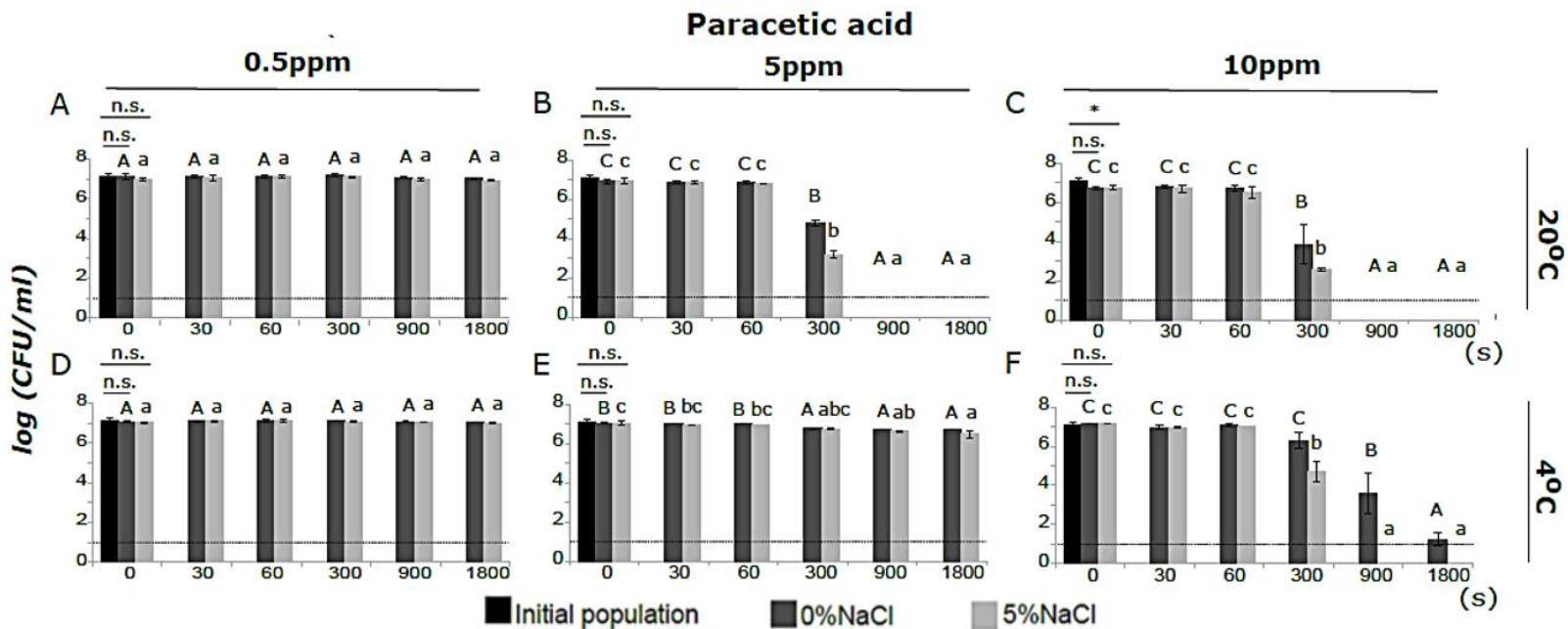
10ppm



Διάγραμμα 1.1. Εξέλιξη του καλλιεργήσιμου πληθυσμού του στελέχους Scott A του βακτηρίου *L. monocytogenes* κατά την επώασή του σε συνθήκες καταπόνησης στους 20 °C και στους 4 °C για 0, 30, 60, 300, 900 και 1800 s. Ο παράγοντας καταπόνησης είναι το απολυμαντικό SH το οποίο είναι διαλυμένο σε Ringer με αποτέλεσμα να προκύπτουν διαλύματα τελικών συγκεντρώσεων 0,5, 5 και 10 ppm. Οι ράβδοι με σκούρο γκρι χρωματισμό αντιστοιχούν στον ολικό πληθυσμό του βακτηρίου, ο οποίος υπολογίστηκε έπειτα από μέτρηση των αποικιών στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye. Οι ράβδοι με ανοιχτό γκρι χρωματισμό αντιστοιχούν στον ανθεκτικό στη δράση του απολυμαντικού υποπληθυσμό του βακτηρίου, ο οποίος υπολογίστηκε έπειτα από τη μέτρηση των αποικιών στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye+5% NaCl. Οι ράβδοι μαύρου χρώματος αντιστοιχούν στον πληθυσμό του βακτηρίου πριν την εφαρμογή της καταπόνησης. Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει το όριο πάνω από το οποίο γίνεται η καταμέτρηση των αποικιών, το οποίο έχει οριστεί στα 10 CFU/mL.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η αδρανοποίηση του του καλλιεργήσιμου βακτηριακού πληθυσμού του στελέχους Scott A της *L. monocytogenes*, κατά τη διάρκεια της επώασής του σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου για διάστημα μισής ώρας. Από την παρατήρηση των διαγραμμάτων A και D διαπιστώνεται πως τόσο στους 20 °C, όσο και στους 4 °C η μείωση του βακτηριακού πληθυσμού ήταν αμελητέα καθ' όλο το χρόνο της επώασης, καθώς ο συνολικός

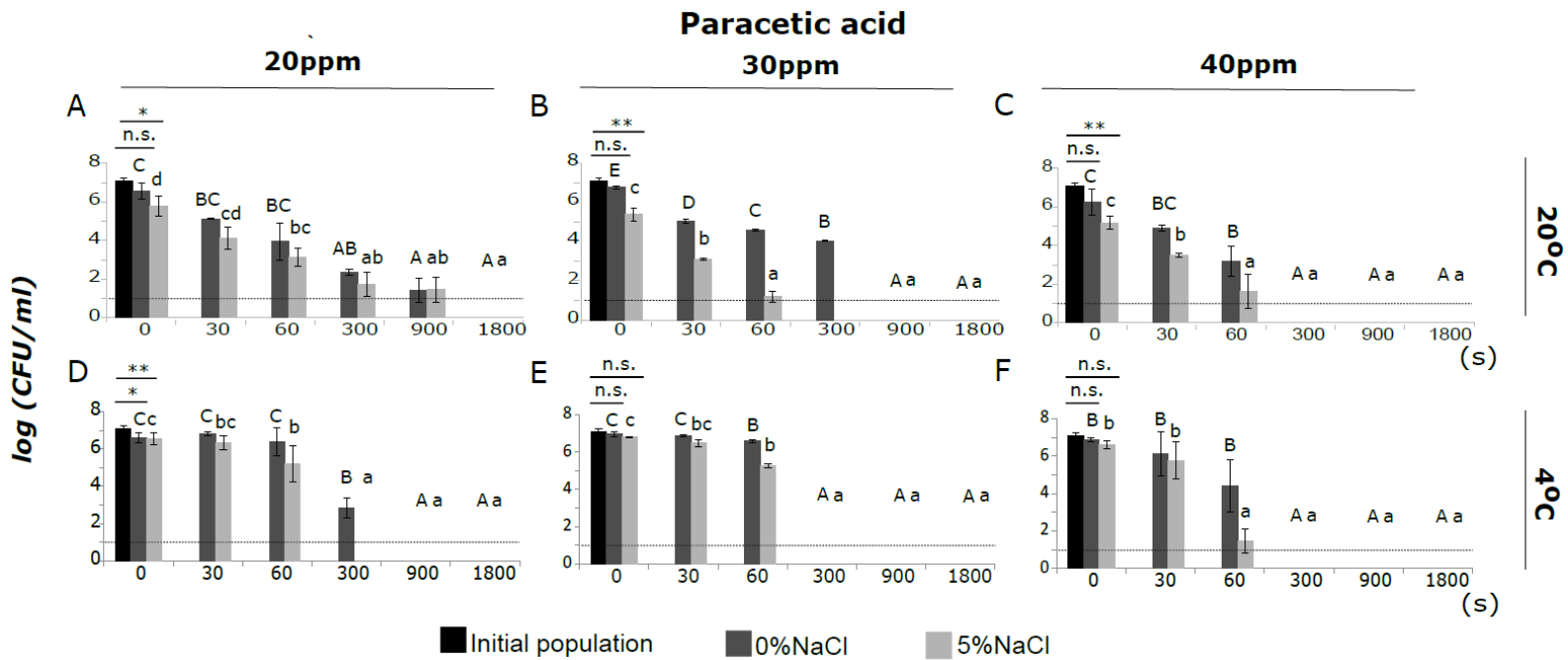
πληθυσμός παρέμεινε στο ίδιο επίπεδο όπως και πριν την έναρξη της καταπόνησης έως και τα 1800 s. Ο ανθεκτικός υποπληθυσμός έμεινε επίσης σταθερός και ίσος με τον συνολικό πληθυσμό του βακτηρίου. Με την αύξηση της συγκέντρωσης του SH στα 5 ppm (διαγράμματα B και E) η επίδραση του απολυμαντικού εντάθηκε. Συγκεκριμένα, στους 20 °C (Διάγραμμα B) και ήδη από τα 0 s, ο ολικός βακτηριακός πληθυσμός μειώθηκε από τους 7 log CFU/mL στους 3 log CFU/mL και συνέχισε την πτωτική πορεία του μέχρι τα 60 s, όπου και μηδενίστηκε. Αντίστοιχα, ο ανθεκτικός υποπληθυσμός παρουσίασε αρχική μείωση από τους 7 log CFU/mL στους 2 log CFU/mL και μηδενίστηκε στα 30 s. Στην περίπτωση της επώασης στους 4 °C (Διάγραμμα E) ο ολικός πληθυσμός ακολούθησε παρόμοια πορεία, όπως και στους 20 °C. Αντίθετα, ο ανθεκτικός υποπληθυσμός αδρανοποιήθηκε βραδύτερα, καθώς μειώθηκε κατά 3 log CFU/mL κατά την πρώτη επαφή με το απολυμαντικό και απέκτησε μηδενική τιμή στα 60 s επώασης. Όσον αφορά τα 10 ppm SH, η επίδρασή του ήταν άμεση, γεγονός που μαρτυρά η άμεση και πλήρης αδρανοποίηση τόσο του συνολικού, όσο και του ανθεκτικού υποπληθυσμού της *Listeria* από το χρονικό σημείο των 0 s.



Διάγραμμα 1.2. Εξέλιξη του στελέχους Scott A του βακτηρίου *L. monocytogenes* κατά την επώασή τους σε συνθήκες καταπόνησης στους 20 °C και στους 4 °C για 0, 30, 60, 300, 900 και 1800 s. Ο παράγοντας καταπόνησης είναι το απολυμαντικό PAA το οποίο είναι διαλυμένο σε Ringer με αποτέλεσμα να προκύπτουν διαλύματα τελικών συγκεντρώσεων 0,5, 5 και 10 ppm. Οι ράβδοι με σκούρο γκρι χρωματισμό αντιστοιχούν στον ολικό πληθυσμό του βακτηρίου, ο οποίος υπολογίστηκε έπειτα από μέτρηση των αποικιών στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye. Οι ράβδοι με ανοιχτό γκρι χρωματισμό αντιστοιχούν στον ανθεκτικό στη δράση του απολυμαντικού υποπληθυσμό του βακτηρίου, ο οποίος υπολογίστηκε έπειτα από τη μέτρηση των αποικιών στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye+5% NaCl. Οι ράβδοι μαύρου χρώματος αντιστοιχούν στον πληθυσμό του βακτηρίου πριν την εφαρμογή της καταπόνησης. Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει το όριο πάνω από το οποίο γίνεται η καταμέτρηση των αποικιών, το οποίο έχει οριστεί στα 10 CFU/mL.

Στο Διάγραμμα 1.2. απεικονίζεται η δράση του υπεροξικού οξέος στον πληθυσμό της *Listeria* στους 20 °C και στους 4 °C για χρόνο 1800 s. Στα Διαγράμματα A και D, δηλαδή κατά την επώαση στους 20 °C και στους 4 °C αντίστοιχα, παρατηρείται πως όταν η συγκέντρωση του PAA είχε ρυθμιστεί στα 0,5 ppm ο αριθμός των αποικιών του στελέχους Scott A παρέμεινε ουσιαστικά αμετάβλητος. Η εν λόγω παρατήρηση ισχύει εξίσου για το σύνολο των βακτηριακών κυττάρων και για τον ανθεκτικό στην καταπόνηση υποπληθυσμό. Κατά την επώαση των βακτηρίων σε διάλυμα υπεροξικού οξέος 5 ppm, στους 20 °C (Διάγραμμα B), ο συνολικός πληθυσμός παρέμεινε στάσιμος στα 10^7 CFU/mL έως και τα 60 s. Από τα 300 s παρουσίασε μείωση κατά περίπου 2 log CFU/mL, ενώ από τα 900 s και έπειτα δεν παρατηρήθηκε η ανάπτυξη αποικιών. Το ίδιο πλατό επιδεικνύεται και για τον ανθεκτικό υποπληθυσμό των βακτηρίων, αφού άρχισε να μειώνεται και αυτός τη χρονική στιγμή των 300 s, φτάνοντας τους 3 log CFU/mL, ενώ ακολούθησε ο μηδενισμός του στα 900 s. Σε αντιδιαστολή με ό,τι απεικονίζεται στο Διάγραμμα B, στο Διάγραμμα E δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή στο μέγεθος του ολικού βακτηριακού πληθυσμού πριν και μετά την έναρξη της καταπόνησης. Επιπλέον, η διαφορά ανάμεσα στο σύνολο των βακτηρίων και στον ανθεκτικό υποπληθυσμό είναι αμελητέα σε όλες τις χρονικές στιγμές που έγινε η δειγματοληψία. Στο Διάγραμμα C, όπου η συγκέντρωση του απολυμαντικού είχε ρυθμιστεί στα 10 ppm, παρατηρείται ότι ο ολικός πληθυσμός των βακτηρίων και ο ανθεκτικός υποπληθυσμός τους παρέμειναν ουσιαστικά σταθεροί μέχρι το $t=60$ s, ενώ μετέπειτα μειώθηκαν περίπου στους 3,5

log CFU/mL και 2,5 CFU/mL αντίστοιχα ($\Delta t=300$ s) και εν τέλει μηδενίστηκαν στα 900 s. Στο Διάγραμμα F οι πληθυσμοί παραμένουν και πάλι στο ίδιο επίπεδο με το μάρτυρα έως και τα 60 s, ενώ η πρώτη μεταβολή παρατηρείται στα 300 s, όπου τα ολικά βακτήρια μειώθηκαν προσεγγιστικά κατά 1 log CFU/mL και τα ανθεκτικά κατά 3 log CFU/mL αντίστοιχα. Αν και στα 900 s οι αποικίες των ανθεκτικών βακτηρίων μηδενίστηκαν, ο συνολικός πληθυσμός υπολογίστηκε γύρω στους 3,2 log CFU/mL και παρέμεινε πάνω από το όριο καταμέτρησης των 10 CFU/mL ακόμα και για $t=1800$ s, ξεπερνώντας ελάχιστα τον 1 log CFU/mL.



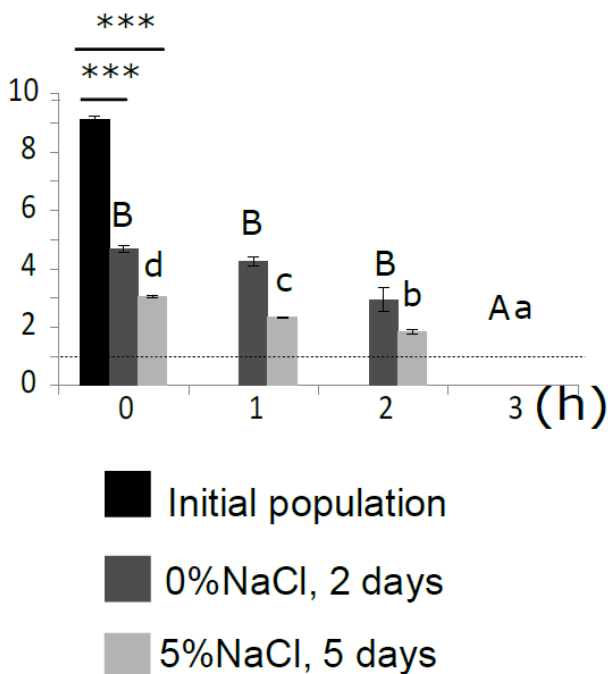
Διάγραμμα 1.3. Εξέλιξη του του καλλιεργήσιμου πληθυσμού του στελέχους Scott A του βακτηρίου *L. monocytogenes* κατά την επώασή τους σε συνθήκες καταπόνησης στους 20 °C και στους 4 °C για 0, 30, 60, 300, 900 και 1800 s. Ο παράγοντας καταπόνησης είναι το απολυμαντικό PAA το οποίο είναι διαλυμένο σε Ringer με αποτέλεσμα να προκύπτουν διαλύματα τελικών συγκεντρώσεων 20, 30 και 40 ppm. Οι ράβδοι με σκούρο γκρι χρωματισμό αντιστοιχούν στον ολικό πληθυσμό του βακτηρίου, ο οποίος υπολογίστηκε έπειτα από μέτρηση των αποικιών στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye. Οι ράβδοι με ανοιχτό γκρι χρωματισμό αντιστοιχούν στον ανθεκτικό στη δράση του απολυμαντικού υποπληθυσμό του βακτηρίου, ο οποίος υπολογίστηκε έπειτα από τη μέτρηση των αποικιών στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye+5% NaCl. Οι ράβδοι μαύρου χρώματος αντιστοιχούν στον πληθυσμό του βακτηρίου πριν την εφαρμογή της καταπόνησης. Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει το όριο πάνω από το οποίο γίνεται η καταμέτρηση των αποικιών, το οποίο έχει οριστεί στα 10 CFU/mL.

Εφόσον δεν παρατηρήθηκε μηδενισμός των αποικιών στους 4 °C, τα πειράματα συνεχίστηκαν έως και τα 40 ppm PAA. Στα 20 ppm (**Διαγράμματα Α και Β**) η επίδραση του απολυμαντικού φαίνεται να ήταν άμεση, καθώς διαπιστώνεται μεταβολή του συνολικού πληθυσμού κατά 0,5 log CFU/mL με την έναρξη της καταπόνησης στους 4 °C. Με την πάροδο του χρόνου ο πληθυσμός εμφάνισε εντονότερη πτωτική τάση και κατέληξε να μηδενιστεί στα 1800 s. Ο ανθεκτικός υποπληθυσμός βρέθηκε να ανέρχεται στους 5,5 log CFU/mL στο μηδενικό χρόνο, διαφέροντας από το συνολικό πληθυσμό κατά ένα περίπου 1 log CFU/mL, ο οποίος αντιστοιχεί στα τραυματισμένα κύτταρα. Τα ανθεκτικά καλλιεργήσιμα βακτήρια εξαλείφθηκαν και αυτά στα 1800 s. Όταν η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 4 °C, τόσο το σύνολο των κυττάρων, όσο και τα ανθεκτικά στην καταπόνηση κύτταρα παρουσίασαν μείωση περίπου 0,5 log CFU/mL για t=0 s. Στα 30 s ο πληθυσμός των ολικών βακτηρίων διατηρήθηκε αμετάβλητος, ενώ ο ανθεκτικός υποπληθυσμός προσέγγισε τα 10⁶ CFU/mL. Για t=60s, η διαφορά μεταξύ των ολικών και των ανθεκτικών κυττάρων αυξήθηκε, φτάνοντας τον 1 log CFU/mL και κορυφώθηκε στο χρονικό σημείο των 300 s, όπου το σύνολο των ανθεκτικών βακτηρίων αδρανοποιήθηκε, ενώ τα ολικά έφτασαν τα 10³ CFU/mL. Ο βακτηριακός πληθυσμός μηδενίστηκε στα 900 s. Το φαινόμενο που παρατηρήθηκε για συγκέντρωση PAA 30 ppm και θερμοκρασία ίση με 20 °C (**Διάγραμμα Β**) ήταν η αμελητέα πτώση του αριθμού των ολικών κυττάρων και μείωση των ανθεκτικών βακτηρίων κατά 1 log CFU/mL τη μηδενική στιγμή. Τα τραυματισμένα κύτταρα αυξήθηκαν και σε αυτή την περίπτωση κατά την εξέλιξη της επώασης και την περαιτέρω μείωση των βακτηριακών πληθυσμών, καθώς προσέγγισε τους 2 log CFU/mL στο t=30 s και του 3 log CFU/mL για t=60 s. Ο ανθεκτικός πληθυσμός μηδενίστηκε στα 300 s, ενώ τα συνολικά βακτήρια ανέρχονταν στο 10⁴ CFU/mL. Ο ολικός βακτηριακός πληθυσμός κατήλθε κάτω από το όριο καταμέτρησης στο χρόνο 900 s. Κατά την επώαση των βακτηρίων στην ίδια συγκέντρωση απολυμαντικού και στους 4 °C (**Διάγραμμα Ε**) τα τραυματισμένα κύτταρα ήταν σαφώς λιγότερα, καθώς η διαφορά στο μέγεθος του συνολικού και του ανθεκτικού πληθυσμού, όπως και η γενικότερη πτωτική τάση των στηλών φαίνεται αμελητέα έως τα 60 s, όπου ο υποπληθυσμός των ανθεκτικών κυττάρων βρισκόταν περίπου στα 10⁵ CFU/mL, ενώ ο συνολικός πληθυσμός είχε μείνει σταθερός. Και οι δύο βακτηριακοί πληθυσμοί μηδενίστηκαν για t=300 s. Η μέγιστη συγκέντρωση υπεροξικού οξέος που εφαρμόστηκε ήταν τα 40 ppm (**Διαγράμματα C και F**). Στους 20 °C (**Διάγραμμα C**) παρατηρείται άμεση αδρανοποίηση των βακτηριακών πληθυσμών στο t=0 s, μιας και πληθυσμός των ολικών βακτηρίων μειώνεται κατά 1 log CFU/mL, ενώ ο

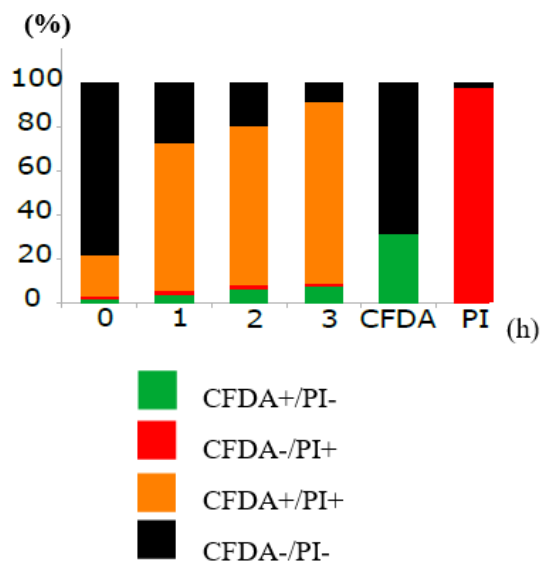
υποπληθυσμός των ανθεκτικών βακτηρίων κατά 2 log CFU/mL. Στο t=30 s οι δύο πληθυσμοί μειώνονται κατά ακόμα 1 log CFU/mL ο καθένας και η βακτηριακή θανάτωση συνεχίζεται μέχρι τα 300 s, όπου δεν μετρήθηκαν αποικίες. Στους 4°C (Διάγραμμα F) η θανάτωση του πληθυσμού συμβαίνει με μικρότερο ρυθμό έως τα 60 s, όταν ο υποπληθυσμός των ανθεκτικών βακτηρίων κατέρχεται απότομα από τους ~5,5 log CFU/mL στον ~1,5 log CFU/mL. Στην ίδια χρονική στιγμή το μέγεθος του συνολικού μειώνεται από ~6 log CFU/mL στους 4,5 log CFU/mL, ενώ από τα 300 s και έπειτα δεν παρατηρήθηκαν καλλιεργήσιμα βακτήρια.

2. Μελέτη της κατάστασης ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα μέσω μικροσκοπίας φθορισμού

Η αξιολόγηση της επαγωγής των κυττάρων της *L. monocytogenes* που επώαστηκαν σε 40 rpm υπεροξικού οξέος, σε θερμοκρασία 20 °C στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα», διενεργήθηκε με την παράλληλη εκτίμηση της καλλιεργησιμότητάς τους σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye και της βιωσιμότητάς τους μέσω της παρατήρησής τους σε μικροσκόπιο φθορισμού, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2. Τα αποτελέσματα των εν λόγω πειραμάτων παρατίθενται στα παρακάτω ιστογράμματα.



Διάγραμμα 2.1. Αξιολόγηση της καλλιιεργησιμότητας των κυττάρων του στελέχους Scott A του βακτηρίου *L. monocytogenes* κατά την επώασή τους σε συνθήκες καταπόνησης στους 20 °C για 0, 1, 2 και 3h. Ο παράγοντας καταπόνησης είναι το απολυμαντικό PAA το οποίο είναι διαλυμένο σε Ringer με αποτέλεσμα να προκύπτει διάλυμα με τελική συγκέντρωση 40 ppm. Οι ράβδοι με σκούρο γκρι χρωματισμό αντιστοιχούν στον ολικό πληθυσμό του βακτηρίου, ο οποίος υπολογίστηκε έπειτα από μέτρηση των αποικιών στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye. Οι ράβδοι με ανοιχτό γκρι χρωματισμό αντιστοιχούν στον ανθεκτικό στη δράση του απολυμαντικού υποπληθυσμό του βακτηρίου, ο οποίος υπολογίστηκε έπειτα από τη μέτρηση των αποικιών στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye+5% NaCl. Οι ράβδοι μαύρου χρώματος αντιστοιχούν στον πληθυσμό του βακτηρίου πριν την εφαρμογή της καταπόνησης, ο οποίος είναι $\sim 10^9$ CFU/mL. Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει το όριο πάνω από το οποίο γίνεται η καταμέτρηση των αποικιών, το οποίο έχει οριστεί στα 10 CFU/mL.

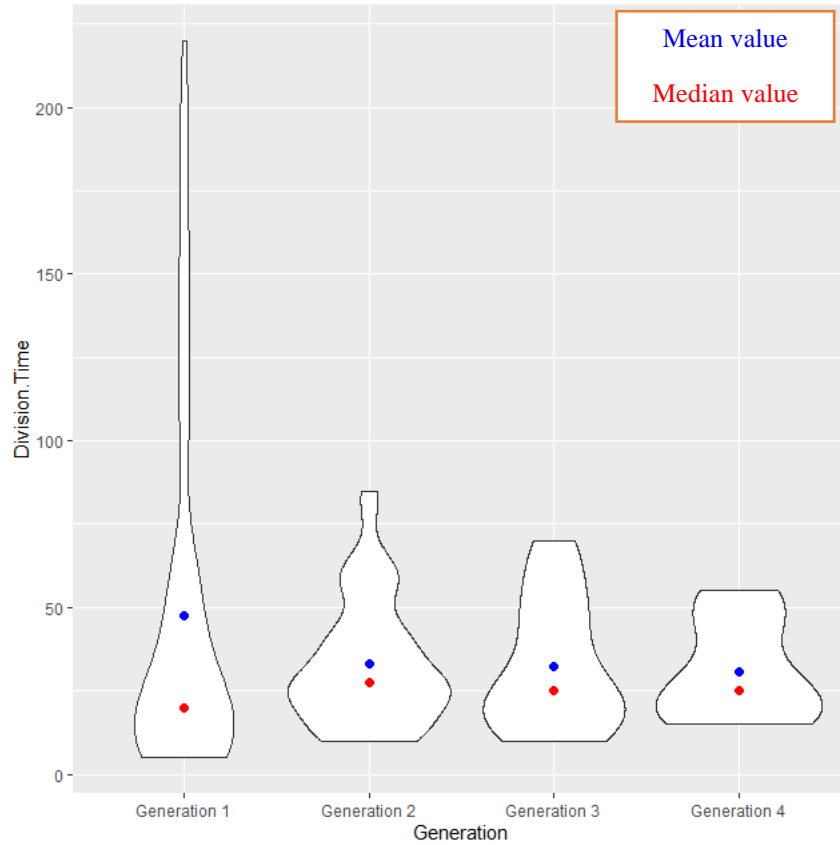


Διάγραμμα 2.2. Ποσοστό διαφορετικά χρωσμένων κυττάρων του στελέχους Scott A του βακτηρίου *L. monocytogenes* κατά την επώασή τους σε συνθήκες καταπόνησης στους 20 °C για 0, 1, 2 και 3h, ανά οπτικό πεδίο. Ο παράγοντας καταπόνησης είναι το απολυμαντικό PAA το οποίο είναι διαλυμένο σε Ringer με αποτέλεσμα να προκύπτει διάλυμα με τελική συγκέντρωση 40 ppm. Τα πράσινα χρωσμένα τμήματα των ράβδων αντιστοιχούν στα μεταβολικά ενεργά κύτταρα, τα οποία θεωρούνται ως ζωντανά. Τα ερυθρά τμήματα αντιστοιχούν στο ποσοστό των νεκρών κυττάρων, των οποίων η πλασματική μεμβράνη έχει τραυματιστεί. Τα πορτοκαλί πεδία αντιστοιχούν στο ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται σε μια ενδιάμεση κατάσταση και για αυτό βάφονται και από τις δύο χρωστικές, ενώ τα μαύρα τμήματα των ράβδων προδίδουν την ύπαρξη μη χρωσμένων βακτηριακών κυττάρων. Οι δύο τελευταίες από τα δεξιά στήλες αντιστοιχούν στο θετικό (πράσινη στήλη) και στο αρνητικό διάλυμα ελέγχου (ερυθρή στήλη). Για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας αποτυπώθηκαν 4 διαφορετικά οπτικά πεδία και κάθε πείραμα έγιναν δύο ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.

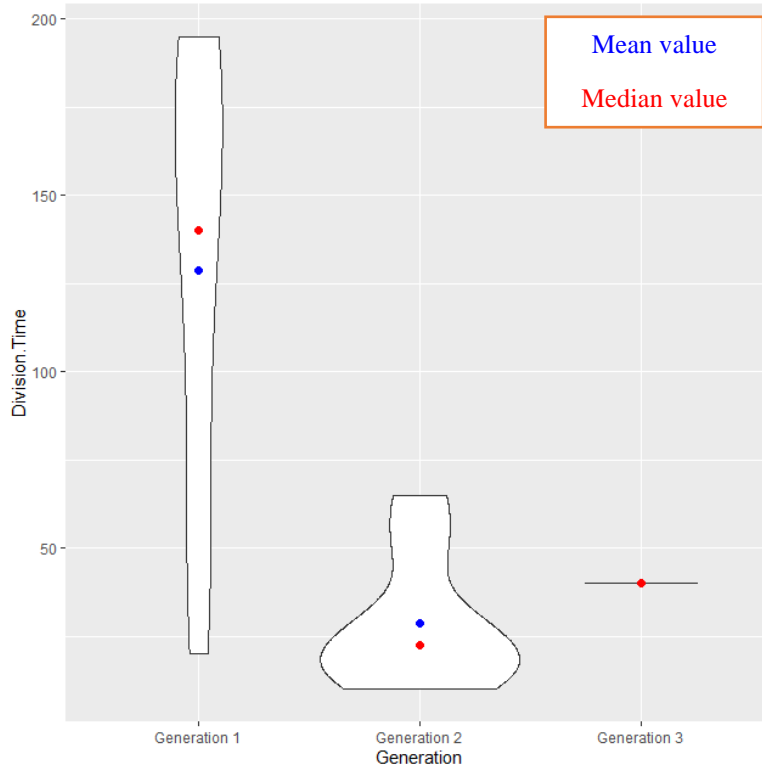
Στο Διάγραμμα 2.1. παρατηρείται ταχεία μείωση τόσο του ολικού πληθυσμού των καλλιεργήσιμων κυττάρων, όσο και του υποπληθυσμού των τραυματισμένων κυττάρων έως την τρίτη ώρα, όπου έπαψαν να αναπτύσσονται αποικίες. Επομένως, σε αυτή τη χρονική στιγμή τα κύτταρα ήταν νεκρά και/ή μη καλλιεργήσιμα. Από το Διάγραμμα 2.2., το οποίο προέκυψε έπειτα από ανάλυση των αποτελεσμάτων της μικροσκοπίας φθορισμού διαφαίνεται η εξέλιξη του πληθυσμού των ζωντανών και των νεκρών κυττάρων, καθώς και αυτών που βρίσκονται σε ένα ενδιάμεσο στάδιο της πορείας προς το θάνατο. Από τα παραπάνω σχήματα διαπιστώνεται η συνύπαρξη και των τριών βακτηριακών υποπληθυσμών σε κάθε χρονική στιγμή. Αν και το ποσοστό των νεκρών κυττάρων παραμένει σταθερό σε κάθε δειγματοληψία, το ποσοστό των διπλά χρωσμένων κυττάρων αυξάνεται κατά περισσότερο από τέσσερις φορές έως την τρίτη ώρα, από 20% έως περίπου 90% επί του συνόλου των κυττάρων. Αυξητική είναι και η εξέλιξη του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων, το οποίο φτάνει προσεγγίζει το 10% στο τέλος της καταπόνησης σε σύγκριση με τη σχεδόν μηδενική τιμή του στη μηδενική στιγμή. Από τη σύγκριση των δύο διαγραμμάτων και πιο συγκεκριμένα των αποτελεσμάτων της τελευταίας δειγματοληψίας, συμπεραίνεται πως αν και ο βακτηριακός πληθυσμός δεν περιείχε κύτταρα που θα μπορούσαν να δώσουν αποικίες, περιλάμβανε ζωντανά κύτταρα, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων.

3. Κυτταρική ανάκαμψη

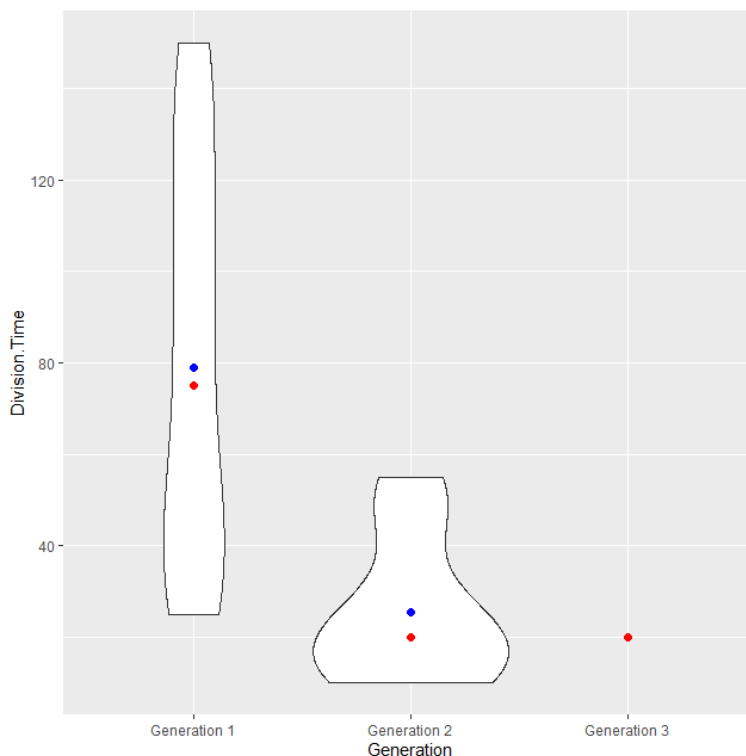
Μελετήθηκε η ικανότητα των πιθανώς υπαρκτών Ζώντων Αλλά Μη Καλλιεργήσιμων βακτηρίων της *L. monocytogenes* να ανακάμπτουν από την κατάσταση ληθάργου και να επανέρχονται στην αρχική φυσιολογική τους κατάσταση. Για το σκοπό 10^9 CFU/mL του μικροοργανισμού επώαστηκαν στο διάλυμα καταπόνησης PAA (0, 20, 30 και 40 ppm) για τρεις ώρες και στη συνέχεια εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA-Ye, όπου και παρέμειναν για διάστημα έξι ωρών σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά το διάστημα αυτό, τα βακτηριακά κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού, με τη χρήση βιντεομικροσκοπίας. Οι ανωτέρω συγκεντρώσεις PAA επιλέχθηκαν λόγω της απουσίας αποικιών στα τρυβλία που είχαν επωαστεί κάτω από αυτές τις συγκεντρώσεις απολυμαντικού (πλην του μάρτυρα) (βλ. Διάγραμμα 1.3.). Επομένως, θεωρήθηκε πιθανή η ύπαρξη βακτηρίων στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα». Τα αποτελέσματα των πειραμάτων φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 2.1. Ανάκαμψη του πληθυσμού των μη καλλιεργήσιμων κυττάρων του στελέχους Scott A του βακτηρίου *L. monocytogenes*, έπειτα από την επώασή του σε ισότονο διάλυμα Ringer στους 20 °C για 3 h και ακολούθως την παραμονή του σε υπόστρωμα TSA-Ye για 6h. Απεικονίζεται η κατανομή του χρόνου διαίρεσης σε κάθε γενεά βακτηρίων. Η μπλε κουκκίδα αντιστοιχεί στη μέση τιμή του χρόνου διαίρεσης του πληθυσμού σε κάθε γενεά και η κόκκινη κουκκίδα στη διάμεση τιμή.



Διάγραμμα 2.2. Ανάκαμψη του πληθυσμού των μη καλλιεργήσιμων κυττάρων του στελέχους Scott A του βακτηρίου *L. monocytogenes*, έπειτα από την επώασή του σε ισότονο διάλυμα Ringer που περιέχει το απολυμαντικό PAA σε συγκέντρωση 20 ppm, στους 20 °C για 3 h και ακολούθως την παραμονή του σε υπόστρωμα TSA-Υε για 6h. Απεικονίζεται η κατανομή του χρόνου διαίρεσης σε κάθε γενεά βακτηρίων. Η μπλε κουκκίδα αντιστοιχεί στη μέση τιμή του χρόνου διαίρεσης του πληθυσμού σε κάθε γενεά και η κόκκινη κουκκίδα στη διάμεση τιμή.



Διάγραμμα 2.3. Ανάκαμψη του πληθυσμού των μη καλλιεργήσιμων κυττάρων του στελέχους Scott A του βακτηρίου *L. monocytogenes*, έπειτα από την επώασή του σε ισότονο διάλυμα Ringer που περιέχει το απολυμαντικό PAA σε συγκέντρωση 30 ppm, στους 20 °C για 3 h και ακολούθως την παραμονή του σε υπόστρωμα TSA-Ye για 6h. Απεικονίζεται η κατανομή του χρόνου διαίρεσης σε κάθε γενεά βακτηρίων. Η μπλε κουκκίδα αντιστοιχεί στη μέση τιμή του χρόνου διαίρεσης του πληθυσμού σε κάθε γενεά και η κόκκινη κουκκίδα στη διάμεση τιμή.

Στα παραπάνω διαγράμματα απεικονίζεται η εξέλιξη του χρόνου που χρειάζεται για την διαίρεση των βακτηριακών κυττάρων στην πάροδο των γενεών. Στο Διάγραμμα 2.1. παρουσιάζεται η εν λόγω εξέλιξη όταν τα κύτταρα δεν έχουν δεχθεί οξειδωτική καταπόνηση από το PAA. Στα επόμενα δύο διαγράμματα (Διαγράμματα 2.2. και 2.3.), απεικονίζεται η συσχέτιση χρόνου διαίρεσης και αριθμού γενεάς στην περίπτωση που ο βακτηριακός πληθυσμός έχει εκτεθεί σε διαλύματα υπεροξικού οξέος 20 και 30 ppm για τρεις ώρες πριν από την έναρξη της παρατήρησης με βιντεομικροσκοπίας. Αν και το πείραμα εκπονήθηκε και στα 40 ppm, δεν παρατηρήθηκε ανάκαμψη και επομένως δεν κατέστη δυνατή η διαγραμματική απεικόνιση.

Στο Διάγραμμα 2.1., το οποίο αντιστοιχεί στο μάρτυρα, ο χρόνος διαίρεσης στην πρώτη γενεά είναι γύρω στα 47 min, στη δεύτερη και στην τρίτη γύρω στα 33 min και στην τέταρτη στα 30 min. Αν και η διασπορά είναι ιδιαίτερα μεγάλη στην πρώτη γενεά, η κατανομή είναι αρκετά ακανόνιστη, καθώς η πλειονότητα των βακτηρίων χαρακτηρίζεται από σχετικά σύντομους χρόνους διαίρεσης, διαμορφώνοντας ανάλογα και τη μέση τιμή. Με την πάροδο των γενεών, η διασπορά των χρόνων διαίρεσης των βακτηρίων μειώνεται καθώς οι τιμές συσσωρεύονται γύρω από το μέσο όρο.

Στα 20 ppm απολυμαντικού (Διάγραμμα 2.2.) ο αρχικός χρόνος διαίρεσης (γενεά 1) είναι αρκετά μεγαλύτερος σε σύγκριση με το μάρτυρα, περίπου 129 min, αλλά μειώνεται απότομα στη δεύτερη γενεά, όπου και φτάνει στα 30 min. Στην τρίτη γενεά η τιμή του χρόνου αυξάνεται και πάλι, στα 40 min, ενώ στην τέταρτη γενεά δεν παρατηρείται ανάπτυξη. Η διασπορά των τιμών είναι επίσης αυξημένη στο επίπεδο της πρώτης γενεάς, αλλά ελαττώνεται και πάλι όπως στο Διάγραμμα 2.1., έως ότου όλα τα κύτταρα να αποκτήσουν τον ίδιο χρόνο διαίρεσης. Επιπλέον, η κατανομή των χρόνων διαίρεσης ήταν πιο συμμετρική, τουλάχιστον στην πρώτη γενεά, μιας στις επόμενες οι τιμές συγκεντρώνονται στο κατώτερο τμήμα του γραφήματος.

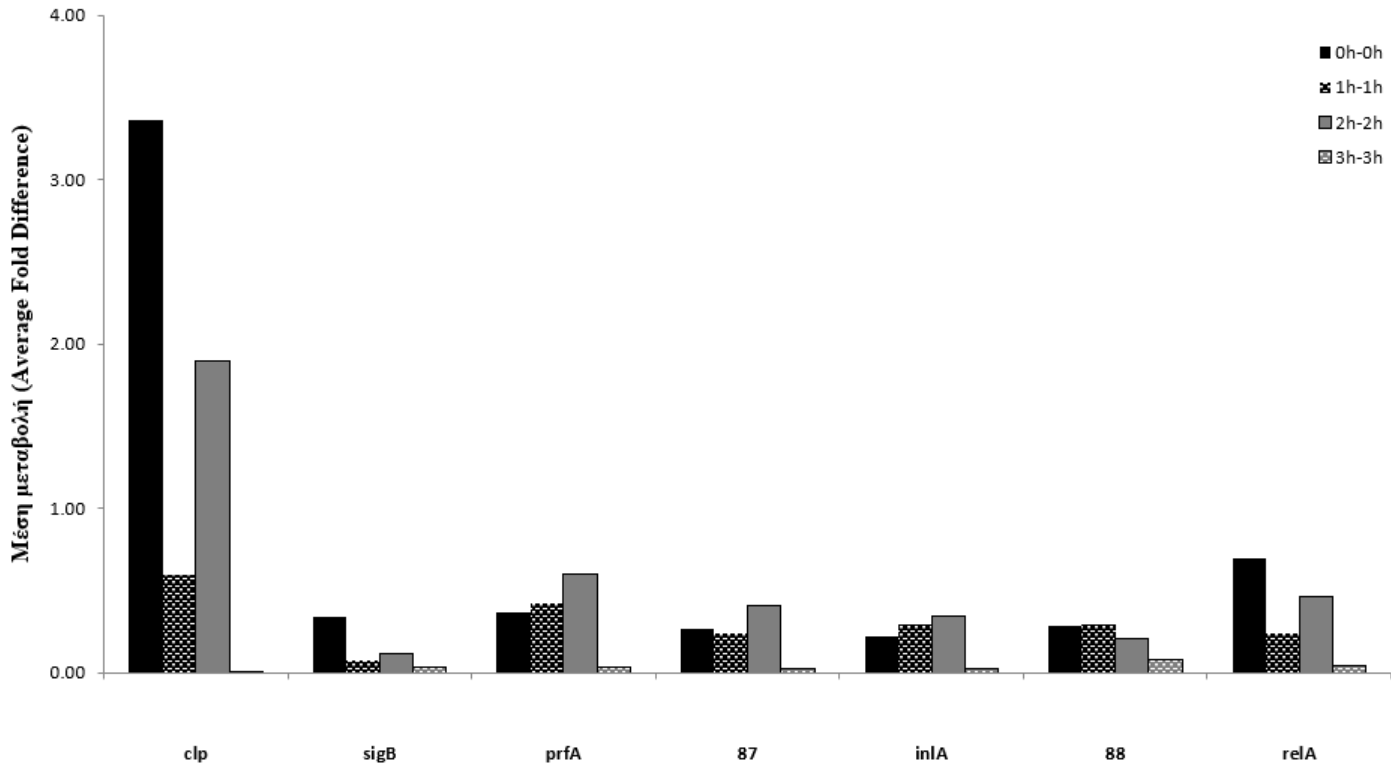
Όταν εφαρμόστηκαν 30 ppm απολυμαντικού, η βακτηριακή διαίρεση πραγματοποιήθηκε βραδύτερα στα αρχικά στάδια (≈ 79 min), αλλά επιταχύνθηκε γρήγορα στα 20 min έως την τρίτη γενεά, ενώ ακολούθως μηδενίστηκε. Το ίδιο ισχύει και για τη διακύμανση των τιμών, ενώ παρατηρήθηκε και απώλεια συμμετρίας. Οι μέσες, οι διάμεσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των κατανομών και των τριών διαγραμμάτων παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1. Χαρακτηριστικά κατανομών χρόνων κυτταρικής διαίρεσης κατά την ανάκαμψη βακτηρίων από την κατάσταση τραυματισμού, έπειτα από την έκθεσή τους στο απολυμαντικό ΡΑΑ.

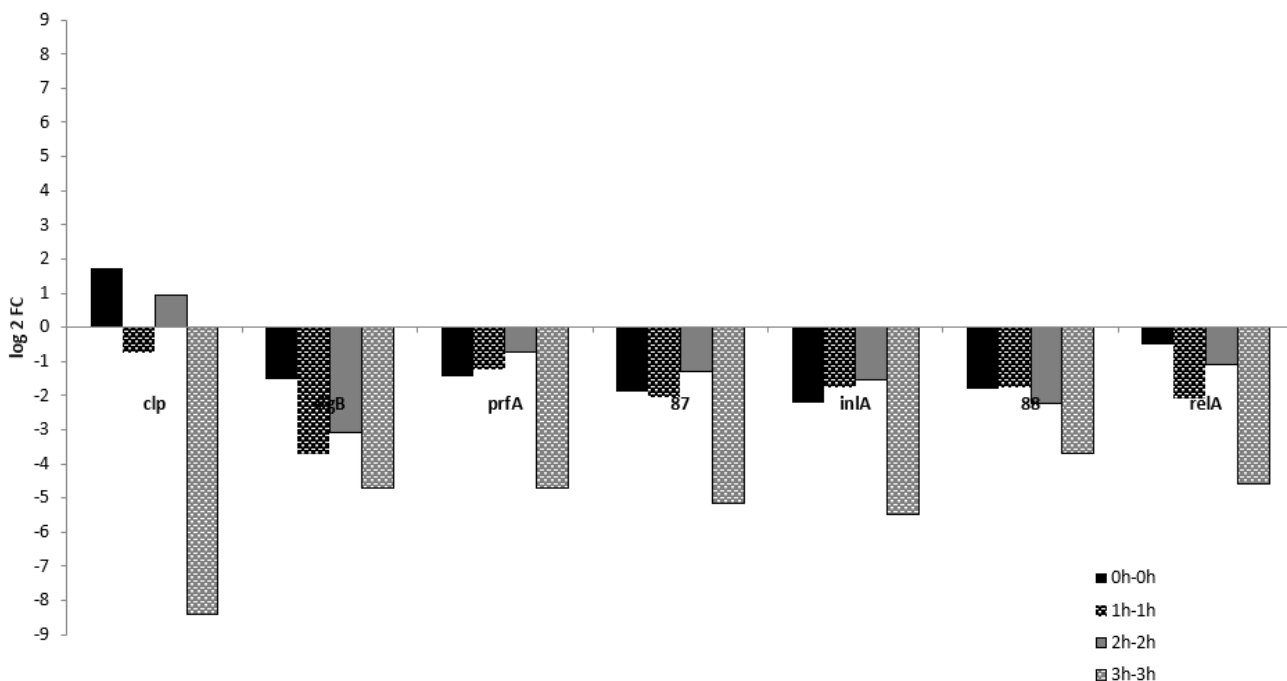
	Μάρτυρας				20 ppm				30 ppm			
	1 ^η γενεά	2 ^η γενεά	3 ^η γενεά	4 ^η γενεά	1 ^η γενεά	2 ^η γενεά	3 ^η γενεά	4 ^η γενεά	1 ^η γενεά	2 ^η γενεά	3 ^η γενεά	4 ^η γενεά
Μέση Τιμή (min)	47.6712	32.9347	32.5	30.5556	128.75	28.75	40	Α.Δ.	79	25.4546	20	ΑΔ
Τυπική Απόκλιση	55.1581	18.9319	19.3802	15.5009	62.0163	19.2263	0	Α.Δ.	43.0797	16.0397	0	ΑΔ
Διάμεσος (min)	20	27.5	25	25	140	22.5	40	Α.Δ.	75	20	20	ΑΔ

4. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που συνδέονται με την κατάσταση VBNC

Τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα. Οι τιμές που αντιστοιχούν σε κάθε στήλη του κάθε ενός από αυτά συνιστούν τις μέσες τιμές των αποτελεσμάτων των δύο ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων.



Διάγραμμα 4.1.: Απόλυτη τιμή της διαφοράς στην έκφραση των γονιδίων *clpP*, *sigB*, *prfA*, *lmo0887*, *inlA*, *lmo0888* και *relA* του στελέχους Scott A του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes* σε συνθήκες καταπόνησης στους 20 °C για 0, 1, 2 και 3h. Ο παράγοντας καταπόνησης είναι το απολυμαντικό PAA το οποίο είναι διαλυμένο σε Ringer με αποτέλεσμα να προκύπτει διάλυμα με τελική συγκέντρωση 40 ppm.



Διάγραμμα 4.2.: Σχετική γονιδιακή έκφραση των γονιδίων *clpP*, *sigB*, *prfA*, *lmo0887*, *inlA*, *lmo0888* και *relA* του στελέχους Scott A του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes* σε συνθήκες καταπόνησης στους 20 °C για 0, 1, 2 και 3h. Οι τιμές της έκφρασης εκφράζονται ως log2. Ο παράγοντας καταπόνησης είναι το απολυμαντικό PAA το οποίο είναι διαλυμένο σε Ringer με αποτέλεσμα να προκύπτει διάλυμα με τελική συγκέντρωση 40 ppm.

Στο Διάγραμμα 4.1. απεικονίζεται η μεταβολή της έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων κατά απόλυτη τιμή. Για αυτό το λόγο, όλες οι στήλες εκτείνονται πάνω από τον άξονα χ'χ, ανεξάρτητα αν τα γονίδια στα οποία αντιστοιχούν υπόκεινται ενίσχυση ή αποσιώπηση. Είναι φανερό, ότι σημαντική διαφορά παρουσιάζεται στην έκφραση μόνο του γονιδίου *clpP* κατά τη μηδενική και οριακά κατά την δεύτερη ώρα. Παράλληλα, εξετάζοντας το Διάγραμμα 4.2. διαπιστώνεται πως το ίδιο γονίδιο κατά τη μηδενική και την δεύτερη ώρα είναι το μοναδικό που παρουσιάζει υπερέκφραση. Αντίθετα, το *clpP* κατά την πρώτη και την τρίτη ώρα υπο-εκφράζεται. Όσον αφορά τα υπόλοιπα γονίδια, όλα δέχονται μείωση στη έκφρασή τους.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σχεδιασμός και η εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας μελέτης βασίστηκε σε δύο επιστημονικές παραδοχές. Η πρώτη είναι ότι η θανάτωση των βακτηρίων δεν αποτελεί απλώς ένα ενδεχόμενο της δυαδικής κατάστασης ζωή/θάνατος, αλλά το τελευταίο στάδιο μιας πορείας ολοένα μειούμενης ζωτικότητας. Τα κύτταρα δηλαδή δεν γίνονται απλά από ζωντανά νεκρά, αλλά περνούν μέσα από διαδοχικά στάδια τραυματισμού και ληθάργου, μέχρι να φτάσουν στην θανάτωση. Η δεύτερη παραδοχή είναι ότι μία από αυτές τις ενδιάμεσες καταστάσεις μειωμένης ζωτικότητας είναι η κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» ή VBNC, στην οποία μεταπίπτουν ορισμένα μη σποριογόνα βακτήρια όταν βρίσκονται κάτω από συνθήκες καταπόνησης. Προκειμένου λοιπόν να μελετηθεί η επαγωγή του βακτηριακού πληθυσμού της *L. monocytogenes* (στέλεχος Scott A) στην κατάσταση VBNC, πραγματοποιήθηκε επώασή του σε διαλύματα δύο απολυμαντικών: υποχλωριώδους νατρίου (SH) σε συγκεντρώσεις 0.5, 5 και 10 ppm και υπεροξικού οξέος (PAA) σε συγκεντρώσεις 0.5, 5, 10, 20, 30 και 40 ppm, στους 20 °C και στους 4 °C.

Ένα από τα αρχικά στάδια στην πορεία προς τη θανάτωση είναι ο κυτταρικός τραυματισμός. Από την παρατήρηση των αποτελεσμάτων της αξιολόγησης του υποθανάτιου τραυματισμού και της βακτηριακής θανάτωσης διαφαίνεται αρχικά ότι η θανάτωση των βακτηρίων επιταχύνθηκε όσο αυξήθηκε η συγκέντρωση του απολυμαντικού. Αυτό ισχύει τόσο για το SH, όσο και για το PAA. Ειδικά, στην περίπτωση του SH ο πληθυσμός των καλλιεργήσιμων βακτηρίων εξαλείφθηκε στα 10 ppm, ήδη από την έναρξη της καταπόνησης και στις δύο θερμοκρασίες (Διάγραμμα 1.1.). Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά που ανέφεραν οι Gu et al. στην έρευνά τους το 2020, καθώς διαπίστωσαν την πλήρη απώλεια της καλλιεργησιμότητας κυττάρων *L. monocytogenes* που εμβολιάστηκαν ως μέρος μικτού βακτηριακού πληθυσμού με μέγεθος $\approx 10^6$ CFU/mL σε νερό πλύσης φυλλωδών λαχανικών, έπειτα από την επαφή τους για 30s με 10 ppm ελεύθερου χλωρίου. Αντίθετα, το PAA δε φαίνεται να είναι τόσο δραστικό, καθώς καταμετρήθηκαν αποικίες έως και 300 s μετά από την έναρξη της καταπόνησης σε 5 και 10 ppm απολυμαντικού στους 20 °C, ενώ χρειάστηκαν τουλάχιστον 20 ppm PAA και 1800 s καταπόνησης για την πλήρη εξάλειψη των αποικιών του συνολικού πληθυσμού. Μάλιστα, ακόμα και όταν το PAA εφαρμόστηκε στη μέγιστη συγκέντρωση των 40 ppm, απαιτήθηκαν τουλάχιστον 300 s για να σταματήσουν να αναπτύσσονται αποικίες. Σημειώνεται βέβαια, ότι ο υποπληθυσμός των ανθεκτικών στην καταπόνηση βακτηρίων μηδενίστηκε στα 10 ppm PAA, στους 4 °C. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο λόγω του μικρότερου μεγέθους του ανθεκτικού υποπληθυσμού.

Όσον αφορά στη σύγκριση μεταξύ των δύο απολυμαντικών, αν και αρκετοί ερευνητές αναφέρουν ότι το υποχλωριώδες νάτριο και το υπεροξικό οξύ έχουν παρεμφερή δράση, ορισμένοι υποστηρίζουν ότι το SH είναι δραστικότερο, ενώ άλλοι θεωρούν ότι το PAA δρα ταχύτερα (Rossoni and Gaylarde, 2000; Veschetti, Ottaviani and Bonadonna, 2005; McFadden et al., 2017; Bonetta et al., 2021). Οι διαφορές ως προς την αποτελεσματικότητα των οξειδωτικών αυτών απολυμαντικών αποδίδονται -πέρα από τις διαφορές στους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς και στο λοιπό πειραματικό σχεδιασμό- στους διαφορετικούς μηχανισμούς

δράσης. Συγκεκριμένα, οι McFadden et al. (2017) υποστηρίζουν πως οι ROS που παράγονται από το PAA επιτίθονται κυρίως στις σουλφυδρυλικές ομάδες των πρωτεϊνικών μορίων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, ενώ το SH επηρεάζει μεγαλύτερο αριθμό μορίων, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια ή ανόργανες ενώσεις, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο εκλεκτικό. Βέβαια, το γεγονός ότι οι μηχανισμοί δράσης των δύο απολυμαντικών δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, δημιουργεί προβλήματα στην ερμηνεία του φαινομένου.

Αξιοσημείωτη είναι και επίδραση της θερμοκρασίας στη βακτηριακή αδρανοποίηση, καθώς από την παρατήρηση των διαγραμμάτων 1.1, 1.2. και 1.3. διαπιστώνεται ότι αυτή επιταχύνθηκε στους 20 °C σε σύγκριση με τους 4 °C και για τα δύο απολυμαντικά. Αυτό πιθανότατα προκύπτει σε μεγάλο βαθμό από την επίδραση της θερμοκρασίας στην κινητική των αντιδράσεων. Οι Cheswick et al. (2020) χαρακτηριστικά αναφέρουν ότι στις χαμηλές θερμοκρασίες όχι μόνο λαμβάνουν χώρα λιγότερες συγκρούσεις μεταξύ των μορίων του ελεύθερου χλωρίου και των κυτταρικών μεμβρανών, αλλά και ότι η διαλυτότητα του και συνεπώς η ικανότητά του να διαπερνά τις μεμβράνες, μειώνεται. Δεν αποκλείεται το ίδιο να ισχύει και για το υπεροξικό οξύ. Επιπλέον αναφέρουν ότι υπάρχει και μικρότερη βακτηριακή κινητικότητα. Με τα παραπάνω συμφωνούν και τα αποτελέσματα των Norhana et al. (2010), οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση 100 ppm υποχλωριώδους νατρίου σε πλαγκτονικά και μη κύτταρα *L. monocytogenes* και *Salmonella spp.*, καθώς και των Manso et al. (2020), οι οποίοι αναφέρουν αυξημένη αντίσταση της *L. monocytogenes* στην οξειδωτική καταπόνηση στους 10 °C συγκριτικά με τους 37 °C.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η εξέλιξη των υποπληθυσμών των κυττάρων που παράγουν αποικίες, παρά το συνδυασμό της οξειδωτικής, της ωσμωτικής -λόγω του NaCl- καταπόνησης και της καταπόνησης λιμού, αυξανόμενης της συγκέντρωσης των απολυμαντικών και στις δύο θερμοκρασίες. Αναφέρθηκε ότι το SH προξενεί ταχύτερη κυτταρική θανάτωση σε σχέση με το PAA. Όντως, η επίδραση του χλωριούχου απολυμαντικού είναι άμεση όταν αυτό εφαρμόζεται σε συγκεντρώσεις 5 και 10 ppm, καθώς τόσο ο ολικός όσο και ο ανθεκτικός υποπληθυσμός μειώνονται ταχύτατα. Αυτό έχει ως συνέπεια την ύπαρξη ανθεκτικών κυττάρων μόνο μέχρι το χρονικό σημείο των 30 s, όταν εφαρμόζονται 5 ppm απολυμαντικού στις θερμοκρασίες των 20 °C και των 4 °C (B και E, Διάγραμμα 1.1.1.). Αντίθετα, στην περίπτωση του PAA η βακτηριακή θανάτωση συμβαίνει πιο σταδιακά και ο κυτταρικός τραυματισμός είναι εντονότερος. Αυτός ήταν και ο λόγος για τον οποίο το PAA επιλέχθηκε να μελετηθεί περαιτέρω, ως προς την ικανότητα επαγωγής των κυττάρων του στελέχους Scott A της *L. monocytogenes* στην κατάσταση VBNC.

Η ταυτόχρονη παρουσία ζωντανών κυττάρων και η απουσία αποικιών στα τρυβλία αποδεικνύει την επαγωγή βακτηριακών κυττάρων *L. monocytogenes* στην κατάσταση «ζώντα Αλλά Μη Καλλιεργήσιμα» κατά την επώασή τους υπό την παρουσία 40 ppm υπεροξικού οξέος, στους 20 °C για τρεις ώρες. Συγκεκριμένα, η παρουσία των VBNC κυττάρων ανιχνεύτηκε στην τελευταία δειγματοληψία, που έλαβε χώρα την τρίτη ώρα της επώασης. Τα παρόντα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά που έχουν παρουσιαστεί σε προηγούμενες μελέτες, όπως σε αυτή των Truchado, et al. (2021), όπου αναφέρεται η επαγωγή 10^8 - 10^9 CFU/mL *L. monocytogenes*, του ορότυπου 1/2a στην κατάσταση «ζώντα Αλλά Μη καλλιεργήσιμα», έπειτα από επαφή με 80 mL

PAA, σε νερό έκπλυσης λαχανικών για ένα λεπτό. Στη συγκεκριμένη μελέτη η ανίχνευση των μη καλλιεργήσιμων κυττάρων επετεύχθη με PMA+EMA-qPCR, καθώς ο πληθυσμός των καλλιεργήσιμων βακτηρίων δεν έφτασε ποτέ στο μηδέν. Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των πειραμάτων μας και των μετρήσεων των Truchado et al. μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στον πειραματικό σχεδιασμό, π.χ. στη συγκέντρωση του απολυμαντικού ή στο χρόνο επώασης, αλλά και στα στελέχη του μικροοργανισμού που χρησιμοποιήθηκαν. Μάλιστα, το ίδιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και για άλλα βακτήρια, όπως το *E. coli*, 10^8 - 10^9 CFU/mL του οποίου μετέπεσαν στην κατάσταση VBNC, έπειτα από επαφή με συγκεντρώσεις 0,5 έως 1,5 ppm υπεροξικού οξέος για δέκα λεπτά (McFadden et al., 2017)

Αξίζει ακόμη να σχολιαστεί η αύξηση του ποσοστού των πράσινα χρωσμένων, ζωντανών κυττάρων κατά τη διάρκεια της καταπόνησης, δεδομένου ότι αναμενόταν αύξηση του ποσοστού τραυματισμού και, ενδεχομένως, των νεκρών κυττάρων. Η εξήγηση του εν λόγω φαινομένου πιθανότατα εντοπίζεται στο μηχανισμό δράσης της όξινης καρβοξυφλουροσκεΐνης ή cFDA. Υπενθυμίζεται πως το συγκεκριμένο φθοροφόρο, χάρη στον λιπόφιλο χαρακτήρα του, διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες και εισέρχεται στα βακτήρια, όπου αποικοδομείται από τις ενδογενείς εστεράσες και μετατρέπεται σε καρβοξυφλουροσκεΐνη (cF) (Gorokhova, Mattsson and Sundström, 2012; Gao and Liu, 2014). Καθώς η cF δεν δύναται να διαπεράσει την κυτταροπλασματική μεμβράνη, παραμένει στον ενδοκυτταρικό χώρο του βακτηρίου, χρωματίζοντάς τον πράσινο (Gorokhova, Mattsson and Sundström, 2012). Η cFDA, πέρα από τη φθορίζουσα χρώση των κυττάρων, χρησιμοποιείται και ως δείκτης μεταβολής του pH (Graber et al., 1986; Breeuwer and Abee, 2000). Επιπλέον, η συγκράτηση της cF εξαρτάται από τη σύσταση του μέσου σε θρεπτικά συστατικά. Οι (Bunthof et al., 2000), έδειξαν την αποβολή cF από κύτταρα *L. lactis* στα οποία είχε προστεθεί λακτόζη, μέσω ενός συστήματος μεταφοράς ATP. Εικάζεται πως το ίδιο σύστημα μεταφοράς ήταν ενεργοποιημένο στην περίπτωση των κυττάρων *L. monocytogenes*, όσο αυτά επωάζονταν για 18 h στο μέσο ανάπτυξης TSB-Ye το οποίο περιείχε 2,5 g/L γλυκόζη και χαρακτηριζόταν από pH=5,5. Αντίθετα, το διάλυμα καταπόνησης PAA, στο οποίο τα κύτταρα μεταφέρθηκαν μετά τη λήξη των 18 h, διέθετε pH=7,5 και δεν περιείχε θρεπτικά συστατικά. Θεωρείται λοιπόν, πως αρκετά κύτταρα δεν πρόλαβαν να προσαρμοστούν στις μεταβαλλόμενες συνθήκες σύστασης και pH, λ.χ. απενεργοποιώντας το σύστημα μεταφοράς ATP, με αποτέλεσμα να αποβάλλουν τη χρωστική και να μην καταφέρουν να χρωστούν πράσινα. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από την αύξηση των πράσινων κυττάρων κατά τη διάρκεια της καταπόνησης, οπότε είναι φυσιολογικό να υπήρξε μεγαλύτερο ποσοστό προσαρμογής.

Όσον αφορά την ανάκαμψη των μη καλλιεργήσιμων κυττάρων ύστερα από έκθεση των βακτηρίων σε τρεις συγκεντρώσεις του διαλύματος καταπόνησης (20, 30 και 40 ppm PAA), αυτή απεικονίζεται στα Διαγράμματα 2.2 και 2.3. Τα διαγράμματα αυτά περιγράφουν την βακτηριακή ανάκαμψη στην περίπτωση των 20 και των 30 ppm απολυμαντικού, καθώς στη μέγιστη συγκέντρωση δεν παρατηρήθηκε αύξηση. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα γραφήματα συνοδεύονται από το Διάγραμμα 2.1., στο οποίο διαφαίνεται η ανάκαμψη κυττάρων που δεν εκτέθηκαν στο διάλυμα της καταπόνησης. Το γεγονός ότι παρατηρήθηκε βακτηριακή ανάπτυξη έπειτα από έκθεση σε 20 και 30 ppm υπεροξικού οξέος έρχεται σε αντίθεση με αρκετές

παλαιότερες μελέτες που αφορούν το παραπάνω απολυμαντικό. Οι Jolivet-Gougeon et al. (2006) αναφέρουν την ανικανότητα μη καλλιεργήσιμων κυττάρων *L. monocytogenes* να ανακάμψουν κατά την επώασή τους σε θρεπτικό ζωμό BHI, στους 37 °C για πέντε εικοσιτετράωρα, αφού πρώτα είχαν εκτεθεί σε διαλύματα PAA συγκεντρώσεων 7, 25 και 20 ppm, στους 15 °C για 1h. Παρομοίως, στην έρευνα των Dupont and Augustin (2011) αναγράφεται η απουσία ανάκαμψης κυττάρων του ίδιου βακτηρίου, τα οποία είχαν επωαστεί σε 200 ppm υπεροξικού οξέος, στους 26° C για 15min και εν συνεχεία παρέμειναν σε TSB-Ye και ½FB για 6h. Επιπλέον, στη μελέτη των Gu et al. (2020) αναφέρεται ότι κανένα από τα έξι στελέχη *Listeria* που εξετάστηκαν, δεν κατάφερε να ανακάμψει έπειτα από την κατεργασία του με συγκεντρώσεις απολυμαντικού από 0,5 έως 100 ppm, και παρόλο που είχε υπήρχαν ισχυρές ενδείξεις για την ύπαρξη στον πληθυσμό «Ζώντων Αλλά Μη Καλλιεργήσιμων» βακτηρίων. Η ικανότητα του βακτηρίου *L. monocytogenes* για ανάκαμψη έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες (Carpellier et al., 2007), που όμως δεν αφορούν το PAA. Κατά πάσα πιθανότητα η επίτευξη της ανάκαμψης εξαρτάται από μηχανισμούς, οι οποίοι δεν περιορίζονται στην απομάκρυνση της οξειδωτικής καταπόνησης ή στη διαμόρφωση της κατάλληλης θερμοκρασίας. Ενδεικτικά, στα πειράματα της παρούσας έρευνας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στατικής φάσης, τα οποία είναι γενικά ανθεκτικά στην καταπόνηση, σε αντίθεση με τα περισσότερα πειράματα που περιγράφονται στη βιβλιογραφία, όπου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα εκθετικής φάσης ανάπτυξης.

Από τα διαγράμματα φαίνεται πως ο χρόνος διαίρεσης των βακτηριακών πληθυσμών μειώνεται σε κάθε γενεά έως ότου αποκτήσει μια συγκεκριμένη τιμή. Η τιμή αυτή διαφέρει ανάλογα με τη συγκέντρωση του απολυμαντικού που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της καταπόνησης. Όντως, η μέση τιμή του χρόνου διαίρεσης στην περίπτωση του μάρτυρα σταθεροποιήθηκε σε μεγαλύτερο επίπεδο σε σχέση με την τιμή του χρόνου διαίρεσης στα 20 ppm PAA και με αυτήν στα 30 ppm. Η αιτία πιθανώς εντοπίζεται στην ένταση του τραυματισμού που προκλήθηκε σε κάθε περίπτωση, γεγονός που δεν επιτρέπει στα βακτήρια να αυξηθούν με το ρυθμό των μη καταπονημένων κυττάρων.

Επιπροσθέτως, ο χρόνος κυτταρικής διαίρεσης παρουσιάζει διακύμανση, η οποία με την πάροδο των γενεών μειώνεται και εν τέλει μηδενίζεται. Η διακύμανση αυτή πιθανότατα είναι ενδεικτική της εγγενούς ετερογένειας των κυττάρων που απαρτίζουν τον πληθυσμό καθώς και του διαφορετικού επιπέδου υποθανάτιου τραυματισμού. Ενδέχεται η ένταση του τραυματισμού να σχετίζεται με τη διάρκεια της φάσης προσαρμογής. Έτσι, οι η διακύμανση των χρόνων διαίρεσης πιθανώς απορρέει από τη διακύμανση της διάρκειας της φάσης προσαρμογής στον πληθυσμό των τραυματισμένων βακτηρίων και για αυτό εξαλείφεται στις επόμενες γενεές που πλέον δε φέρουν τόσο έντονη τη «μνήμη» της καταπόνησης (Sibanda and Buys, 2017).

Στο Διάγραμμα 4.1. απεικονίζεται η μεταβολή της έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων κατά απόλυτη τιμή. Για αυτό το λόγο, όλες οι στήλες εκτείνονται πάνω από τον άξονα χ'χ, ανεξάρτητα αν τα γονίδια στα οποία αντιστοιχούν υπόκεινται ενίσχυση ή αποσιώπηση. Είναι φανερό, ότι σημαντική διαφορά παρουσιάζεται στην έκφραση μόνο του γονιδίου *clpP* κατά τη μηδενική και οριακά κατά την δεύτερη ώρα,. Παράλληλα, εξετάζοντας το Διάγραμμα 4.2.

διαπιστώνεται πως το ίδιο γονίδιο κατά τη μηδενική και την δεύτερη ώρα είναι το μοναδικό που παρουσιάζει υπερέκφραση. Αντίθετα, το *clpP* κατά την πρώτη και την τρίτη ώρα υποεκφράζεται. Όσον αφορά τα υπόλοιπα γονίδια, όλα δέχονται μείωση στη έκφρασή τους. Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων που βρίσκονται στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα» δύναται να προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς που τίθενται σε λειτουργία κατά των βακτηρίων σε αυτή. Τα αποτελέσματα της qPCR που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν την υπο-έκφραση της έκφρασης των περισσότερων από τα γονίδια που μελετήθηκαν. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αντίθετο από το προσδοκώμενο, ιδιαίτερα για τα γονίδια όπως το *sigB* και το *relA* και τα γονίδια *lmo0087* και *lmo0088* τα οποία κωδικοποιούν το σύστημα πρωτεϊνών MazEF, μιας και η έκφρασή τους αναμενόταν να ενισχυθεί κάτω από τις δυσμενείς συνθήκες επώασης των κυττάρων. Αντίθετα, παλαιότερες έρευνες αναφέρουν την αύξηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στην καταπόνηση σε βακτηριακά κύτταρα που εκτίθενται σε συνθήκες στρες, όπως του γονιδίου *sigB* που κωδικοποιεί τον παράγοντα σ^B που αποτελεί τον κύριο παράγοντα απόκρισης στην καταπόνηση για το βακτήριο *L. monocytogenes*. Για παράδειγμα οι Pleitner et al. (2014) αναφέρουν την ενίσχυση της σύνθεσης του παράγοντα σ^B σε κύτταρα *L. monocytogenes* τα οποία εκτέθηκαν στο οξειδωτικό απολυμαντικό ClO_2 . Από την άλλη πλευρά, στη μελέτη των Boura et al. (2016) διαφαίνεται η πιθανή βιολογική χρησιμότητα της υπο-έκφρασης του γονιδίου, καθώς παρατηρήθηκε πως μεταλλάγματα κυττάρων *L. monocytogenes* που δεν μπορούσαν να συνθέσουν τον παράγοντα σ^B , παρουσίαζαν αυξημένη ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες που υφίσταντο κατά την επώασή τους σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου. Όσον αφορά τη μείωση του ρυθμού έκφρασης των γονιδίων μολυσματικότητας, φαίνεται πως στη συγκεκριμένη περίπτωση το βακτήριο δε διατήρησε την παθογένειά του, ενώ βρισκόταν στην κατάσταση VBNC. Η παρατήρηση αυτή έχει γίνει και σε προηγούμενες έρευνες, όπως σε αυτή των Orsi, Bakker and Wiedmann, το 2011, χωρίς ωστόσο αυτό να αποκλείει την πιθανότητα τα βακτήρια να ανακτήσουν την ικανότητα να προξενούν ασθένεια με την ανάκαμψή τους.

Το μόνο από τα εξεταζόμενα γονίδια που παρουσιάζει υπερέκφραση είναι το *clpP*, το οποίο κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεάση, ενώ εικάζεται ότι έχει ρόλο και στη ρύθμιση της μολυσματικότητας ορισμένων βακτηρίων, χωρίς όμως αυτός να έχει αποσαφηνιστεί ακόμα (Frees, Gerth and Ingmer, 2014). Η ικανότητα της ClpP να ενεργοποιείται σε συνθήκες καταπόνησης, αποικοδομώντας τις μη λειτουργικές πλέον πρωτεΐνες -που ειδήλλως θα μπορούσαν να προκαλέσουν πρόβλημα στην κυτταρική λειτουργία- εξηγεί επαρκώς το αποτέλεσμα του πειράματος. Συνολικά, το γεγονός ότι πολλά από τα γονίδια που αναμενόταν να υπερεκφράζονται φαίνεται να αποσιωπώνται μπορεί πιθανώς να αποδίδεται στον πειραματικό σχεδιασμό και, συγκεκριμένα, στον ορισμό των χρόνων δειγματοληψίας, καθώς είναι δυνατό η υπερέκφραση των γονιδίων όπως το *sigB* να έλαβε χώρα σε κάποια ενδιάμεση χρονική στιγμή μεταξύ της δεύτερης και της τρίτης δειγματοληψίας, όποτε δεν πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις. Αντίθετα, η υπο-έκφραση των γονιδίων κατά την τρίτη ώρα δειγματοληψίας ενδέχεται να προκύπτει από τη σταδιακή παύση των κυτταρικών συστημάτων, καθώς τα βακτήρια λόγω της

έντονης καταπόνησης, έχουν προχωρήσει σε βαθύτερο στάδιο ληθάργου, κατά την πορεία τους προς το θάνατο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης οδηγούν στην εξαγωγή σημαντικών πληροφοριών σχετικά με την απόκριση του βακτηρίου *L. monocytogenes* έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης που προξενούν τα απολυμαντικά υποχλωριώδες νάτριο και υπεροξικό οξύ, όταν αυτή συνδυάζεται με καταπόνηση λόγω λιμού, καθώς και με ωσμωτικό στρες. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε πως, στις παραπάνω πειραματικές συνθήκες, το υποχλωριώδες νάτριο είναι αποτελεσματικότερο απολυμαντικό από το υπεροξικό οξύ, χρειάστηκαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις για να παύση της ανάπτυξης των αποικιών. Επιπλέον, η περεταίρω μελέτη της επίδρασης του υπεροξικού οξέος έδειξε την ικανότητα του εν λόγω απολυμαντικού να επάγει τα βακτηριακά κύτταρα στην κατάσταση «ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα», όταν εφαρμοστεί στην κατάλληλη συγκέντρωση που στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν τα 40 ppm. Πρέπει βέβαια να τονιστεί πως στα παραπάνω πειράματα δεν κατέστη δυνατή η ανάκαμψη των VBNC κυττάρων, χωρίς αυτό να αποκλείει την ανάκαμψή τους σε διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης ή προώθησης της ανάκαμψης. Τέλος, η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των βακτηρίων που βρισκόντουσαν σε φάση ληθάργου κατέδειξε την αρνητική έκφραση των εξεταζόμενων γονιδίων που σχετίζονται με τη απόκριση στην καταπόνηση, πλην του *clpP*. Η υπο-έκφραση των γονιδίων μολυσματικότητας φανερώνει την απώλεια παθογένειας των κυττάρων της *L. monocytogenes*, στην κατάσταση VBNC.

Θα παρουσίαζε ιδιαίτερο ενδιαφέρον η περεταίρω εξέταση της επίδρασης του υποχλωριώδους νατρίου στα κύτταρα της *L. monocytogenes*, αναφορικά με την κατάσταση VBNC, καθώς και η χρήση διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσης της βιωσιμότητας, π.χ. μέσω PMA-qPCR. Επιπλέον, θα μπορούσε να δοκιμαστεί κατά πόσο είναι δυνατή η ανάκαμψη των κυττάρων του βακτηρίου από το λήθαργο κάτω από διαφορετικές συνθήκες ανάκαμψης, π.χ. υπό την παρουσία RpfS ή «αυτο-επαγωγών ανάπτυξης», κάτω από πανομοιότυπες πειραματικές συνθήκες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Διεθνής Βιβλιογραφία:

Afari, G.K., Liu, H. and Hung, Y.C. (2019) “The effect of produce washing using electrolyzed water on the induction of the viable but non-culturable (VBNC) state in *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7,” *LWT*, 110, pp. 275–282. doi:10.1016/j.lwt.2019.04.089.

Alleron, L. *et al.* (2013) “VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins,” *Water Research*, 47(17), pp. 6606–6617. doi:10.1016/j.watres.2013.08.032.

Ao, X. wei *et al.* (2021) “Peracetic acid-based advanced oxidation processes for decontamination and disinfection of water: A review,” *Water Research*, 188. doi:10.1016/j.watres.2020.116479.

Arcari, T. *et al.* (2020) “Comparative review of the responses of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* to low pH stress,” *Genes*, 11(11), pp. 1–21. doi:10.3390/genes11111330.

Asakura, H. *et al.* (2006) “Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state,” *Environmental Microbiology*, 9(4), pp. 869–879. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01206.x.

Asakura, H. *et al.* (2008) “Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state,” *Research in Microbiology*, 159(9–10), pp. 709–717. doi:10.1016/j.resmic.2008.08.005.

Atkinson, G.C., Tenson, T. and Hauryliuk, V. (2011) “The RelA/SpoT Homolog (RSH) superfamily: Distribution and functional evolution of ppgpp synthetases and hydrolases across the tree of life,” *PLoS ONE*, 6(8). doi:10.1371/journal.pone.0023479.

- Ayrapetyan, M. *et al.* (2015) “Viable but nonculturable and persister cells coexist stochastically and are induced by human serum,” *Infection and Immunity*, 83(11), pp. 4194–4203. doi:10.1128/IAI.00404-15.
- Ayrapetyan, M. and Oliver, J.D. (2016) “The viable but non-culturable state and its relevance in food safety,” *Current Opinion in Food Science*, 8, pp. 127–133. doi:10.1016/j.cofs.2016.04.010.
- Balomenos, A.D. *et al.* (2017) “Image analysis driven single-cell analytics for systems microbiology,” *BMC Systems Biology*, 11(1). doi:10.1186/s12918-017-0399-z.
- Bansal, M. *et al.* (2018) “Listeria monocytogenes response to sublethal chlorine induced oxidative stress on homologous and heterologous stress adaptation,” *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG). doi:10.3389/fmicb.2018.02050.
- Barer, M.R. *et al.* (1993) “The viable but non-culturable hypothesis and medical microbiology,” *Reviews in medical microbiology*, 4(4), pp. 183–191.
- Bennett, H.J. *et al.* (2007) “Characterization of relA and codY mutants of Listeria monocytogenes: Identification of the CodY regulon and its role in virulence,” *Molecular Microbiology*, 63(5), pp. 1453–1467. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05597.x.
- Besnard, V. *et al.* (2002) “Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in Listeria monocytogenes,” *Veterinary Research*, 33(4), pp. 359–370. doi:10.1051/vetres:2002022.
- Bhunia, A.K. (2008) “Listeria monocytogenes,” in Heldman, D.R. (ed.) *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. 1st edn. New York: Springer-Verlag, p. undefined-276.
- Bierne, H. *et al.* (2007) “Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in Listeria monocytogenes,” *Microbes and Infection*, 9(10), pp. 1156–1166. doi:10.1016/j.micinf.2007.05.003.
- Bonazzi, M., Lecuit, M. and Cossart, P. (2009) “Listeria monocytogenes internalin and E-cadherin: from bench to bedside.,” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(4), pp. 1–15. doi:10.1101/cshperspect.a003087.
- Bonetta, Silvia *et al.* (2021) “Comparison of UV, peracetic acid and sodium hypochlorite treatment in the disinfection of urban wastewater,” *Pathogens*, 10(2), pp. 1–11. doi:10.3390/pathogens10020182.
- Boor, K.J. (2006) “Bacterial stress responses: What doesn’t kill them can make them stronger,” *PLoS Biology*, pp. 0018–0020. doi:10.1371/journal.pbio.0040023.
- Boura, M. *et al.* (2016) “Loss of sigB in listeria monocytogenes strains egd-e and 10403s confers hyperresistance to hydrogen peroxide in stationary phase under aerobic conditions,” *Applied and Environmental Microbiology*, 82(15), pp. 4584–4591. doi:10.1128/AEM.00709-16.

- Boura, M., Brenson, D. and Karatzas, K.A.G. (2020) "A novel role for the glutamate decarboxylase system in *Listeria monocytogenes*; protection against oxidative stress," *Food Microbiology*, 85. doi:10.1016/j.fm.2019.103284.
- Brauge, T. *et al.* (2020) "Treatment with disinfectants may induce an increase in viable but non culturable populations of *Listeria monocytogenes* in biofilms formed in smoked salmon processing environments," *Food Microbiology*, 92. doi:10.1016/j.fm.2020.103548.
- Breeuwer, P. and Abee, T. (2000) "Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques," *International Journal of Food Microbiology*, 55(1–3), pp. 193–200. Available at: www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro.
- Bridier, A. *et al.* (2015) "Fluorescence-based tools for single-cell approaches in food microbiology," *International Journal of Food Microbiology*, 213, pp. 2–16. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.003.
- Bucur, F.I. *et al.* (2018) "Resistance of *Listeria monocytogenes* to Stress Conditions Encountered in Food and food processing environments," *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV). 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. Available at: www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro.
- Bustin, S.A. *et al.* (2005) "Quantitative real-time RT-PCR - A perspective," *Journal of Molecular Endocrinology*, pp. 597–601. doi:10.1677/jme.1.01755.
- Cappelier, J.M. *et al.* (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," *Veterinary Research*, 38(4), pp. 573–583. doi:10.1051/vetres:2007017.
- Chen, S. *et al.* (2018) "Induction of *Escherichia coli* into a VBNC state through chlorination/chloramination and differences in characteristics of the bacterium between states," *Water Research*, 142, pp. 279–288. doi:10.1016/j.watres.2018.05.055.
- Cheng, J.H. *et al.* (2020) "Foodborne bacterial stress responses to exogenous reactive oxygen species (ROS) induced by cold plasma treatments," *Trends in Food Science and Technology*, 103, pp. 239–247. doi:10.1016/j.tifs.2020.07.022.
- Cheswick, R. *et al.* (2020) "Chlorine disinfection of drinking water assessed by flow cytometry: New insights," *Environmental Technology and Innovation*, 19. doi:10.1016/j.eti.2020.101032.
- Cotter, P.D., Gahan, C.G.M. and Hill, C. (2001) "A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid," *Molecular Microbiology*, 40(2), pp. 465–475. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02398.x.
- Curtis, T.D. *et al.* (2017) "The influence of the Toxin/antitoxin mazEF on growth and survival of *Listeria monocytogenes* under stress," *Toxins*, 9(1). doi:10.3390/toxins9010031.

- Curtis, T.D., Takeuchi, I. and Knudsen, G.M. (no date) “The Influence of the Toxin/Antitoxin mazEF on Growth and Survival of *Listeria monocytogenes* under Stress.” doi:10.3390/toxins9010031.
- Denyer, S.P. and Stewart, G.S.A. B. (1998) “Mechanisms of action of disinfectants,” *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(3–4), pp. 261–268.
- Dorak, T.M. (2006) *Real-time PCR*. 1st edn. Edited by E. Owen, K. Lyons, and K. Henderson. New York, Abingdon: Taylor and Francis Group.
- Dorey, A. *et al.* (2019) “Role and regulation of the stress activated sigma factor sigma B (σB) in the saprophytic and host-associated life stages of *Listeria monocytogenes*,” in Gadd, J.M. and Sariaslani, S. (eds) *Advances in Applied Microbiology*. 1st edn. Cambridge: Academic Press Inc., pp. 1–48. doi:10.1016/bs.aambs.2018.11.001.
- Dreux, N. *et al.* (2007) “Viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* on parsley leaves and absence of recovery to a culturable state,” *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), pp. 1272–1281. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03351.x.
- Dupont, C. and Augustin, J.C. (2011) “Relationship between the culturability of stressed *Listeria monocytogenes* cells in non-selective and selective culture media and the cellular esterase activity measured by solid phase cytometry,” *Journal of Microbiological Methods*, 87(3), pp. 295–301. doi:10.1016/j.mimet.2011.08.018.
- Dussurget, O. (2008) “New Insights into Determinants of *Listeria Monocytogenes* Virulence,” in *International Review of Cell and Molecular Biology*, pp. 1–38. doi:10.1016/S1937-6448(08)01401-9.
- Duze, S.T., Marimani, M. and Patel, M. (2021) “Tolerance of *Listeria monocytogenes* to biocides used in food processing environments,” *Food Microbiology*. Academic Press. doi:10.1016/j.fm.2021.103758.
- EFSA BIOHAZ Panel *et al.* (2018) “*Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU,” *EFSA Journal*, 16(1), p. undefined-173. doi:10.2903/j.efsa.2018.5134.
- Erkmen, O. (2022) “Injured microorganisms and viable but nonculturable cells,” in *Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments*. Elsevier, pp. 65–71. doi:10.1016/B978-0-323-91651-6.00014-8.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2020) *Listeriosis: Annual epidemiological report for 2017*. Stockholm.
- European Commission (2007) *European Union Risk Assessment Report CHLORINE*. Luxembourg. Available at: <http://europa.eu.int>.
- Ferro, S., Amorico, T. and Deo, P. (2018) “Role of food sanitising treatments in inducing the ‘viable but nonculturable’ state of microorganisms,” *Food Control*. Elsevier Ltd, pp. 321–329. doi:10.1016/j.foodcont.2018.04.016.

Food and Agriculture Organization and World Health Organization (2009) *Benifits and risks of the use of chlorine-containing disinfectants in food production and food processing*. Geneva: FAO.

Food and Drug Administration (2012) “*Listeria monocytogenes*,” in Lampel, K.A., Sufian, A.-K., and Cahill, S.M. (eds) *Bad Bug Book Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. 2nd edn. Maryland: Center for Food Safety and Applied Nutrition, FDA, pp. 99–103.

Frees, D., Gerth, U. and Ingmer, H. (2014) “Clp chaperones and proteases are central in stress survival, virulence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*,” *International Journal of Medical Microbiology*, 304(2), pp. 142–149. doi:10.1016/j.ijmm.2013.11.009.

Gahan, C.G.M. and Hill, C. (2014) “*Listeria monocytogenes*: Survival and adaptation in the gastrointestinal tract,” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(FEB). doi:10.3389/fcimb.2014.00009.

Gaillot, O. *et al.* (2000) “The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*,” *Molecular Microbiology*, 35(6), pp. 1286–1294. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01773.x.

Gao, H. and Liu, C. (2014) “Biochemical and morphological alteration of *Listeria monocytogenes* under environmental stress caused by chloramine-T and sodium hypochlorite,” *Food Control*, 46, pp. 455–461. doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.016.

Gao, R. *et al.* (2021) “The diagnostic tools for viable but nonculturable pathogens in the food industry: Current status and future prospects,” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), pp. 2146–2175. doi:10.1111/1541-4337.12695.

Gawande, M.H. *et al.* (2013) “Peroxyacetic Acid : A Potent Food Industry Sanitizer,” *Indian Food Industry Magazine*, 32(3), pp. 26–30. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/327100509>.

Gonzalez-Escalona, N. *et al.* (2006) “Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock,” *Environmental Microbiology*, 8(4). doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00943.x.

Gorokhova, E., Mattsson, L. and Sundström, A.M. (2012) “A comparison of TO-PRO-1 iodide and 5-CFDA-AM staining methods for assessing viability of planktonic algae with epifluorescence microscopy,” *Journal of Microbiological Methods*, 89(3), pp. 216–221. doi:10.1016/j.mimet.2012.03.005.

Graber, M.L. *et al.* (1986) “Characteristics of fluoroprobes for measuring intracellular pH,” *Analytical Biochemistry*, 156(1), pp. 202–212. doi:10.1016/0003-2697(86)90174-0.

- Gracias, K.S. and McKillip, J.L. (2004) “A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food,” *Canadian Journal of Microbiology*, 50(11), pp. 883–890. doi:10.1139/w04-080.
- Gu, G. *et al.* (2020) “Microbiome convergence following sanitizer treatment and identification of sanitizer resistant species from spinach and lettuce rinse water,” *International Journal of Food Microbiology*, 318. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108458.
- Hammes, F., Berney, M. and Egli, T. (2010) “Cultivation-independent assessment of bacterial viability,” *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 124, pp. 123–150. doi:10.1007/10_2010_95.
- Harp, D.L. (2002) *Curent Technology of Chlorine Analysis for Water and Wastewater*. Hach Company.
- Hett, E.C. *et al.* (2007) “A partner for the resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis*,” *Molecular Microbiology*, 66(3), pp. 658–668. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05945.x.
- Highmore, C.J. *et al.* (2018) “Viable-but-nonculturable *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Thompson induced by chlorine stress remain infectious,” *mBio*, 9(2). doi:10.1128/mBio.00540-18.
- Hill, C. *et al.* (2002) “Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing,” *International Dairy Journal*, 12(2–3), pp. 273–283.
- Huggett, J. *et al.* (2005) “Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations,” *Genes and Immunity*, pp. 279–284. doi:10.1038/sj.gene.6364190.
- Institute of Science and Technology Austria (2017) *Same but different: Researchers uncover a mechanism of how bacteria with the same genotype can show a different phenotype*, *ScienceDaily*. Available at: <www.sciencedaily.com/releases/2017/04/170420141755.htm> (Accessed: February 4, 2022).
- Inverted Microscope Solution DMi8 S Platform* (no date) *Leica Microsystems*. Available at: <https://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/p/leica-dmi8/> (Accessed: September 6, 2021).
- Jia, S. *et al.* (2020) “Disinfection characteristics of *Pseudomonas peli*, a chlorine-resistant bacterium isolated from a water supply network,” *Environmental Research*, 185. doi:10.1016/j.envres.2020.109417.
- Jia, Y. *et al.* (2020) “Alterations in the Cell Wall of *Rhodococcus biphenylivorans* Under Norfloxacin Stress,” *Frontiers in Microbiology*, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.554957.
- Jolivet-Gougeon, A. *et al.* (2006) “Virulence of viable but nonculturable *S. Typhimurium* LT2 after peracetic acid treatment,” *International Journal of Food Microbiology*, 112(2), pp. 147–152. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.019.

- Karatzas, K.A.G., Suur, L. and 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), pp. 3571–3579. doi:10.1128/AEM.00227-12.
- Kim, J.S. *et al.* (2018) "Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state," *Environmental Microbiology*, 20(6), pp. 2038–2048. doi:10.1111/1462-2920.14075.
- Kitis, M. (2004) "Disinfection of wastewater with peracetic acid: A review," *Environment International*, 30(1), pp. 47–55. doi:10.1016/S0160-4120(03)00147-8.
- Kusumoto, A., Miyashita, M. and Kawamoto, K. (2013) "Deletion in the C-terminal domain of ClpX delayed entry of *Salmonella enterica* into a viable but non-culturable state," *Research in Microbiology*, 164(4), pp. 335–341. doi:10.1016/j.resmic.2013.01.011.
- Lai, C.J. *et al.* (2009) "Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*," *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), p. undefined-124. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.023.
- Lecuit, M. (2020) "*Listeria monocytogenes*, a model in infection biology," *Cellular Microbiology*, 22(4). doi:10.1111/cmi.13186.
- Lee, C.H. *et al.* (2020) "Combined treatment of nut by-product extracts and peracetic acid against *Listeria monocytogenes* on red mustard and kale leaves," *LWT-Food Science and Technology*, 129. doi:10.1016/j.lwt.2020.109608.
- Lin, H. *et al.* (2017a) "Viable but non-culturable *E. coli* induced by low level chlorination have higher persistence to antibiotics than their culturable counterparts," *Environmental Pollution*, 230, pp. 242–249. doi:10.1016/j.envpol.2017.06.047.
- Lin, H. *et al.* (2017b) "Viable but non-culturable *E. coli* induced by low level chlorination have higher persistence to antibiotics than their culturable counterparts," *Environmental Pollution*, 230, pp. 242–249. doi:10.1016/j.envpol.2017.06.047.
- Liu, W. *et al.* (2017) "Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in loop-mediated isothermal amplification assay," *Scientific Reports*, 7. doi:10.1038/srep40125.
- Liu, Y. *et al.* (2010a) "Production of Shiga-like toxins in viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7," *Water Research*, 44(3), pp. 711–718. doi:10.1016/j.watres.2009.10.005.
- Liu, Y. *et al.* (2010b) "Production of Shiga-like toxins in viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7," *Water Research*, 44(3), pp. 711–718. doi:10.1016/j.watres.2009.10.005.
- Luo, Y. *et al.* (2018) "Association between bacterial survival and free chlorine concentration during commercial fresh-cut produce wash operation," *Food Microbiology*, 70, pp. 120–128. doi:10.1016/j.fm.2017.09.013.

- Luukkonen, T. and Pehkonen, S.O. (2017) “Peracids in water treatment: A critical review,” *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47(1), pp. 1–39. doi:10.1080/10643389.2016.1272343.
- Maisonneuve, E. and Gerdes, K. (2014) “Molecular mechanisms underlying bacterial persisters,” *Cell*, 157(3), pp. 539–548. doi:10.1016/j.cell.2014.02.050.
- Manso, B. *et al.* (2020) “The response to oxidative stress in *Listeria monocytogenes* is temperature dependent,” *Microorganisms*, 8(4). doi:10.3390/microorganisms8040521.
- McFadden, M. *et al.* (2017a) “Comparing peracetic acid and hypochlorite for disinfection of combined sewer overflows: Effects of suspended-solids and pH,” *Science of the Total Environment*, 599–600, pp. 533–539. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.04.179.
- McFadden, M. *et al.* (2017b) “Comparing peracetic acid and hypochlorite for disinfection of combined sewer overflows: Effects of suspended-solids and pH,” *Science of the Total Environment*, 599–600, pp. 533–539. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.04.179.
- Meireles, A., Giaouris, E. and Simões, M. (2016) “Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry,” *Food Research International*, 82, pp. 71–85. doi:10.1016/j.foodres.2016.01.021.
- Nicolò, M.S. *et al.* (2011) “Viable But Nonculturable State of Foodborne Pathogens in Grapefruit Juice: A Study of Laboratory,” *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(1), pp. 11–17. doi:10.1089/fpd.2009.0491.
- Nicolò, M.S. and Guglielmino, S.P.P. (2012) “Viable but Nonculturable Bacteria in Food,” in Maddock, J. (ed.) *Public Health- Methodology, Environmental and System Issues*. 1st edn. Rijeka: InTech Europe, pp. 189–216. Available at: www.intechopen.com.
- Nikolic, N. *et al.* (2018) “Autoregulation of mazEF expression underlies growth heterogeneity in bacterial populations,” *Nucleic Acids Research*, 46(6), pp. 2918–2931. doi:10.1093/nar/gky079.
- Nocker, A. *et al.* (2011) “Multiparameter viability assay for stress profiling applied to the food pathogen *Listeria monocytogenes* F2365,” *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), pp. 6433–6440. doi:10.1128/AEM.00142-11.
- Nocker, A., Sossa, K.E. and Camper, A.K. (2007) “Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR,” *Journal of Microbiological Methods*, 70(2), pp. 252–260. doi:10.1016/j.mimet.2007.04.014.
- Okada, Y. *et al.* (2002) “Cloning of *rel* from *Listeria monocytogenes* as an osmotolerance involvement gene,” *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), pp. 1541–1547. doi:10.1128/AEM.68.4.1541-1547.2002.
- Oliver, J.D. (2010) “Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria,” *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), pp. 415–425. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x.

- Oliver, J.D., Dagher, M. and Linden, K. (2005) “Induction of Escherichia coli and Salmonella typhimurium into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater,” *Journal of Water and Health*, 3(3), pp. 249–257. doi:10.2166/wh.2005.040.
- Orsi, R.H., Bakker, H.C. den and Wiedmann, M. (2011) “Listeria monocytogenes lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics,” *International Journal of Medical Microbiology*, pp. 79–96. doi:10.1016/j.ijmm.2010.05.002.
- Overney, A. *et al.* (2017) “Impact of environmental factors on the culturability and viability of Listeria monocytogenes under conditions encountered in food processing plants,” *International Journal of Food Microbiology*, 244, pp. 74–81. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.012.
- Pausch, P. *et al.* (2020) “Structural Basis for Regulation of the Opposing (p)ppGpp Synthetase and Hydrolase within the Stringent Response Orchestrator Rel,” *Cell Reports*, 32(11). doi:10.1016/j.celrep.2020.108157.
- Pfeffer, J.M. *et al.* (2006) “Peptidoglycan O acetylation and autolysin profile of Enterococcus faecalis in the viable but nonculturable state,” *Journal of Bacteriology*, 188(3), pp. 902–908. doi:10.1128/JB.188.3.902-908.2006.
- Pinto, D., Santos, M.A. and Chambel, L. (2015) “Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms,” *Critical Reviews in Microbiology*, 41(1), pp. 61–76. doi:10.3109/1040841X.2013.794127.
- Pleitner, A.M. *et al.* (2014) “Transcriptional and phenotypic responses of listeria monocytogenes to chlorine dioxide,” *Applied and Environmental Microbiology*, 80(9), pp. 2951–2963. doi:10.1128/AEM.00004-14.
- Priest, A.V., Shafraz, O. and Sivasankar, S. (2017) “Biophysical basis of cadherin mediated cell-cell adhesion,” *Experimental Cell Research*. Elsevier Inc., pp. 10–13. doi:10.1016/j.yexcr.2017.03.015.
- Ramamurthy, T. *et al.* (2014) “Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria,” *Frontiers in Public Health*, 2(JUL). doi:10.3389/fpubh.2014.00103.
- Real-time PCR handbook* (no date). Available at: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf> (Accessed: January 3, 2022).
- Reissbrodt, R. *et al.* (2002) “Resuscitation of Salmonella enterica serovar typhimurium and enterohemorrhagic Escherichia coli from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer,” *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), pp. 4788–4794. doi:10.1128/AEM.68.10.4788-4794.2002.
- Robben, C. *et al.* (2018) “Induction of the viable but non-culturable state in bacterial pathogens by household cleaners and inorganic salts,” *Scientific Reports*, 8(1). doi:10.1038/s41598-018-33595-5.

- Robbins, J.B. *et al.* (2005) “Elimination of *Listeria monocytogenes* Biofilms by Ozone, Chlorine, and Hydrogen Peroxide,” *Journal of Food Protection*, 68(3), pp. 494–498. Available at: http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/68/3/494/1673258/0362-028x-68_3_494.pdf.
- Ron, E.Z. (2006) “The Prokaryotes,” in Dworkin, M. *et al.* (eds) *The Prokaryotes*. 3rd edn. New York, NY: Springer New York, pp. 1012–1027. doi:10.1007/0-387-30742-7.
- Rossoni, E.M.M. and Gaylarde, C.C. (2000) *Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy*, *International Journal of Food Microbiology*. Available at: www.elsevier.nl.
- Rost, F. (2017) “Fluorescence microscopy, applications,” in Lindon, J.C., Tranter, G.E., and Koppenaal, D.W. (eds) *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. 3rd Pre. Ashfield: Academic Press, pp. 627-. doi:10.1016/B978-0-12-803224-4.00147-3.
- Ryan, S., Hill, C. and Gahan, C.G.M. (2008) “Acid Stress Responses in *Listeria monocytogenes*,” in Laskin, A., Gadd, J., and Sariaslani, S. (eds) *Advances in Applied Microbiology*. 1st edn. Cambridge: Academic Press Inc., pp. 67–91. doi:10.1016/S0065-2164(08)00603-5.
- Sanderson, M.J. *et al.* (2014) “Fluorescence microscopy,” *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(10), pp. 1042–1065. doi:10.1101/pdb.top071795.
- Schreibers, G. *et al.* (1991) “Overexpression of the reZA Gene in *Escherichia coli*,” *The journal of biological chemistry*, 266(6), pp. 3760–3767.
- Scotti, M. *et al.* (2007) “The PrfA virulence regulon,” *Microbes and Infection*, pp. 1196–1207. doi:10.1016/j.micinf.2007.05.007.
- Shleeva, M. *et al.* (2004) “Formation of ‘non-culturable’ cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation,” *Microbiology*, 150(6), pp. 1687–1697. doi:10.1099/mic.0.26893-0.
- Sibanda, T. and Buys, E.M. (2017) “Resuscitation and growth kinetics of sub-lethally injured *Listeria monocytogenes* strains following fluorescence activated cell sorting (FACS),” *Food Research International*, 100, pp. 150–158. doi:10.1016/j.foodres.2017.08.020.
- Signoretto, C. *et al.* (2000) “Cell Wall Chemical Composition of *Enterococcus faecalis* in the Viable but Nonculturable State,” *Applied and environmental microbiology*, 66(5), pp. 1953–1959.
- Skandamis, P.N. and 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(OCT). doi:10.3389/fmicb.2015.01178.
- Sousa, S. *et al.* (2004) “Unconventional myosin VIIa and vezatin, two proteins crucial for *Listeria* entry into epithelial cells,” *Journal of Cell Science*, 117(10), pp. 2121–2130. doi:10.1242/jcs.01066.

- Sperandio, V. *et al.* (2003) “Bacteria-host communication: The language of hormones,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), pp. 8951–8956. Available at: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1537100100.
- Stoller, A. *et al.* (2019) “Characteristics of listeria monocytogenes strains persisting in a meat processing facility over a 4-year period,” *Pathogens*, 8(1), pp. 32–47. doi:10.3390/pathogens8010032.
- Su, C.P., Jane, W.N. and Wong, H. chung (2013) “Changes of ultrastructure and stress tolerance of *Vibrio parahaemolyticus* upon entering viable but nonculturable state,” *International Journal of Food Microbiology*, 160(3), pp. 360–366. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.012.
- Sun, F. *et al.* (2008) “Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*,” *FEMS Microbiology Ecology*, 64(1), pp. 37–44. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00442.x.
- Trevors, J.T. (2011) “Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells,” *Journal of Microbiological Methods*, 86(2), pp. 266–273. doi:10.1016/j.mimet.2011.04.018.
- Tropp, B.E. (2014) *Principles of Molecular Biology*. 1st edn. Edited by B.E. Tropp. Burlington: Jones and Bartlett Learning.
- Truchado, P., Gil, M.I. and Allende, A. (2021) “Peroxyacetic acid and chlorine dioxide unlike chlorine induce viable but non-culturable (VBNC) stage of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in wash water,” *Food Microbiology*, 100. doi:10.1016/j.fm.2021.103866.
- Ultee, E. *et al.* (2019) “Stress-induced adaptive morphogenesis in bacteria,” in *Advances in Microbial Physiology*. Cambridge: Academic Press, pp. 97–141. doi:10.1016/bs.ampbs.2019.02.001.
- Veschetti, E., Ottaviani, M. and Bonadonna, L. (2005) *Support for the implementation of risk analysis in drinking water and bathing and management of the information system Water Portal View project Indoor air pollution View project*. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/7548419>.
- Wan Norhana, M.N. *et al.* (2010) “The effects of temperature, chlorine and acids on the survival of *Listeria* and *Salmonella* strains associated with uncooked shrimp carapace and cooked shrimp flesh,” *Food Microbiology*, 27(2), pp. 250–256. doi:10.1016/j.fm.2009.10.008.
- Wang, X. and Seed, B. (2003) “A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis,” *Nucleic Acids Research*, 31(24). doi:10.1093/nar/gng154.
- Wang, Y. *et al.* (2020) “Resuscitation, isolation and immobilization of bacterial species for efficient textile wastewater treatment: A critical review and update,” *Science of The Total Environment*, 730, p. 139034. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139034.

Wemekamp-Kamphuis, H.H. *et al.* (2004) “Identification of sigma factor σ^B -controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e,” *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), pp. 3457–3466. doi:10.1128/AEM.70.6.3457-3466.2004.

World Health Organization (2018) *Listeriosis*. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis> (Accessed: April 6, 2021).

Ye, C. *et al.* (2020) “Characterization and potential mechanisms of highly antibiotic tolerant VBNC *Escherichia coli* induced by low level chlorination,” *Scientific Reports*, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-58106-3.

Yousef, A.E. and Courtney, P.D. (2003) “Basics of Stress Adaptation and Implications in New-Generation Foods,” in Yousef, A.E. and Juneja, V.K. (eds) *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. 1st edn. Boca Raton: CRC Press LLC.

Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (2020) *Επιδημιολογικά δεδομένα για τη λιστερίωση στην Ελλάδα 2004-2019*.

Κοτζεκίδου-Ρουκά, Π. (2009) *Μικροβιολογία Τροφίμων*. 2nd edn. Θεσσαλονίκη: Γιαχούδης.

Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε. and Παπανικολάου, Γ. (2015) “Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης,” in *Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου*. Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, pp. 129–152.

