



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΠΟΤΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επίδραση της διαθεσιμότητας του οξυγόνου, της δομής και των θρεπτικών συστατικών διαφόρων υποστρωμάτων στις διαστελεχειακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria Monocytogenes*

Γεώργιος Ι. Αργυροκαστρίτης

Επιβλέπων καθηγητής:

Παναγιώτης Σκανδάμης, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2022

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επίδραση της διαθεσιμότητας του οξυγόνου, της δομής και των θρεπτικών συστατικών διαφόρων υποστρωμάτων στις διαστελεχειακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria Monocytogenes*

“Impact of oxygen availability, structure and nutrients of different substrates on growth and inter-strain interactions of *Listeria Monocytogenes* strains”

Γεώργιος Ι. Αργυροκαστρίτης

Εξεταστική επιτροπή:

Παναγιώτης Σκανδάμης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Ελευθέριος Δροσινός, Καθηγητής ΓΠΑ

Ευστάθιος Πανάγου, Καθηγητής ΓΠΑ

Επίδραση της διαθεσιμότητας του οξυγόνου, της δομής και των θρεπτικών συστατικών διαφόρων υποστρωμάτων στις διαστελεχειακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*

ΠΜΣ: Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας & Ασφάλειας Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής Του Ανθρώπου
Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων & Ποτών

Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Η

Η ανάπτυξη και οι αλληλεπιδράσεις διαφορετικών στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, που μπορεί να επιμολύνουν ταυτόχρονα το ίδιο τρόφιμο φαίνεται να επηρεάζονται από τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση των διαφορετικών υποστρωμάτων και της διαφορετικής διαθεσιμότητας οξυγόνου στην ανάπτυξη και τις διαστελεχειακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών στελεχών του *L. monocytogenes*.

Ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (για την επίτευξη της επιλεκτικής καταμέτρησης) που ανήκουν στους οροτύπους 4b (C5, ScottA) και 1/2b (PL25), εμβολιάστηκαν ($2.0 - 3.0 \log \text{CFU/mL}$ ή cm^2) σε καλλιέργειες ενός ή δύο στελεχών (1:1 αναλογία στελεχών), σε TSA-YE (ζυμός τρυπτικής σόγιας συμπληρωμένος με εκχύλισμα μαγιάς και προσθήκη 0,6% ή 1,2% άγαρ), σε υποστρώματα με βάση τα τυριά Ricotta και Camembert (1 μέρος τυροκομικού προϊόντος και 2 μέρη $\frac{1}{4}$ διάλυμα Ringer με την προσθήκη 0,6% ή 1,4% άγαρ) και σε τυροκομικά προϊόντα Ricotta και Camembert και αποθηκεύτηκαν στους 7°C ($n=3 \times 2$). Οι αερόβιες συνθήκες επιτεύχθηκαν με επιφανειακό ενοφθαλμισμό, ενώ η ενσωμάτωση στη μάζα του υποστρώματος αντιστοιχούσε στις υποξικές συνθήκες ($n=3 \times 2$).

Κατά τη μονοκαλλιέργεια τα στελέχη έφτασαν σε υψηλότερη κυτταρική πυκνότητα στο TSA-YE, ενώ μεταξύ των δύο γαλακτοκομικών προϊόντων (Ricotta και Camembert), τα υποστρώματα με βάση το Camembert ή το τυρί Camembert φαίνεται να ευνόησαν την ανάπτυξη του παθογόνου. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των στελεχών, όπως εκδηλώνονται με διαφορά στον τελικό πληθυσμό μεταξύ μονοκαλλιεργούμενων και συγκαλλιεργούμενων στελεχών, φάνηκε να επηρεάζονται από τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος, με τα στελέχη C5 και PL25 να καταστέλλουν την ανάπτυξη του ScottA. Η παρουσία του C5 ανέστειλε την ανάπτυξη του ScottA κατά 2,7 και 2,3 log units στη Ricotta και το Camembert, αντίστοιχα, ενώ η αναστολή του ScottA μετριάστηκε στο TSA-YE και στα υποστρώματα με βάση τα τυροκομικά προϊόντα. Η επίδραση του PL25 στον τελικό πληθυσμό του ScottA ήταν λιγότερο έντονη κατά τη διάρκεια της συγκαλλιέργειας στα διάφορα υποστρώματα που μελετήθηκαν και δεν ξεπέρασε το 1,0 log unit. Η αναστολή του ScottA τόσο από το C5 όσο

και από το PL25 ήταν πιο έντονη στα υποστρώματα με βάση τη Ricotta, υπό υποξικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος μπορούν να επηρεάσουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των στελεχών, ωστόσο, η επίδραση της δομής και της διαθεσιμότητας οξυγόνου εξαρτήθηκε από το υπόστρωμα και το συνδυασμό των στελεχών.

Η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των στελεχών κατά τη διάρκεια της συγκαλλιέργειας σε διαφορετικά υποστρώματα θα μπορούσε να βοηθήσει στην εξήγηση της αναντιστοιχίας μεταξύ κλινικών δειγμάτων και δειγμάτων τροφίμων, κατά τη διάρκεια των ερευνών για κρούσματα λιστερίωσης.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: *L. monocytogenes*, αλληλεπιδράσεις στελεχών, διαθεσιμότητα οξυγόνου, Ricotta, Camembert.

Impact of oxygen availability, structure and nutrients of different substrates on growth and inter-strain interactions of *L. monocytogenes* strains

MSc Quality Management & Food Safety Systems
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Quality Control & Hygiene

ABSTRACT

Growth and interactions of different *Listeria monocytogenes* strains, present simultaneously in the same food product, are affected by the matrix. Thus, the present study evaluated the effect of co-culture in/on different substrates, under different levels of oxygen availability, on growth and inter-strain interactions of *L. monocytogenes*.

Antibiotic-resistant (for selective enumeration) *L. monocytogenes* strains of serotypes 4b (C5 and ScottA) and 1/2b (PL25), were inoculated (2.0 – 3.0 log CFU/mL or cm²) in single or two-strain cultures (1:1 strain-ratio), in/on TSA-YE (Tryptic Soy Broth supplemented with Yeast Extract and 0.6% or 1.2% agar), in/on Ricotta and Camembert-based media (1 part dairy product and 2 parts ¼Ringer's solution supplemented with 0.6% or 1.4% agar) and in/on Ricotta and Camembert and stored at 7°C (n=3x2). *Aerobic conditions* were achieved with surface inoculation, while incorporation into the cheese mass or pour plated media, corresponded to *hypoxic conditions* (n=3x2).

Singly-cultured strains reached higher cell density in/on TSA-YE, while between the two dairy products, Camembert or Camembert-based media were more favorable substrates. Inter-strain interactions, as manifested by differences in the final population of singly and co-cultured strains, seemed to be affected by the characteristics of the substrate, with C5 and PL25 suppressing ScottA. The presence of C5 inhibit ScottA by 2.7 and 2.3 log units in Ricotta and Camembert, respectively, while the inhibition of ScottA mitigated in/on TSA-YE and the dairy-based substrates. The impact of PL25 on final population of ScottA was less pronounced during co-culture in/on the different studied substrates and did not exceed the 1 log unit. The inhibition of ScottA by both C5 and PL25 was more pronounced in/on Ricotta-based media, under hypoxic conditions. The results indicate that substrate nutrients may manipulate the inter-strain interactions, however the impact of structure and oxygen availability was substrate and combination of strains-dependent.

Investigating inter-strain interactions during co-culture in/on different substrates could assist in explaining the mismatch between clinical and food samples, during outbreak investigations.

Scientific area: Food Microbiology

Keywords: *L. Monocytogenes*, strain interactions, oxygen availability, Ricotta, Camembert.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ΑΒΣΤΡΑΚΤ	4
Ευχαριστίες	8
1. Εισαγωγή	9
1.1 Ο μικροοργανισμός <i>Listeria monocytogenes</i>	9
1.1.1 Ιστορική αναδρομή.....	9
1.1.2 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού	10
1.1.3 Η επιδημιολογία του μικροοργανισμού	11
1.1.4 Η λοιμοξιογόνος δράση του μικροοργανισμού	12
1.2 Η σημασία της διαθεσιμότητας του οξυγόνου	12
1.3 Τα τυριά	13
1.3.1 Τυρί Camembert.....	14
1.3.2 Τυροκομικό προϊόν Ricotta	15
1.4 Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας.....	15
1.4.1 Ανταγωνισμός μεταξύ στελεχών του παθογόνου <i>L. monocytogenes</i> με άλλα είδη του γένους <i>Listeria</i>	15
1.4.2 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του παθογόνου <i>L. monocytogenes</i> και άλλων μικροοργανισμών.....	21
1.5 Νομοθεσία	22
1.6 Σκοπός και Αντικείμενο της μελέτης	23
2. Υλικά και Μέθοδοι	24
2.1 Σχεδιασμός Πειράματος	24
2.1.1 Διερεύνηση της επίδρασης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ στελεχών στην ανάπτυξη του παθογόνου <i>Listeria monocytogenes</i> με ενσωμάτωση σε ημιστερεό θρεπτικό υπόστρωμα με προσθήκη ενός πηκτικού παράγοντα	24
2.1.2 Διερεύνηση της επίδρασης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ στελεχών στην ανάπτυξη του παθογόνου <i>Listeria monocytogenes</i> με ενσωμάτωση σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα	25
2.1.3 Διερεύνηση της επίδρασης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ στελεχών στην ανάπτυξη του παθογόνου <i>Listeria monocytogenes</i> σε υποστρώματα με βάση τα τυροκομικά προϊόντα Ricotta και Camembert (διαφορετική μικροδομής) υπό αερόβιες και υποξικές συνθήκες.....	26
2.1.4. Διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ στελεχών κατά τη διάρκεια της συγκαλλιέργειας στελεχών <i>L. monocytogenes</i> μέσα ή στην επιφάνεια τυριών.	27
2.2 Προετοιμασία του εμβολίου.....	27
2.3 Προετοιμασία δειγμάτων.....	28

2.3.1	Αερόβιες συνθήκες - καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα	28
2.3.2	Αερόβιες συνθήκες - καλλιέργεια σε εργαστηριακό υπόστρωμα τυριού.....	28
2.3.3	Υποξικές συνθήκες - καλλιέργεια σε εργαστηριακό υπόστρωμα τυριού	28
2.3.4	Υποξικές συνθήκες - καλλιέργεια σε ημιστερεό και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ..	29
2.4	Προετοιμασία και συντήρηση των Τυριών Ricotta και Camembert	29
2.4.1	Προετοιμασία δειγμάτων τυριών – εμβολιασμός	30
2.5	Μικροβιολογικές και φυσικοχημικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν	31
3.	Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	33
3.1	Ανάπτυξη του στελέχους C5 του <i>L.monocytogenes</i> σε TSA-YE άγαρ.....	33
3.1.1	Αερόβιες συνθήκες.....	33
3.1.2	Υποξικές συνθήκες.....	33
3.2	Ανάπτυξη του στελέχους ScottA του <i>L.monocytogenes</i> σε TSA-YE άγαρ.....	35
3.2.1	Αερόβιες συνθήκες.....	35
3.2.2	Υποξικές συνθήκες.....	36
3.3.	Ανάπτυξη του στελέχους PL25 του <i>L.monocytogenes</i> σε TSA-YE άγαρ.....	38
3.3.1	Αερόβιες συνθήκες.....	38
3.3.2	Υποξικές συνθήκες.....	39
3.4	Ανάπτυξη του στελέχους C5 του <i>L.monocytogenes</i> σε θρεπτικό μέσο με βάση το τυρί Ricotta	41
3.4.1	Αερόβιες συνθήκες.....	41
3.4.2	Υποξικές συνθήκες.....	42
3.5	Ανάπτυξη του στελέχους ScottA του <i>L.monocytogenes</i> σε θρεπτικό μέσο με βάση το τυρί Ricotta	44
3.5.2	Υποξικές συνθήκες.....	45
3.6.	Ανάπτυξη του στελέχους PL25 του <i>L.monocytogenes</i> σε θρεπτικό μέσο με βάση το τυρί Ricotta	47
3.6.1	Αερόβιες συνθήκες.....	48
3.6.2	Υποξικές συνθήκες.....	48
3.7	Ανάπτυξη του στελέχους C5 του <i>L.monocytogenes</i> σε θρεπτικό μέσο με βάση το τυρί Camembert.....	51
3.7.1	Αερόβιες συνθήκες.....	51
3.7.2	Υποξικές συνθήκες.....	51
3.8	Ανάπτυξη του στελέχους ScottA του <i>L.monocytogenes</i> σε θρεπτικό μέσο με βάση το τυρί Camembert.....	53
3.8.1	Αερόβιες συνθήκες.....	54
3.8.2	Υποξικές συνθήκες.....	54

3.9. Ανάπτυξη του στελέχους PL25 του <i>L.monocytogenes</i> σε θρεπτικό μέσο με βάση το τυρί Camembert.....	57
3.9.1 Αερόβιες συνθήκες.....	57
3.9.2 Υποξικές συνθήκες.....	58
3.10 Ανάπτυξη του στελέχους C5 του <i>L.monocytogenes</i> σε τυριά Ricotta και Camembert.....	60
3.11 Ανάπτυξη του στελέχους ScottA του <i>L.monocytogenes</i> σε τυριά Ricotta και Camembert.....	62
3.12 Ανάπτυξη του στελέχους PL25 του <i>L.monocytogenes</i> σε τυριά Ricotta και Camembert.....	64
4. Συμπεράσματα.....	67
5. Βιβλιογραφία.....	68

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Αρχικά ευχαριστώ θερμά τους κυρίους Σκανδάμη Παναγιώτη, Καθηγητή Γ.Π.Α., Δροσινό Ελευθέριο, Καθηγητή Γ.Π.Α., και Πανάγου Ευστάθιο, Καθηγητή Γ.Π.Α., που δέχτηκαν να αποτελέσουν την τριμελή εξεταστική επιτροπή της εργασίας μου, αλλά και για τη συνεργασία και τις σημαντικές γνώσεις που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της σταδιοδρομίας μου ως μεταπτυχιακός φοιτητής του Τμήματος Επιστήμης των Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Καθηγητή κύριο Παναγιώτη Σκανδάμη, εισηγητή της μεταπτυχιακής μου μελέτης, για την ανάθεση της μελέτης αλλά και στην κυρία Μαρία Γκερέκου, υποψήφια Διδάκτορα του εργαστηρίου Υγιεινής και ελέγχου Ποιότητας Τροφίμων, για το ειλικρινές ενδιαφέρον που έδειξε για το θέμα της εργασίας μου καθώς και την πολύτιμη καθοδήγησή της σε όλα τα στάδια εκπόνησής της μελέτης μου.

Ευχαριστώ επίσης και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Υγιεινής και Ποιότητας Τροφίμων για την παροχή όλων των στοιχείων, συσκευών και υλικών που ήταν απαραίτητα για την εκτέλεση των πειραμάτων.

Τέλος, ευχαριστώ και την οικογένειά μου για τη στήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ιούλιος 2022

Γεώργιος Αργυροκαστρίτης

Με την άδειά μου η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από λογισμικό ανίχνευσης κειμενικής ομοιότητας που διαθέτει το Ίδρυμα

1. Εισαγωγή

1.1 Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει πολύ εκτεταμένη έρευνα σχετικά με το βακτήριο *Listeria monocytogenes*, που αναφέρεται στην απομόνωση του μικροοργανισμού και τον χαρακτηρισμό της, την εμφάνιση/επιπολασμό στα τρόφιμα και στην επεξεργασία τους, τους μηχανισμούς μόλυνσης και τις συνέπειές τους, τον έλεγχο του παθογόνου, καθώς και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ στελεχών του μικροβίου.

Σε αντίθεση με άλλους παθογόνους παράγοντες υπεύθυνους για μεγάλες επιδημίες που αποτέλεσαν σημαντικές απειλές για την ανθρώπινη κοινωνία η ιστορία του *L. monocytogenes* και της προκαλούμενης από αυτό λιστερίωσης είναι σχετικά πρόσφατη. Η πρώτη φορά που περιεγράφηκε ο μικροοργανισμός ήταν το 1924 ως *Bacterium monocytogenes* από τον Murray ο οποίος παρατήρησε τον θάνατο κουνελιών που οφειλόταν στο συγκεκριμένο βακτήριο, όπως αναφέρεται στην εργασία των (Murray et al., 1926). Από το 1891 όμως, είχαν παρατηρηθεί ήδη λοιμώξεις που όπως αποδείχτηκε αργότερα (Gray and Killinger, 1966) οφείλονταν στον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*. Σύμφωνα με τον (Gill, 1937), ο μικροοργανισμός απομονώθηκε πρώτα από τον ίδιο το 1929 ενώ από το 1940, καθιερώθηκε το γένος του μικροοργανισμού ως *Listeria* από τον Harvey Pirie (Harvey, 1940). Μέχρι τότε επικρατούσε το όνομα *Listerella* προς τιμήν του λόρδου Arthur Lister. Αυτό όμως απορρίφθηκε, λόγω του ότι με το όνομα αυτό ονομάζονταν ήδη κάποιοι μύκητες (*Mycetozoa*). Έτσι επικράτησε το όνομα του γένους ως *Listeria*. Παγκοσμίως τα τελευταία χρόνια έχουν καταγραφεί πάρα πολλά κρούσματα λιστερίωσης, ιδιαίτερα κατά την δεκαετία του 1980. Ο παθογόνος *L. monocytogenes* αποτέλεσε την κινητήρια δύναμη για την ανάπτυξη της έρευνας και της επιτήρησης ασθενειών που οφείλονται σχεδόν αποκλειστικά σε τροφιμογενείς λοιμώξεις, όπως η περίπτωση της λιστερίωσης, καθώς και των στρατηγικών ελέγχου των ασθενειών αυτών.

Παρά την εκτεταμένη έρευνα τα τελευταία χρόνια, ο παθογόνος *L. monocytogenes* συνεχίζει να αποτελεί απειλή για τη δημόσια υγεία και για τη βιομηχανία τροφίμων, ιδιαίτερα τη βιομηχανία τροφίμων έτοιμου φαγητού, διότι η κατανάλωση τροφών μολυσμένων από *L. monocytogenes* αποτελεί μεγάλο κίνδυνο για την δημόσια υγεία.

1.1.2 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού

Στο γένος *Listeria*, όπως αναφέρουν οι Collins et al. (1991) και Weller et al. (2015), ανήκουν τα ακόλουθα 17 είδη: *L. aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. newyorkensis*, *L. riparia*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis*, και *L. welshimeri*. Παθογόνο για τον άνθρωπο είναι μόνο το είδος *L. monocytogenes*, το οποίο σύμφωνα με τους Farber and Peterkin (1991), περιλαμβάνει τους ακόλουθους 13 ορότυπους: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e και 7. Από αυτούς, συνδέονται με λοιμώξεις στον άνθρωπο οι ορότυποι: 1/2a, 1/2b, και 4b. Σύμφωνα με τους Seeliger and Höhne (1979) ο ορότυπος 4b είναι υπεύθυνος για το 33% των λοιμώξεων σε Αμερική και Ευρώπη.

Όσον αφορά στην ταξινόμηση του παθογόνου *Listeria monocytogenes*, αυτή έχει ως εξής:

Βασίλειο:	Eubacteria
Φύλο:	Firmicutes
Κλάση:	Bacilli
Τάξη:	Bacillales
Οικογένεια:	Listeriaceae
Γένος:	Listeria
Είδος:	<i>Listeria monocytogenes</i>

Το είδος *L. monocytogenes* είναι βακτήριο τυπικά θετικό κατά Gram προαιρετικά αναερόβιο, μη σποριογόνο με μορφή ραβδόμορφου βακίλου και μερικές φορές με απεικόνιση αλυσίδων στο μικροσκόπιο, διαστάσεων 0,4 - 0,5 μm x 0,5 - 2 μm (Lovett, 1989). Σε θερμοκρασία 20 - 25°C ο μικροοργανισμός έχει τη μέγιστη κινητικότητα του όπου δύναται να κινείται με τη χρήση μαστιγίων. Την κινητικότητά του αυτή τη χάνει στους 37°C. Είναι θετικός στην αντίδραση της καταλάσης και αρνητικός στην αντίδραση της οξειδάσης. Μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες από 1 έως 45°C (ψυχρότροφος) σύμφωνα με τους Junntila et al., (1988) και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι οι 37°C. Είναι ανθεκτικός τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές θερμοκρασίες και η ανθεκτικότητά του αυτή έχει μελετηθεί ευρέως (Walker and Stringer, 1987, Jaana et al., 1988, Ikonomou and Todoron, 1964, Sörqvist, 1994). Σύμφωνα με τους Walker et al. (1990) ο μικροοργανισμός επιβιώνει ακόμη και σε θερμοκρασίες κάτω από -0,1 έως -0,4°C. Συνεπώς είναι ανθεκτικός μικροοργανισμός αφού αναπτύσσεται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών. Επίσης μπορεί να αναπτυχθεί σε pH από 4,5 - 7,0 (Parish and Higgins, 1989) παραμένοντας ανθεκτικό ακόμα και σε χαμηλά pH ενώ επιβιώνει και σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl που φτάνουν μέχρι και 18% w/v ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντός του (Cole et al, 1990).

Όσον αφορά στην ενεργότητα του νερού (a_w), η βέλτιστη τιμή για την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* είναι μεταξύ 0,98 και 0,99 (Tienungsoon et al., 2000). Οι Johnson et al, (1988) όμως διεπίστωσαν ότι ο μικροοργανισμός επιβιώνει και σε σαλάμι συντηρούμενο στους 4°C με ενεργότητα νερού 0,79 - 0,86.

Το γεγονός του ότι το *L. monocytogenes* είναι ένα τυπικό θετικό κατά Gram βακτήριο το κάνει να έχει κυτταρικό τοίχωμα αποτελούμενο από 35% πεπτιδογλυκάνη που συνδέεται με τεϊχοϊκά οξέα. Στο βακτήριο συναντώνται 2 τύποι τεϊχοϊκών οξέων. Στον πρώτο τύπο, κατάλοιπα ριβιτόλης συνδέονται με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ των ανθράκων 1-5, και μερικές φορές βρίσκονται να αντικαθίστανται με N-ακετυλογλυκοζαμίνη στον άνθρακα 2. Ο τύπος αυτός βρίσκεται στους ορότυπους 1/2a, 1/2b και 1/2c, 3a, 3b, και 3c, και 7. Ο δεύτερος τύπος βρίσκεται στους ορότυπους 4a, 4b και 4d. Η N-ακετυλογλυκοζαμίνη υπάρχει μέσα στην αλυσίδα.

1.1.3 Η επιδημιολογία του μικροοργανισμού

Η διάγνωση της λιστερίωσης, δηλαδή της τροφιμογενούς λοίμωξης που προκαλείται από τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* γίνεται με καλλιέργεια δείγματος αίματος ή εγκεφαλονωτιαίου μυελού. Η δόση που είναι μολυσματική για τον άνθρωπο έχει σχέση με την κατάσταση της υγείας του. Γι αυτό τον λόγο οι πλέον ευαίσθητες στη λοίμωξη πληθυσμιακές ομάδες είναι κυρίως οι ηλικιωμένοι, τα παιδιά, οι έγκυες γυναίκες και τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα που έχουν εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Στα άτομα αυτά η λοίμωξη εμφανίζεται με τη σοβαρότερη μορφή της (invasive disease) και έχει αρχικό χρόνο εμφάνισης μία έως τρεις εβδομάδες, ενώ η θνησιμότητα των προσβεβλημένων με λιστερίωση ατόμων φτάνει μέχρι και 20 - 30% (Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007, Ramaswamy et al., 2007). Σε αυτή την περίπτωση, τα συμπτώματα περιλαμβάνουν αρχικά την πολυμορφοπύρνη λευκοκυττάρωση και αργότερα την μονοπύρνη λευκοκυττάρωση. Στα άλλα άτομα, τα υγιή, η λοίμωξη εξελίσσεται σαν γαστρεντερίτιδα ή γρίπη (non-invasive disease) και έχει αρχικό χρόνο εμφάνισης μεγαλύτερο από δώδεκα ώρες, ενώ τα συμπτώματα είναι διάρροια, ναυτία και εμετοί. Ο χρόνος επώασης, εξαρτάται αφενός από τον πληθυσμό των μικροοργανισμών που θα καταναλώσει ο άνθρωπος με την τροφή του και αφετέρου από το πόσο ευαίσθητος είναι στη λοίμωξη.

1.1.4 Η λοιμοξιογόνος δράση του μικροοργανισμού

Από την στιγμή που θα μολυνθεί ο άνθρωπος με την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου με *L. monocytogenes*, αν το παθογόνο μπορέσει να ξεπεράσει το εμπόδιο του χαμηλού pH του στομάχου τότε περνάει στο έντερο και μέσω των μεσεντέριων λεμφαδένων φτάνει στο ήπαρ και το σπλήνα. Τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα προκαλούν υπεραιμική αντίδραση και ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα τα οποία καταστρέφουν τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα άλλα και τα κύτταρα του παθογόνου. Συνεπώς το ήπαρ έχει πολύ μεγάλη σημασία για το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου απέναντι σε αυτό το βακτήριο. Αν το βακτήριο καταφέρει να διαφύγει από το ήπαρ τότε μπορεί να μπει στην κυκλοφορία του αίματος, οπότε μέσω του αίματος μπορεί να φτάσει στον εγκέφαλο και να προκαλέσει εγκαφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα ή αν πρόκειται για έγκυο γυναίκα να περάσει στον πλακούντα και να προκαλέσει λοίμωξη στο έμβρυο ή ακόμη και αποβολή (Gray and Killinger, 1966).

Σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την λοιμοξιογόνο δράση του μικροοργανισμού είναι η θερμοκρασία. Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, που αναπτύχθηκε σε θερμοκρασία 4°C η οποία είναι μια συνήθης θερμοκρασία για τη συντήρηση τροφίμων με ψύξη, ανέπτυξε σημαντική λοιμοξιογόνο δράση. Επίσης ο σίδηρος που υπάρχει στο μέσο ανάπτυξης του βακτηρίου αποτελεί παράγοντα που επηρεάζει την ανάπτυξή του.

1.2 Η σημασία της διαθεσιμότητας του οξυγόνου

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* μπορεί και αναπτύσσεται και σε συνθήκες περιορισμένου οξυγόνου καθώς και υπό την παρουσία διοξειδίου του άνθρακα σε χαμηλές θερμοκρασίες. Για παράδειγμα, σε θερμοκρασία 7°C, για να ανασταλλεί η ανάπτυξη του μικροοργανισμού χρειάζεται συγκέντρωση CO₂ πάνω από το 70%, ενώ σε παρουσία μόλις 5% O₂ είναι δυνατό να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις CO₂.

Οι Jydegaard-Axelsen et al. (2004) βρήκαν ότι σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας που είναι περιορισμένη σε οξυγόνο υπήρχε αύξηση της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν το ένζυμο γλουταμινική αποκαρβοξυλάση. Τα τρία γονίδια A, B και C υπομονάδες (*gadA*, *gadB*, και *gadC*) που κωδικοποιούν το ένζυμο αυτό σε σύγκριση με την αερόβια ανάπτυξη, υπερεκφράστηκαν σημαντικά. Όταν έχουμε αναστολή ανάπτυξης λόγω διοξειδίου του άνθρακος προκαλούμενη λόγω οξίνισης του περιβάλλοντος, τότε πιθανά τα κύτταρα να χρησιμοποιήσουν αυτόν τον μηχανισμό για να αποκατασταθεί το pH και έτσι να

διατηρήσουν την ανάπτυξη. Από τα 13 λοιμοξιογόνα γονίδια, μόνο σε δυο (*inlA* και *ImaA*) μεταβλήθηκε σημαντικά η έκφραση. Ο παράγοντας μολυσματικότητας *inlA* εκφράστηκε περισσότερο σε CO₂ απότι στον αέρα για το στέλεχος *L. monocytogenes* LO28.

Οι Buchanan and Klawitter (1990) βρήκαν ότι σε μια επιτρεπτή θερμοκρασία ανάπτυξης των 19°C, η αναερόβωση ενίσχυσε την ανάπτυξη με την μείωση της διάρκειας φάσης προσαρμογής και το χρόνο γενεάς του μικροοργανισμού. Έτσι η μείωση του οξυγόνου βοήθησε στην επιδιόρθωση των κυτταρικών βλαβών του μικροοργανισμού όταν τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C. Οι Buchanan and Phillips (1990) στην μελέτη τους που αφορά στην προσαρμογή του *Listeria monocytogenes* σε αναερόβιες συνθήκες, κατά τη δημιουργία μοντέλου πρόβλεψης ανέφεραν ότι οι συνθήκες αυτές βοήθησαν τον μικροοργανισμό αυτό να ανταπεξέλθει στις αντίξοες συνθήκες του χαμηλού pH. Ο συνδυασμός θερμοκρασίας και διαθεσιμότητας σε οξυγόνο δείχνει να έχει σημαντική επίδραση στην επιβίωση του *L. monocytogenes* σε ένα περιβάλλον χαμηλού pH.

1.3 Τα τυριά

Τα τυριά διακρίνονται σε τυριά ωρίμανσης (ώριμα) που είναι εκείνα τα οποία δεν προορίζονται για κατανάλωση αμέσως μετά την παρασκευή τους και σε φρέσκα τυριά τα οποία είναι δυνατόν να καταναλώνονται αμέσως μόλις τελειώσει η επεξεργασία τους. Για να γίνει η ωρίμανση είναι απαραίτητο να υπάρχουν συγκεκριμένες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας. Τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, είναι δυνατόν να τροποποιηθούν μετά από κάποιο χρονικό διάστημα με την πραγματοποίηση διαφόρων βιοχημικών αντιδράσεων. Οι βασικές αντιδράσεις που μπορούν να γίνουν είναι ο μεταβολισμός της λακτόζης προς γαλακτικό οξύ, η υδρόλυση των πρωτεϊνών (πρωτεόλυση) και η υδρόλυση του λίπους (λιπόλυση). Τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων δίνουν τη βασική γεύση των τυριών, ενώ τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά για κάθε τυρί ωρίμανσης προκύπτουν από περαιτέρω μετατροπή των προϊόντων των παραπάνω αναφερθέντων αντιδράσεων.

Επίσης τα τυριά μπορούν να διακριθούν με βάση το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιούμε για την παρασκευή τους. Έτσι διακρίνονται σε αγελαδινά, πρόβεια ή κατσικίσια. Ακόμη με βάση την πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται διακρίνονται σε τυριά από γάλα, τυρόγαλα αλλά και κατεργασμένα τυριά. Με βάση δε το ποσοστό υγρασίας τους διακρίνονται σε σκληρά και μαλακά, με βάση τη λιποπερικεκτικότητα τους διακρίνονται σε άπαχα και παχιά και με βάση την τεχνολογία παρασκευής τους μπορούν να διακριθούν σε

τυριά που ωριμάζουν παρουσία μυκήτων π.χ. το Roquefort (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009).

1.3.1 Τυρί Camembert

Το Camembert είναι τυρί υψηλό σε υγρασία, κρεμώδες και μαλακό και παρασκευάζεται από αγελαδινό γάλα (Εικόνα 1). Χαρακτηρίζεται από τη σκληρή επιφάνειά του σε σχέση με το εσωτερικό η οποία οφείλεται σε επιφανειακή ωρίμανση. Παράχθηκε πρώτη φορά από μη παστεριωμένο γάλα στο Camembert της Νορμανδίας. Είναι τυρί Π.Ο.Π και συνεπώς θα πρέπει να παράγεται από μη παστεριωμένο γάλα όπως παράχθηκε αρχικά. Όμως σήμερα η παραγωγή του γίνεται από παστεριωμένο γάλα για λόγους ασφαλείας.



Εικόνα 1. Τυρί Camembert

Κατά τη διαδικασία παραγωγής του γίνεται αρχικά ενοφθαλμισμός του αναθερμασμένου γάλακτος με μεσόφιλα βακτήρια (*L. lactis subsp.*, *L. cremoris subsp.*) κατόπιν προστίθεται ρεννίνη και γίνεται η πήξη του τυριού. Το τυρόπηγμα κόβεται σε κύβους του 1 εκατοστού, αλατίζεται και τοποθετείται σε μικρού ύψους κυλινδρικά καλούπια. Τα καλούπια τα αναποδογυρίζουμε κάθε 6 - 12 ώρες ώστε η απομάκρυνση υγρασίας να γίνεται ομοιόμορφα. Μετά από 48 ώρες, κάθε καλούπι περιέχει ένα κυλινδρικό συμπαγές και επίπεδο τυρί που ζυγίζει περίπου 250 g. Αυτό το φρέσκο τυρί, είναι εύθρυπτο, σκληρό και λευκό. Ακολουθεί ο ψεκασμός της επιφάνειας του κάθε τυριού με υγρό διάλυμα του μύκητα *Penicillium camemberti* και αφήνονται τα τυριά να ωριμάσουν περίπου για 3 εβδομάδες. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, σχηματίζεται ένα χαρακτηριστικό εδώδιμο «δέρμα», ενώ το εσωτερικό του τυριού είναι κρεμώδες. Αφού ολοκληρωθεί η ωρίμανση τα τυριά τυλίγονται και τοποθετούνται σε ξύλινα κουτιά προκειμένου να προωθηθούν στην αγορά (Smith, 2005).

1.3.2 Τυροκομικό προϊόν Ricotta

Το τυρί Ricotta παράγεται από πρωτεΐνη τυρογάλακτος προβάτου, κασίικας, αγελάδας ή Ιταλικού βούβαλου (Εικόνα 2) και είναι Ιταλικής προέλευσης. Οι ποικιλίες Ricotta di Bufala Campana και Ricotta Romana είναι Π.Ο.Π ποικιλίες. Το Ricotta Romana παρασκευάζεται από γάλα προβάτου ενώ το Ricotta di Bufala Campana παρασκευάζεται από το τυρόγαλο που μένει μετά τη παραγωγή της Mozzarella di Bufala Campana (μοτσαρέλα βουβάλου) που είναι και αυτή προστατευόμενη ποικιλία.



Εικόνα 2. Τυρί Ricotta

Παράγεται από την πήξη των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος, γαλακτογλοβουλίνη και αλβουμίνη που παραμένουν σε αυτό μετά την απομάκρυνση των καζεϊνών για την παραγωγή άλλων τυριών. Μετά από οξίνιση του τυρογάλακτος (pH 5,5) και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου (12 - 24 ώρες) το τυρόγαλο θερμαίνεται σε θερμοκρασία 90°C. Λόγω της μεγάλης οξύτητας μετουσιώνονται οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος και καθιζάνουν σχηματίζοντας ένα λεπτό τυρόπηγμα. Αυτό αφήνεται να κρυσώσει και με τη χρήση λεπτού υφάσματος αφήνεται να στραγγίσει. Το τυρί που προκύπτει με αυτό τον τρόπο, είναι ένα λευκό τυρί με ελαφρά γλυκιά γεύση και λέγεται Ricotta.

1.4 Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας

1.4.1 Ανταγωνισμός μεταξύ στελεχών του παθογόνου *L. monocytogenes* με άλλα είδη του γένους *Listeria*

Στα τρόφιμα συνυπάρχουν πολλοί μικροοργανισμοί. Μαζί με αυτούς υπάρχουν και χημικές ουσίες και θρεπτικά συστατικά τα οποία συμβάλλουν στην ανάπτυξη και στην επιβίωση των μικροοργανισμών αυτών. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσουν δραστηριότητες οι οποίες συνιστούν τις διαδικασίες που αφενός καθορίζουν τις βιοχημικές μεταβολές που

συμβαίνουν στα τρόφιμα και αφετέρου συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών οι οποίες τελικά καθορίζουν και τη βιωσιμότητά τους στα τρόφιμα. Έτσι είναι δυνατό είτε να σχηματίζουν βιοϋμένια για να επιβιώνουν σε δύσκολες συνθήκες είτε να δρουν ανταγωνιστικά προσπαθώντας να εξασφαλίσουν την επιβίωσή τους με τη διεκδίκηση των θρεπτικών συστατικών που υπάρχουν στο περιβάλλον του τροφίμου και είναι απαραίτητα για την ανάπτυξή τους. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές λοιπόν είναι υπεύθυνες για το πώς θα συμπεριφερθούν οι μικροοργανισμοί στα τρόφιμα επηρεάζοντας τελικά και την ίδια την ασφάλειά τους.

Η συμπεριφορά του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* καθορίζεται τόσο από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τροφίμου, όσο και από τις αλληλεπιδράσεις του με άλλους μικροοργανισμούς που μπορεί να συνυπάρχουν μ' αυτόν στα τρόφιμα. Αυτό σημαίνει ότι σε κάθε διαδικασία που σχετίζεται με την ασφάλεια των τροφίμων θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη και οι δύο αυτοί παράγοντες.

Οι Cornu et al. (2002) ασχολήθηκαν με τη μοντελοποίηση της ανταγωνιστικής ανάπτυξης μεταξύ του παθογόνου *L. monocytogenes* και *L. innocua* σε υγρό υπόστρωμα εμπλουτισμού. Οι συγγραφείς δεν βρήκαν σημαντικές διαφορές στα χαρακτηριστικά ανάπτυξης μεταξύ των δύο ειδών στα διαφορετικά υποστρώματα, υποδηλώνοντας ότι το αναπτυξιακό πλεονέκτημα του *L. innocua*, στα υποστρώματα εμπλουτισμού δεν ήταν τόσο σημαντικό όσο περιγράφηκε παλαιότερα. Κατά την μελέτη της κινητικής μεικτών καλλιεργειών μεταξύ στελεχών *L. monocytogenes* και *L. innocua* η παραγωγή μιας ποικιλίας ανασταλτικών μεταβολιτών απέδειξε τη δυνατότητα ανασταλτικής αλληλεπίδρασης μεταξύ αυτών των δύο ειδών με αποτέλεσμα την υπερανάπτυξη κατά τον εμπλουτισμό του μικροοργανισμού *L. innocua*.

Οι Gorski et al. (2006) εξέτασαν την ανταγωνιστική συμπεριφορά στελεχών που ανήκουν στους ορότυπους 1/2a και 4b του *L. monocytogenes* με και χωρίς τροφή στο πρωτόκολλο εμπλουτισμού του U.S. Food and Drug Administration. Περιεγράφηκαν δεκατρείς διαφορετικοί ορότυποι του παθογόνου *L. monocytogenes* που βρίσκονται στις τροφές. Τα στελέχη ορότυπου 4b συνδέονται συχνότερα με ασθένειες και τα στελέχη ορότυπου 1/2a απομονώνονται συχνότερα από τρόφιμα και εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων. Επίσης, συγκρίθηκαν τρία στελέχη *L. monocytogenes* ορότυπου 4b και πέντε στελέχη ορότυπου 1/2a σε άμεσο ανταγωνισμό μεταξύ τους σε μεικτές καλλιέργειες δύο στελεχών χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο εμπλουτισμού FDA BAM, το οποίο περιλαμβάνει τόσο υγρό υπόστρωμα εμπλουτισμού όσο και επιλεκτικό στερεό υπόστρωμα, με και χωρίς πρόσθετα θρεπτικά συστατικά ώστε να μιμηθούν τις συνθήκες που

συμβαίνουν κατά την προσπάθεια απομόνωσης των ειδών του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* από μολυσμένα τρόφιμα. Χρησιμοποιώντας μια διαδικασία ανοσοαποτύπωσης αποικίας και αναλύοντας πάνω από 112.000 αποικίες, παρατηρήθηκαν διαφορές στην συμπεριφορά του στελέχους, οι οποίες όμως διαφορές δεν οφείλονταν σε ορότυπο ή γενετική καταγωγή. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στη φυσική κατάσταση που σχετίζονται με την ικανότητα ενός στελέχους να επιβιώνει σε μια δεδομένη θέση και αυτό δεν το κάνει απαραίτητα ιδανικά κατάλληλο για να επιβιώσει η καλλιέργεια εμπλουτισμού όταν είναι ανταγωνιστική με ένα πιο προσαρμοστικό στέλεχος.

Οι Dailey et al. (2014) εξέτασαν τις επιδράσεις του ανταγωνισμού από μη παθογόνα τροφιμογενή βακτήρια κατά τον επιλεκτικό εμπλουτισμό του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* χρησιμοποιώντας ρυθμισμένο ζωμό εμπλουτισμού *Listeria*.

Η ανάπτυξη του *L. monocytogenes* κατά τον επιλεκτικό εμπλουτισμό δειγμάτων τροφίμων με αυτό, μπορεί να περιοριστεί από την παρουσία πρόσθετων μικροοργανισμών που είναι ανθεκτικοί στις επιλεκτικές συνθήκες που εφαρμόζονται. Εάν η ανάπτυξη είναι περιορισμένη και δεν πληρούνται τα ελάχιστα επίπεδα μετά τον εμπλουτισμό τότε η παρουσία του παθογόνου *L. monocytogenes* μπορεί να μείνει μη ανιχνεύσιμη. Οκτώ είδη βακτηρίων απομονώθηκαν από τρόφιμα που έδειξαν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε επιλεκτικό υγρό υπόστρωμα εμπλουτισμού *Listeria* με ρυθμιστικό ζωμό υπό επιλεκτικές συνθήκες. Η ανάπτυξη αυτών των ανταγωνιστών μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της επώασης εμπλουτισμού οδήγησε σε μείωση που κυμαίνεται από 1 έως 4 log CFU/mL στον πληθυσμό του παθογόνου *L. monocytogenes* μετά από 48 ώρες. Τρία στελέχη *L. monocytogenes* που αντιπροσωπεύουν τους ορότυπους 1/2a, 1/2b και 4b συμπεριλήφθηκαν σε αυτή τη μελέτη, αλλά κανένας ορότυπος δεν φάνηκε να είναι περισσότερο ή λιγότερο ευαίσθητος στην παρουσία ανταγωνιστών μικροοργανισμών. Ένα επιπλέον στέλεχος *L. monocytogenes* ταυτοποιήθηκε καθώς εμφανίζει ελάχιστη ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της περιόδου εμπλουτισμού παρουσία του *Citrobacter braakii* με τον τελικό πληθυσμό να φτάνει περίπου τα 2,6 log CFU/mL μετά από 48 ώρες, που ήταν 2 log units αύξηση πάνω από τον αρχικό πληθυσμό. Το συγκεκριμένο στέλεχος στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι είναι δύσκολο να ανιχνευθεί μετά τον εμπλουτισμό με έναν αυτοματοποιημένο προσδιορισμό ανοσοφθορισμού και μια δοκιμασία συσκευής που βασίζεται σε αντισώματα πλευρικής ροής. Σε ορισμένους εμπλουτισμούς, αυτό το στέλεχος ήταν επίσης δύσκολο να ανιχνευθεί με PCR σε πραγματικό χρόνο.

Οι Zilelidou et al. (2015) διερεύνησαν τα πλεονεκτήματα ανάπτυξης και διεισδυτικότητας των στελεχών του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στον ανταγωνισμό

στελεχών. Στο ίδιο δείγμα τροφής μπορεί να υπάρχουν πολλαπλά στελέχη *Listeria monocytogenes*. Εντοπίστηκαν δύο ισχυρά ανταγωνιστικά στελέχη, των οποίων η ανάπτυξη δεν επηρεάστηκε (ή επηρεάστηκε μόνο ελαφρώς) από την παρουσία άλλων στελεχών. Τα ισχυρά ανταγωνιστικά στελέχη (κατά τη συγκαλλιέργεια) παρουσίασαν υψηλή διεισδυτικότητα. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα εισβολής του εξαιρετικά διεισδυτικού στελέχους αυξήθηκε περαιτέρω σε ορισμένους συνδυασμούς από την παρουσία ενός λιγότερο διεισδυτικού στελέχους. Σε όλους τους συνδυασμούς που δοκιμάστηκαν, το λιγότερο διεισδυτικό στέλεχος υπερτερούσε από το περισσότερο διεισδυτικό στέλεχος σε επίπεδο πληθυσμού. Η μελέτη της επίδρασης της κυτταρικής επαφής στον *in vitro* ανταγωνισμό μολυσματικότητας αποκάλυψε ένα πολύπλοκο μοτίβο στο οποίο τα παρατηρούμενα αποτελέσματα εξαρτώνται μόνο εν μέρει από την επαφή με το κύτταρο υποδηλώνοντας ότι ο ανταγωνισμός εμφανίζεται σε δύο διαφορετικά επίπεδα: i) κατά τη διάρκεια της συν-καλλιέργειας πριν από τη μόλυνση, η οποία μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των παραγόντων λοιμογόνου δράσης, και ii) κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, όταν βακτηριακά κύτταρα ανταγωνίζονται για τις θέσεις πρόσδεσης στα κύτταρα του ξενιστή. Συμπερασματικά, αποδείχτηκε ότι η ανάπτυξη του *L. monocytogenes* μπορεί να ανασταλεί από στελέχη του ίδιου είδους οδηγώντας δυνητικά σε μεροληπτική ανάκαμψη κατά τη διάρκεια των διαδικασιών εμπλουτισμού. Επιπλέον, η παρουσία περισσότερων του ενός στελέχους *L. monocytogenes* στα τρόφιμα μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα ποσοστά μόλυνσης λόγω συνεργιστικών επιδράσεων στο δυναμικό λοιμογόνου δράσης. Αποδείχτηκε επίσης ότι η συγκαλλιέργεια των στελεχών *L. monocytogenes* μπορεί να οδηγήσει σε διαφορές στη φυσική κατάσταση, τη διεισδυτικότητα και την ενδοκυτταρική ανάπτυξη και ότι η επαφή με τα κύτταρα παίζει κάποιο ρόλο στην αναστολή της ανάπτυξης και εν μέρει στον *in vitro* ανταγωνισμό λοιμογόνου δράσης. Τα αποτελέσματα της εργασίας δείχνουν ότι η ανάπτυξη του *L. monocytogenes* δεν μπορεί να ανασταλεί μόνο από άλλα είδη όπως το *L. innocua*, αλλά και από στελέχη του ίδιου είδους που οδηγούν δυνητικά σε μεροληπτική ανιχνευσιμότητα κατά τη διάρκεια των διαδικασιών εμπλουτισμού.

Οι Zilelidou et al. (2016a) διερεύνησαν την αλληλεπίδραση μεταξύ στελεχών του *L. monocytogenes* σε επίπεδο εμπλουτισμού. Ένα προϊόν διατροφής μπορεί να μολυνθεί από διάφορα στελέχη *Listeria monocytogenes*, με αποτέλεσμα να είναι ενδεχόμενο οι καταναλωτές να εκτεθούν ταυτόχρονα σε πολλαπλά στελέχη. Τα στελέχη *L. monocytogenes* απομονώθηκαν από τα τρόφιμα με επιλεκτικό εμπλουτισμό, ο οποίος είναι δυνατό να μην αντιπροσωπεύει πάντα τα στελέχη που μπορούν να επιβιώσουν καλύτερα από το ανοσοποιητικό σύστημα ενός ασθενούς. Συγκεκριμένα οι ανωτέρω ερευνητές διερεύνησαν

την επίδραση της καλλιέργειας σε TSB με 0,6% εκχύλισμα ζύμης (TSB-Y) στους 10°C για 8 ημέρες (i) στην ανίχνευση στελεχών *L. monocytogenes* κατά τη διάρκεια του επιλεκτικού εμπλουτισμού (SE) σύμφωνα με το ISO 11290-1: 1996/Amd Πρωτόκολλο 1: 2004 και (ii) στην «in vitro» μολυσματικότητα των στελεχών προς την Caco-2 κυτταρική γραμμή του καρκίνου στο επιθήλιο του παχέος εντέρου μετά από έκθεση σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό (SGF, pH 2.0) -HCl (37°C). Προσδιορίστηκε επίσης εάν τα στελέχη που ευνοήθηκαν από τον SE θα ήταν αποτελεσματικοί ανταγωνιστές υπό τις συνθήκες της γαστρεντερικής διέλευσης του παθογόνου. Ο ενδιάμεσος ανταγωνισμός του *L. monocytogenes* στο TSB-Y καθόρισε τον σχετικό πληθυσμό κάθε στελέχους στην αρχή της SE. Αυτό με τη σειρά του επηρέασε το αποτέλεσμα της SE (ευνοώντας έτσι την επιβίωση ανταγωνιστών με καλύτερη φυσική κατάσταση) και τα επίπεδα που εκτέθηκαν στη συνέχεια στο SGF. Ωστόσο, οι ισχυροί αναπτυξιακοί ανταγωνιστές θα μπορούσαν να ξεπεραστούν μετά την έκθεση στον SGF και τη μόλυνση των κυττάρων Caco-2 από στελέχη που έχουν αυξηθεί σε TSB-Y και δεν έχουν εντοπιστεί (ή ακόμη και παραλειφθεί) κατά τον εμπλουτισμό. Η μελέτη καταδεικνύει μια κατά προτίμηση επιλογή ορισμένων στελεχών *L. monocytogenes* κατά τον εμπλουτισμό, που δεν αντικατοπτρίζει συχνά κάποιο επιλεκτικό πλεονέκτημα στελεχών κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Τα ευρήματα των ερευνητών αυτών υπογραμμίζουν τη δυσκολία αντιστοίχισης της πηγής λοίμωξης (τροφής) με το απομονωμένο *L. monocytogenes* που είναι και η αιτία του προβλήματος όταν διενεργείται έρευνα για μια επιδημία λιστερίωσης.

Οι Zilelidou et al. (2016b) διαπίστωσαν ότι οι διαφορές ανάπτυξης και ο ανταγωνισμός μεταξύ των στελεχών της *Listeria monocytogenes* καθορίζουν την επικράτησή τους σε φέτες ζαμπόν και οδηγούν σε μεροληψία κατά τον επιλεκτικό εμπλουτισμό με το πρωτόκολλο ISO.

Τα στελέχη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* είναι ευρέως διαδεδομένα στο περιβάλλον όπου ζουν, με αποτέλεσμα συχνά πολλαπλά στελέχη να μολύνουν ένα μόνο τρόφιμο. Η εμφάνιση διαφορετικών στελεχών στο ίδιο τρόφιμο μπορεί να πυροδοτήσει τον ανταγωνισμό στελεχών, συμβάλλοντας έτσι στην άνηση ανάπτυξη των στελεχών στα τρόφιμα και στην μεροληψία κατά τη διάρκεια επιλεκτικών διαδικασιών. Οι ερευνητές εξέτασαν την ανάπτυξη επτά στελεχών *L. monocytogenes* (C5, 6179, ScottA, PL24, PL25, PL26, PL27) σε φέτες ζαμπόν και σε άγαρ πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά στους 10°C, μεμονωμένα και σε συνδυασμούς. Τα στελέχη έγιναν ανθεκτικά σε διαφορετικά αντιβιοτικά για την επιλεκτική απαρίθμησή τους. Επιπλέον, η ανάπτυξη μεμονωμένων στελεχών (αξενική καλλιέργεια) και ο ανταγωνισμός μεταξύ των στελεχών σε ξενικές καλλιέργειες δύο στελεχών αξιολογήθηκαν σε ζωμό εμπλουτισμού και σε επιλεκτικό άγαρ. Σύμφωνα με

το Πρότυπο πρωτόκολλο ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 για την ανίχνευση του *L. monocytogenes*, εκτελέστηκαν δύο στάδια εμπλουτισμού και τα δύο ακολουθούμενα από “streaking” στο ALOA. Καλλιέργειες στελεχών προστέθηκαν απευθείας στον ζυμό εμπλουτισμού ή χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό κιμά βοείου κρέατος και ζαμπόν σε φέτες, τα οποία στη συνέχεια αναμείχθηκαν με ζυμό εμπλουτισμού. Χρησιμοποιήθηκαν 180- 360 αποικίες για τον προσδιορισμό του σχετικού ποσοστού κάθε στελέχους που ανακτήθηκε σε πλάκες ανά βήμα εμπλουτισμού. Τα δεδομένα έδειξαν σημαντική επίδραση της συν-καλλιέργειας στην ανάπτυξη των έξι από τα επτά στελέχη στο ζαμπόν και μια μεροληψία ως προς ορισμένα στελέχη κατά τη διάρκεια του επιλεκτικού εμπλουτισμού. Ο ανταγωνισμός εκδηλώθηκε με: (i) διακοπή της ανάπτυξης για το υπερανταγωνιζόμενο στέλεχος όταν το κυρίαρχο στέλεχος έφτασε στη στατική φάση, (ii) μείωση των ρυθμών ανάπτυξης ή (iii) ολική καταστολή της ανάπτυξης (τόσο στο ζαμπόν όσο και στο ζυμό εμπλουτισμού ή ALOA). Ανάπτυξη στελεχών από τους ανταγωνιστές τους στο ALOA οδήγησε σε περιορισμένη έως μηδενική ανάκαμψη, με το υπερανταγωνιζόμενο στέλεχος να αντιπροσωπεύει έως και το 100% των συνολικών αποικιών που ανέκαμψαν. Η παρατηρούμενη μεροληψία συσχετίστηκε με τις συνθήκες εμπλουτισμού (δηλ. τον τύπο τροφίμου που προστέθηκε στο ζυμό εμπλουτισμού) και το συνδυασμό στελεχών. Το αποτέλεσμα του ανταγωνισμού ανάπτυξης στα τρόφιμα ή στη μη επιλεκτική επιφάνεια του άγαρ δεν συμπίπτει απαραίτητα με τα αποτελέσματα του ανταγωνισμού κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ορισμένα στελέχη που υπάρχουν στα τρόφιμα μπορεί να χαθούν κατά την κλασική ανίχνευση λόγω ανταγωνισμού στελεχών. Μια τέτοια πιθανότητα θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την εξέταση μιας εστίας λιστερίωσης.

Οι Gkerekou et.al (2021), εκτίμησαν την διαθεσιμότητα οξυγόνου στην ανάπτυξη και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ στελεχών του *L. monocytogenes* σε υγρά, στερεά και ημι-στερεά εργαστηριακά μέσα.

Η συνύπαρξη και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των στελεχών *Listeria monocytogenes* σε συνδυασμό με τα δομικά χαρακτηριστικά των τροφίμων, μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα ανάπτυξής τους και επομένως, τα τελικά τους επίπεδα κατά τη στιγμή της κατανάλωσης. Οι ερευνητές στόχευσαν στην αξιολόγηση της επίδρασης της διαθεσιμότητας οξυγόνου σε συνδυασμό με την μικροδομή του υποστρώματος στην ανάπτυξη και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των στελεχών του *L. monocytogenes*. Στελέχη *L. monocytogenes*, επιλεγμένα για την αντοχή τους σε διαφορετικά αντιβιοτικά (ώστε να καταστεί διακριτά δυνατή η απαρίθμησή τους), που ανήκουν στους ορότυπους 4b (C5, ScottA), 1/2a (6179)

και 1/2b (PL25), εμβολιάστηκαν σε υγρό (Tryptic Soy Broth συμπληρωμένο με εκχύλισμα ζύμης- TSB- YE) και στερεό (TSB-YE συμπληρωμένο με 0,6% και 1,2% άγαρ) και χρησιμοποιούμενο μέσο (2-3 log CFU/mL, g ή cm²), με ένα ή ως δύο στελέχη καλλιέργειας (αναλογία στελέχους 1: 1). Οι αερόβιες συνθήκες (A) επιτεύχθηκαν με συνεχή ανακίνηση ή επιφανειακό εμβολιασμό για υγρά και στερεά μέσα αντίστοιχα, ενώ η στατική επώαση αντιστοιχούσε σε υποξικό περιβάλλον (H). Ανοξικές συνθήκες (An) επιτεύχθηκαν με προσθήκη 0.1% w/v θειογλυκολικού νατρίου και επικάλυψη παραφίνης (για τα στερεά μέσα). Η ανάπτυξη εκτιμήθηκε κατά την αποθήκευση στους 7°C (n = 3 × 2). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ στελεχών εκδηλώθηκαν με τη διαφορά στον τελικό πληθυσμό μεταξύ μεμονωμένων και συν-καλλιεργημένων στελεχών. Η έκταση της καταστολής αυξήθηκε με τη μείωση της συγκέντρωσης άγαρ, ενώ η επίδραση της διαθεσιμότητας οξυγόνου εξαρτήθηκε από το συνδυασμό στελεχών. Κατά τη διάρκεια της συν-καλλιέργειας, σε υγρά και στερεά μέσα, το 6179 υποβιβάστηκε από το C5 από 4,0 (σε TSB-YE υπό H) σε 1,8 μονάδες log (σε στερεό μέσο υπό An), σε σύγκριση με την απλή καλλιέργεια, η οποία έφτασε σε πληθυσμό περίπου 9,4 log CFU/mL ή g. Η ανάπτυξη του 6179 παρεμποδίστηκε επίσης από το ScottA κατά 2,7 και 1,9 μονάδες log, σε υγρή καλλιέργεια υπό H και An, αντίστοιχα. Είναι ενδιαφέρον ότι σε υγρό μέσο υπό A, H και An, το ScottA υποβιβάστηκε από το C5, κατά 3,3, 2,4 και 2,3 μονάδες log, αντίστοιχα, ενώ στα στερεά μέσα, η αναστολή της ανάπτυξης ήταν λιγότερο έντονη. Η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων ανάπτυξης σε διαφορετικά περιβάλλοντα, όπως πιστεύουν οι ερευνητές, θα μπορούσε να βοηθήσει στην εξήγηση της κυριαρχίας του *L. monocytogenes* σε ορισμένους ορότυπους.

1.4.2 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του παθογόνου *L. monocytogenes* και άλλων μικροοργανισμών

Άλλοι μικροοργανισμοί που έχουν ανταγωνιστική δράση απέναντι στη δράση του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* έχουν βρεθεί ότι είναι:

- ο μικροοργανισμός *Escherichia coli* ο οποίος σύμφωνα με τις μελέτες (Mellefont et al., 2008, Buchanan and Bagi, 1999), ανταγωνίστηκε τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* ως προς τα απαραίτητα γι' αυτόν θρεπτικά συστατικά, αναστέλλοντας την ανάπτυξή του.
- Επίσης ο μικροοργανισμός *Enterococcus faecium*, σύμφωνα με τους Huang et al., 2016 ανέστειλε το παθογόνο *L. monocytogenes* μέσω της απευθείας επαφής των κυττάρων του με τα κύτταρα του μικροοργανισμού.

Εκτός από την ανασταλτική δράση που μπορεί να έχουν κάποιοι μικροοργανισμοί απέναντι στον *L. monocytogenes* είναι δυνατό να υπάρξει και συνεργιστική δράση η οποία μάλιστα να ενισχύει την ανάπτυξή του.

Έτσι σε μελέτες των (Bremer et al., 2001, Giaouris et al., 2013) παρατηρήθηκε ότι οι μικροοργανισμοί του γένους *Flavobacterium spp.* λειτούργησαν συνεργιστικά με τον παθογόνο *L. monocytogenes* ενισχύοντας το σχηματισμό βιοϋμενίων αλλά και την ανθεκτικότητα του *L. monocytogenes* στην ωσμωτική του καταπόνηση με NaCl η οποία χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων.

Σύμφωνα με τους Goerges et al., (2006) ανασταλτικοί παράγοντες στην ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών όπως ο *L. monocytogenes* μπορεί να είναι διάφορες αντιμικροβιακές ουσίες όπως οι βακτηριοσίνες, τα οργανικά οξέα και διάφορα άλλα μεταβολικά προϊόντα μικροοργανισμών. Η αλληλεπίδραση που υπάρχει σε αυτή την περίπτωση είναι έμμεση, και συνίσταται στο ότι μεταβάλλεται το περιβάλλον του κάθε παθογόνου μικροοργανισμού με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ανάπτυξή του. Εκτός όμως από την έμμεση, υπάρχει και άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των μικροοργανισμών η οποία έχει να κάνει με την απευθείας επαφή τους (Saraoui et al., 2016).

Επίσης, η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών είναι ένας παράγοντας που αναφέρεται πολύ συχνά σε μελέτες ως παράγοντας που οδηγεί στην αλληλεπίδραση μικροοργανισμών οι οποίοι βρίσκονται στο ίδιο περιβάλλον.

1.5 Νομοθεσία

Η Ευρωπαϊκή ένωση έχει θεσπίσει τον Κανονισμό (ΕΚ) 2073/2005 ο οποίος καθορίζει μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα όσον αφορά τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* τα τρόφιμα που είναι έτοιμα προς κατανάλωση διαφοροποιούνται μεταξύ τους σύμφωνα με το αν μπορούν να υποστηρίξουν ή όχι την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Τα RTEF που δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* είναι τα προϊόντα με $pH \leq 4.4$ ή $a_w \leq 0.92$, εκείνα με $pH \leq 5.0$ και $a_w \leq 0.94$ και εκείνα με διάρκεια ζωής μικρότερη των 5 ημερών. Μπορούν όμως να συμπεριλαμβάνονται και άλλα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που δεν έχουν τα συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, αλλά έχει αποδειχτεί από μελέτες που έχουν κάνει οι διάφορες επιχειρήσεις τροφίμων ότι ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία.

Στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που δεν μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* οι πληθυσμοί του παθογόνου δεν πρέπει να είναι πάνω

από 100 CFU ανά γραμμάριο στη διάρκεια της ζωής τους. Εξαίρεση αποτελούν τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που είναι για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς και για τα βρέφη.

Στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που μπορεί να αναπτυχθεί ο παθογόνος (με εξαίρεση αυτά που είναι για ειδικούς σκοπούς και για τα βρέφη) ισχύουν τα εξής:

A) Σε όλη τη διάρκεια ζωής του προϊόντος τα επίπεδα του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* πρέπει να είναι μικρότερα από 100 CFU/g.

B) Πριν το τρόφιμο φύγει από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης που το παράγει, πρέπει να υπάρχει απουσία του μικροοργανισμού στα 25 g του προϊόντος (CAC, 2007).

C) Στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που είναι για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς και για τα βρέφη πρέπει να υπάρχει απουσία του παθογόνου σε δείγμα 25 g του τροφίμου

1.6 Σκοπός και Αντικείμενο της μελέτης

Είναι γεγονός ότι, ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* μπορεί και επιβιώνει εκδηλώνοντας ανθεκτικότητα στις καταπονήσεις (π.χ. χαμηλό pH και χαμηλές θερμοκρασίες) κάτι που τον κάνει επικίνδυνο για τα τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση λόγω της λοίμωξης που προκαλεί. Η ικανότητα κάποιου παθογόνου να επιβιώνει και να αναπτύσσεται στα τρόφιμα εξαρτάται τόσο από ενδογενείς παράγοντες (φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τροφίμων) όσο και από εξωγενείς παράγοντες (το περιβάλλον που αναπτύσσεται) και το δυναμικό των μικροβίων που είναι παρόντα στα τρόφιμα. Σε διαφορετικά περιβάλλοντα τροφίμων, τελικά προϊόντα ή δείγματα έχουν απομονωθεί παραπάνω από ένα στελέχη του παθογόνου. Σύμφωνα δε με προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του ΓΠΑ τα διαφορετικά στελέχη του παθογόνου δεν συνυπάρχουν απλά, αλλά αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους έτσι ώστε να δημιουργείται σχέση «ισχυρού-αδύναμου». Η σχέση αυτή εκδηλώνεται με το ισχυρό στέλεχος να αναπτύσσεται χωρίς να επηρεάζεται από την ύπαρξη του αδύναμου, ενώ το αδύναμο να φτάνει σε τελικό πληθυσμό χαμηλότερο σε σχέση με αυτόν που φτάνει όταν καλλιεργείται μόνο του δίχως την παρουσία του ισχυρού, στις ίδιες συνθήκες.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση στις συγκαλλιέργειες σε διαφορετικά υποστρώματα, υπό διαφορετική διαθεσιμότητα οξυγόνου, στην ανάπτυξη και τις διαστελεχιακές αλληλεπιδράσεις του παθογόνου *Listeria monocytogenes*.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Σχεδιασμός Πειράματος

2.1.1 Διερεύνηση της επίδρασης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ στελεχών στην ανάπτυξη του παθογόνου *Listeria monocytogenes* με ενσωμάτωση σε ημιστερεό θρεπτικό υπόστρωμα με προσθήκη ενός πηκτικού παράγοντα

Εμβολιασμός στην μάζα του υλικού
2-3 log CFU/mL ή g

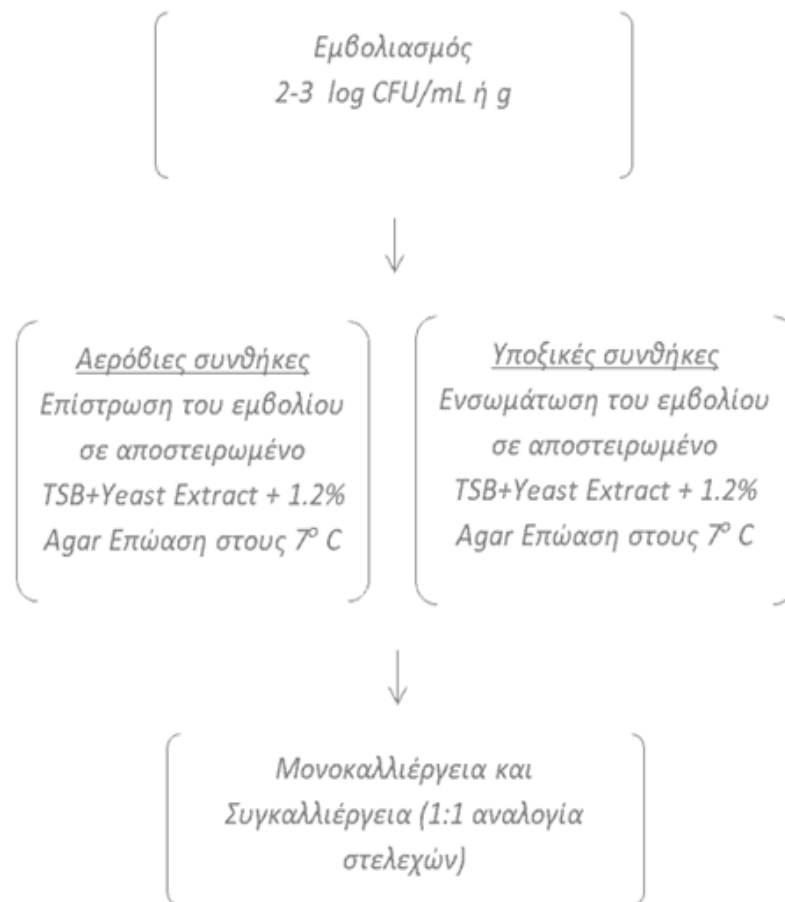


Υποξικές συνθήκες
Αποστειρωμένο TSB+Yeast
Extract + 0,6% Agar
Επώαση στους 7° C

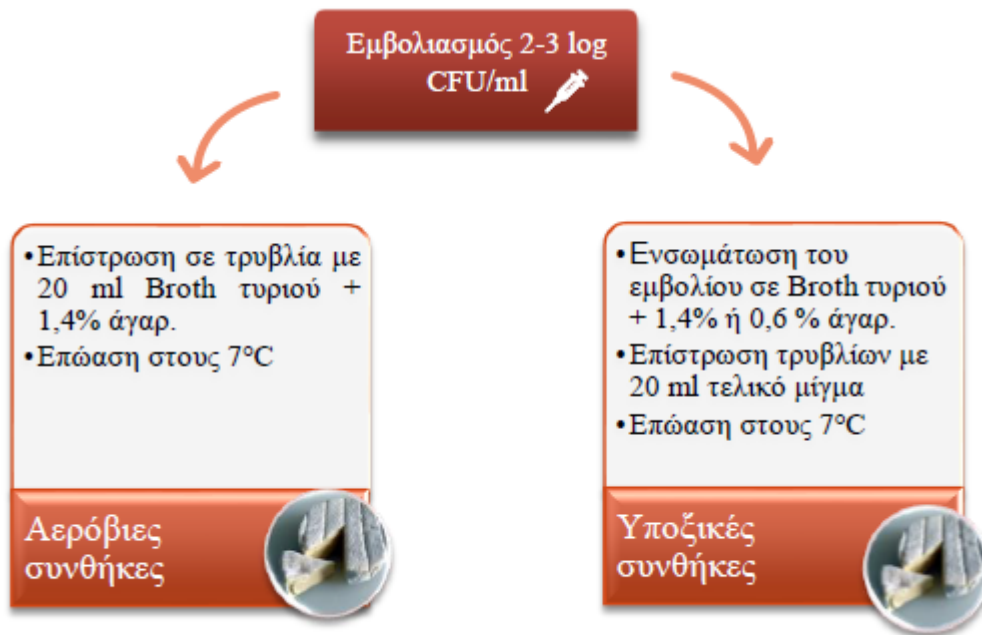


Μονοκαλλιέργεια και
Συγκαλλιέργεια (1:1 αναλογία
στελεχών)

2.1.2 Διερεύνηση της επίδρασης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ στελεχών στην ανάπτυξη του παθογόνου *Listeria monocytogenes* με ενσωμάτωση σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα



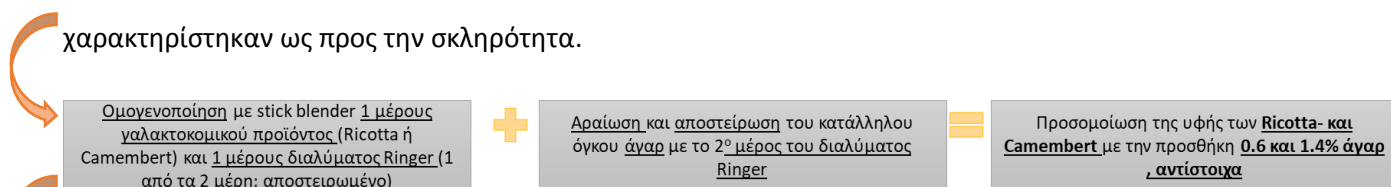
2.1.3 Διερεύνηση της επίδρασης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ στελεχών στην ανάπτυξη του παθογόνου *Listeria monocytogenes* σε υποστρώματα με βάση τα τυροκομικά προϊόντα Ricotta και Camembert (διαφορετική μικροδομής) υπό αερόβιες και υποζικές συνθήκες.



Και για τα δύο είδη τυριών με τελική σύσταση του Broth τυριού: 1 τυρί: 2 Ringer. Το αποτέλεσμα του εμβολιασμού: Μονοκαλλιέργεια και συγκαλλιέργεια με 1:1 αναλογία στελεχών.

2.1.4. Διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ στελεχών κατά τη διάρκεια της συγκαλλιέργειας στελεχών *L. monocytogenes* μέσα ή στην επιφάνεια τυριών.

Ανάλυση του προφίλ υφής (TPA) πραγματοποιήθηκε σε εμπορικές συσκευασίες τυριών Ricotta και Camembert και σε TSB με διαφορετικές συγκεντρώσεις άγαρ (0.2 - 1.8%) που χαρακτηρίστηκαν ως προς την σκληρότητα.



Βακτηριακά κύτταρα ακινητοποιημένα σε μέσο με βάση το γάλα (γαλακτοκομικός ζωμός συμπληρωμένος με 1.4% άγαρ, μέθοδος επιφανειακής επίστρωσης) και σε τυρί Camembert (αερόβιες συνθήκες).

Βακτηριακά κύτταρα ακινητοποιημένα σε ημι-στερεά και στερεά μέσα με βάση το γάλα (γαλακτοκομικός ζωμός συμπληρωμένος με 0.6% ή 1.4% άγαρ, μέθοδος ενσωμάτωσης σε θρεπτικό υλικό) και μέσα στη μάζα του προϊόντος Ricotta (υποξικές συνθήκες).

2.2 Προετοιμασία του εμβολίου

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τρία στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* από τα οποία τα δύο ανήκαν στον ορότυπο 4b (C5 και ScottA) και ένα στον ορότυπο 1/2b (PL25). Τα στελέχη λήφθηκαν από την συλλογή του Εργαστηρίου Υγιεινής και Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων και Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και επιλέχθηκαν ως ανθεκτικά σε διαφορετικά αντιβιοτικά με στόχο την επιλεκτική τους καταμέτρηση. Διατηρούνταν χωριστά σε θερμοκρασία -20°C σε υγρό γενικό εργαστηριακό υπόστρωμα Tryptic Soy Broth με προσθήκη 0,6% Yeast extract (TSB-YE; LABM) και 20% γλυκερόλη. Τα στελέχη ανανεώνονταν κάθε μήνα και διατηρούνταν σε τρυβλία με στερεό γενικό εργαστηριακό υπόστρωμα Tryptic Soy Agar με προσθήκη 0,6% Yeast Extract (TSA-YE; LABM) και με αντιβιοτικό ριφαμπικίνη (50 μg/mL) (AppliChem) ή στρεπτομικίνη (1000 μg/mL) (Streptomycin Sulfate Biochemica, AppliChem). Το στέλεχος C5 ήταν ανθεκτικό στη στρεπτομικίνη, το στέλεχος PL25 στη ριφαμπικίνη, ενώ το στέλεχος ScottA και στα δυο. Οι ανανεώσεις των στελεχών έγιναν ως εξής: Μία αποικία από το κάθε στέλεχος με χρήση μικροβιολογικού κρίκου μεταφερόταν σε 10 mL TSB-YE και 50 μL ή 100 μL ριφαμπικίνης ή στρεπτομικίνης, αντίστοιχα, και αφηνόταν να επωαστεί στους 30°C για 24 ώρες. Κατόπιν, 100μL από κάθε στέλεχος μεταφέρονταν σε νέο TSB-YE με στρεπτομικίνη

ή ριφαμπικίνη και αφηνόταν και πάλι να επωαστεί στους 30°C για 18 ώρες. Για τον καθαρισμό των εμβολίων, πριν τον εμβολιασμό των δειγμάτων, κάθε σωλήνας φυγοκεντρούνταν (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments) στις 3600 στροφές/min στους 4°C, για 10 min. Κατόπιν γινόταν απόρριψη του υπερκειμένου και επαναεώρηση του ιζήματος σε 10 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer (Ringer solution tablets, LABM, Lancashire, UK). Τέλος, η διαδικασία επαναλαμβάνονταν συνολικά τρεις φορές.

2.3 Προετοιμασία δειγμάτων

2.3.1 Αερόβιες συνθήκες - καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Για τη διερεύνηση της ανάπτυξης σε στερεό εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα, υπό αερόβιες συνθήκες παρασκευάστηκε αποστειρωμένο θρεπτικό TSB-YE με 1,2% άγαρ και επιστρώθηκαν σε τρυβλία petri με ποσότητα 20 mL. Κατόπιν έγινε επιφανειακή επίστρωση του εμβολίου υπό ασηπτικές συνθήκες με μονές καλλιέργειες και διαφορετικούς συνδυασμούς των στελεχών που εξετάστηκαν. Τέλος, σφραγίστηκαν τα τρυβλία με parafilm ώστε να μην υπάρχουν απώλειες σε υγρασία και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 7°C, καθόλη την διάρκεια της συντήρησής τους.

2.3.2 Αερόβιες συνθήκες - καλλιέργεια σε εργαστηριακό υπόστρωμα τυριού

Η ίδια περίπου διαδικασία ακολουθήθηκε και για τη μελέτη των διαστελεχιακών αλληλεπιδράσεων σε υπόστρωμα με βάση τα τυροκομικά προϊόντα Ricotta και Camembert. Η πλήρωση των τρυβλίων έγινε με το μίγμα να είναι σε ρευστή φάση, δηλαδή σε μεγαλύτερη θερμοκρασία από τη θερμοκρασία πήξης του άγαρ (40°C). Μετά την πήξη έγινε ενοφθαλμισμός και επιφανειακή εξάπλωση του εμβολίου. Και τέλος τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm ώστε να μην υπάρχουν απώλειες σε υγρασία και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 7°C, για 25 ημέρες (χρόνος συντήρησης κοντά στο χρόνο ζωής των προϊόντων).

2.3.3 Υποξικές συνθήκες - καλλιέργεια σε εργαστηριακό υπόστρωμα τυριού

Ο εμβολιασμός του υποστρώματος με βάση το τυρί και άγαρ, έγινε όταν βρισκόταν ακόμα σε ρευστή μορφή σε αποστειρωμένη φιάλη duran των 250 ml και σε θερμοκρασία 39-40°C. Στη συνέχεια έγινε πλήρωση των τρυβλίων με 20 g εμβολιασμένου μίγματος και εν συνεχεία τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm για την αποφυγή απώλειας της υγρασίας και συντηρήθηκαν για 25 μέρες στους 7°C.

2.3.4 Υποξικές συνθήκες - καλλιέργεια σε ημιστερέο και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Για τη διερεύνηση της ανάπτυξης σε ημιστερέο και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, παρασκευάστηκε αποστειρωμένο TSB-YE με προσθήκη 0,6 και 1,2% άγαρ αντίστοιχα υπό υποξικές συνθήκες και σε ασηπτικές συνθήκες εμβολιάστηκε με τις μονές καλλιέργειες καθώς και τις συγκαλλιέργειες των στελεχών. Κατόπιν, τρυβλία petri επιστρώθηκαν με ποσότητα 20 mL των εμβολιασμένων υποστρωμάτων. Τέλος, επισφραγίστηκαν με parafilm έτσι ώστε να μην υπάρχουν απώλειες σε υγρασία και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 7°C, καθόλη τη διάρκεια της συντήρησής τους. Ο πηκτικός παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε για την εργαστηριακή προσομοίωση της μικροδομής των δύο τυριών είναι το άγαρ, το οποίο λαμβάνεται από κόκκινα άλγη και αποτελείται από μίγμα των πολυσακχαριτών αγαρόζη (70%) και αγαροπηκτίνη. Αυτό τήκεται στους 85°C και στερεοποιείται από 32-40°C. Πολλές επιστημονικές εφαρμογές απαιτούν επώαση σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος (37°C). Έτσι το άγαρ είναι πιο κατάλληλο από άλλους παράγοντες στερεοποίησης που τήκονται σε αυτή τη θερμοκρασία, όπως η ζελατίνη. Ο δείκτης σκληρότητας του κάθε τυριού, για την προσομοίωση της δομής του εργαστηριακά, επιλέχτηκε ως εξής: Αρχικά έγιναν μετρήσεις στα τυριά Camembert και Ricotta στο μηχάνημα Instron. Κατόπιν, έγιναν μετρήσεις σε ελαστικές δομές άγαρ διαφορετικής σύστασης (από 0,2 - 1,8% άγαρ). Από την έρευνα που έγινε βγήκε το συμπέρασμα ότι το ποσοστό άγαρ που προσομοιάζει της σκληρότητα του τυριού Ricotta είναι 0,6% ενώ το ποσοστό άγαρ που προσομοιάζει τη σκληρότητα του τυριού Camembert είναι 1,4%.

2.4 Προετοιμασία και συντήρηση των Τυριών Ricotta και Camembert

Την ημέρα του εμβολιασμού παραλαμβάνονταν ατομικές συσκευασίες τυριών που δεν ήταν κοντά στην ημερομηνία λήξης τους και διατηρούνταν σε θερμοκρασία 4 °C. Για το τυρί Ricotta χρησιμοποιήθηκε η Granarolo (250 g) και για το τυρί Camembert χρησιμοποιήθηκε το “Select Camembert” της Alpenhein (125 g). Με τη χρήση αποστειρωμένου ραβδομπλέντερ και με αραίωση της μάζας του τυριού με Ringer σε 1:2 έγινε η προετοιμασία για τη δημιουργία του “πολτού” τυριών. Μέρος της υπολογισμένης ποσότητας του Ringer χρησιμοποιήθηκε για την αποστείρωση και ανασύσταση του άγαρ. Το τελικό μίγμα προς εμβολιασμό περιείχε, το ζυμό τυριού, Ringer και το ποσοστό επί τοις εκατό του άγαρ (0,6% ή 1,4%) που προσομοιάζει τη σκληρότητα. Με σκοπό τη διερεύνηση της ισχύος του παράγοντα «μικροδομή» έναντι των θρεπτικών συστατικών που διαφοροποιούνται στα 2 τυριά, έγιναν και διασταυρούμενες δοκιμές των ποσοστών άγαρ,

δοκιμάζοντας το 0,6% άγαρ στο Camembert και το 1,4% και στην Ricotta. Συνεπώς, για κάθε τυρί δοκιμάστηκαν και τα 2 ποσοστά άγαρ, αφού τελικά δημιουργήθηκαν 4 διαφορετικά υποστρώματα τυριού:

- Broth Ricotta + 0,6 % άγαρ
- Broth Ricotta + 1,4 % άγαρ
- Broth Camembert + 0,6 % άγαρ
- Broth Camembert +1,4% άγαρ

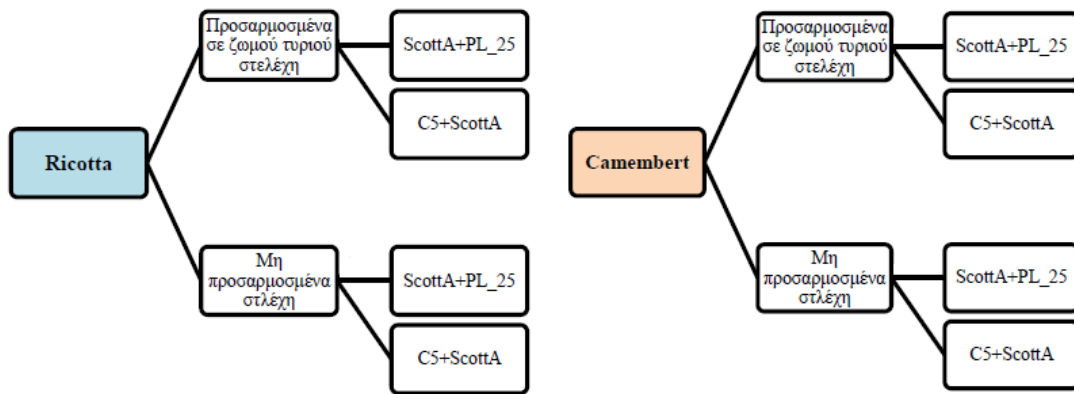
2.4.1 Προετοιμασία δειγμάτων τυριών – εμβολιασμός

Για το σκοπό του πειράματος, αγοράστηκαν συσκευασίες μαλακών τυρομικών προϊόντων Camembert και Ricotta, από τοπικά supermarkets των οποίων η ημερομηνία παραγωγής τους ήταν πολύ κοντά στην ημερομηνία προμήθειάς τους. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τυριών όπως γράφονται στη συσκευασία τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τυριών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

Όνομασία τυριού	Ελάχιστη λιπ/τητα επί ξηρού	Λιπ/τητα ως έχει	Μέγιστη υγρασία	NaCl (%)
Camembert	50%	25%	50%	2
Ricotta	44%	12%	80%	0.3

Μετά τη διαπίστωση της χαμηλής αρχικής ενδογενούς μικροχλωρίδας, γινόταν ο εμβολιασμός. Το τυρί Camembert κόπηκε σε φέτες, $6 \times 2 \text{cm}^2$ (10g) στο εργαστήριο, υπό ασηπτικές συνθήκες. Από τη συσκευασία του τυριού Ricotta ελήφθησαν 10 gr μετά από ζύγιση τα οποία τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους ουροσυλλέκτες. Ο εμβολιασμός και στα δύο είδη τυριού έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες τόσο με τις μονοκαλλιέργειες όσο και με τις συγκαλλιέργειες στελεχών, οι συνδυασμοί των οποίων φαίνονται στο παρακάτω σχήμα:



Οι συνδυασμοί στελεχών του παθογόνου *L. monocytogenes* που συγκαλλιεργήθηκαν σε τυριά Ricotta και Camembert παρουσιάζονται στο παραπάνω σχήμα

Στο Camembert η εξαπλώση του εμβολίου έγινε και στις δύο πλευρές της κάθε φέτας τυριού και εξαπλώθηκε σε όλη την επιφάνεια της φέτας. Κατόπιν συσκευάστηκε σε πλαστικές σακούλες και τόσο αυτό όσο και το τυρί Ricotta συντηρήθηκαν κάτω από αερόβιες συνθήκες σε θάλαμο θερμοκρασίας 7°C που είναι μια συνήθης θερμοκρασία που μπορεί να επιτευχθεί τόσο στα οικιακά ψυγεία όσο και στα ψυγεία μεταφοράς των προϊόντων.

2.5 Μικροβιολογικές και φυσικοχημικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν

Οι δειγματοληψίες έγιναν κάθε 20 περίπου μέρες, ώστε να είναι δυνατή η περιγραφή της καμπύλης ανάπτυξης των στελεχών τα οποία βρίσκονται σε μονοκαλλιέργεια αλλά και εκείνων που ήταν σε συγκαλλιέργεια με άλλα στελέχη. Στις δειγματοληψίες των στερεών δειγμάτων το άγαρ μεταφερόταν σε αποστειρωμένες σακούλες stomacher με φίλτρο και αραιωνόταν με αποστειρωμένο διάλυμα Ringer σε αναλογία 1:4. Κατόπιν γινόταν ομογενοποίηση του περιεχομένου της σακούλας σε συσκευή stomacher (Interscience, France) για 1 min. Όσον αφορά στα υγρά δείγματα, ποσότητα δείγματος μεταφερόταν σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon με τη χρήση αποστειρωμένων συρίγγων. Ακολουθούσαν κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις δειγμάτων τα οποία επιστρωνόντουσαν επιφανειακά σε επιλεκτικά ή μη επιλεκτικά υποστρώματα. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης, σε κάθε σημείο δειγματοληψίας χρησιμοποιούνταν δύο δείγματα. Η καταμέτρηση των στελεχών το παθογόνου *L. monocytogenes* γινόταν σε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα TSA-YE με προσθήκη ριφαμπικίνης (50μg/ml) (AppliChem) ή στρεπτομικίνης (1000μg/ml), με την μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης. Η καταμέτρηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX) έγινε σε μη επιλεκτικό υπόστρωμα TSA-YE. Η επώαση των τριβλύων γίνονταν σε σε

κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C για δύο μέρες και οι αποικίες του παθογόνου που καταμετρούνταν εμφανίζονταν με υπόλευκο χρώμα. Η μέτρηση του pH των δειγμάτων γίνονταν σε κάθε δειγματοληψία, ενώ γίνονταν και μέτρηση της ενεργότητας του νερού a_w .

Όσον αφορά στα τυριά, δύο τεμάχια τυριών Camembert, μεταφέρονταν σε αποστειρωμένες σακούλες Stomacher με φίλτρο και αραιώνονταν με αποστειρωμένο διάλυμα Ringer σε αναλογία 1:4, και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως στα στερεά (ομογενοποίηση, δεκαδικές αραιώσεις κ.λπ). Η ίδια αναλογία αραιώσεως γινόταν και σε δύο ουροσυλλέκτες με Ricotta και σε κάθε δειγματοληψία. Στο περιεχόμενο της σακούλας ή του ουροσυλλέκτη, γίνονταν και πάλι δεκαδικές αραιώσεις και ενσωματώνονταν (1 mL) ή επιστρώνονταν επιφανειακά (100 μ L), σε επιλεκτικά ή μη επιλεκτικά υποστρώματα. Η καταμέτρηση των στελεχών του *L. monocytogenes* σε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα TSA-YE με ριφαμπικίνη (50 μ g/ml) (AppliChem) ή στρεπτομικίνη (1000 μ g/ml), με την μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης. Μετά γινόταν η επώαση των τρυβλίων σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 2 ημέρες και οι αποικίες του παθογόνου μπορούσαν να μετρηθούν γιατί εμφανίζονταν ως υπόλευκες κηλίδες.

3. Αποτελέσματα - Συζήτηση

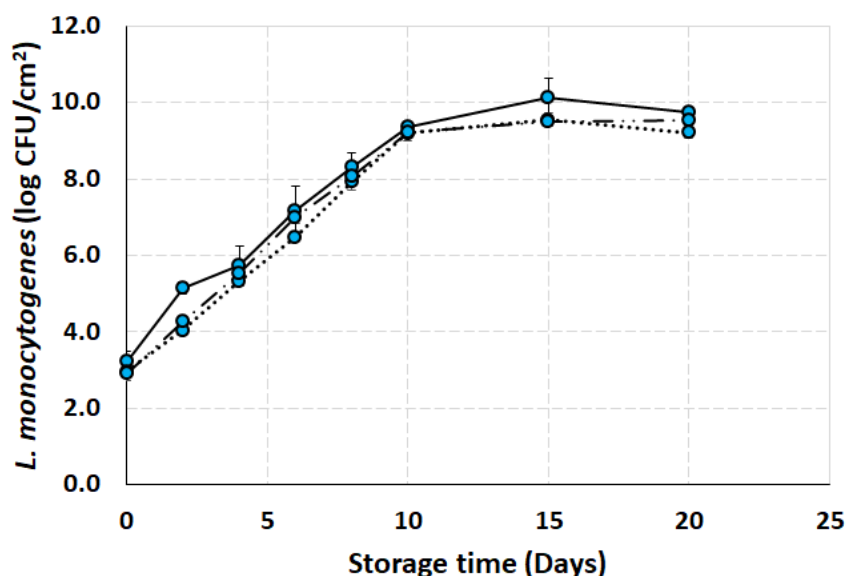
Παρακάτω, παρουσιάζονται με τη μορφή γραφημάτων οι σχέσεις μεταξύ του $\log \text{CFU}/\text{cm}^2$ και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη του στελέχους C5 κατά τη μονή καλλιέργεια (σημεία συνδεδόμενα με συνεχή γραμμή) στα διάφορα υποστρώματα. Στα ίδια γραφήματα παρουσιάζονται και οι αντίστοιχες σχέσεις για τις συγκαλλιέργειες του C5, με ScottA (σημεία συνδεδόμενα με διακεκομμένη γραμμή) καθώς και με PL25 (σημεία συνδεδόμενα με γραμμή που αποτελείται από παύλες και τελείες).

3.1 Ανάπτυξη του στελέχους C5 του *L.monocytogenes* σε TSA-YE άγαρ

3.1.1 Αερόβιες συνθήκες

3.1.1a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ δεν υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους C5 .

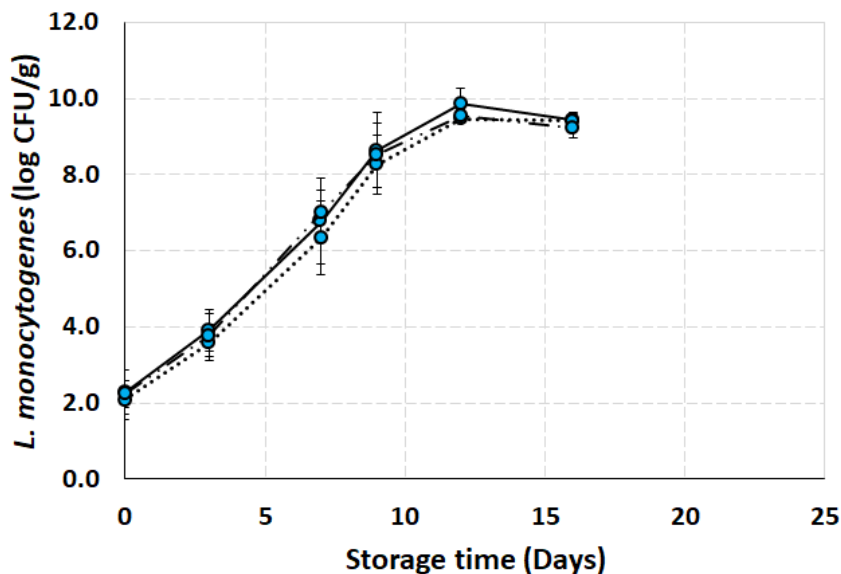
3.1.1b Αντίθετα σε στερεό με 1,2% άγαρ υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους C5 και η σχέση μεταξύ του $\log \text{CFU}/\text{cm}^2$ και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες, παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.1.1.



Γράφημα 3.1.1: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους C5 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη Scott A και PL25, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε στερεό υπόστρωμα υπό αερόβιες συνθήκες.

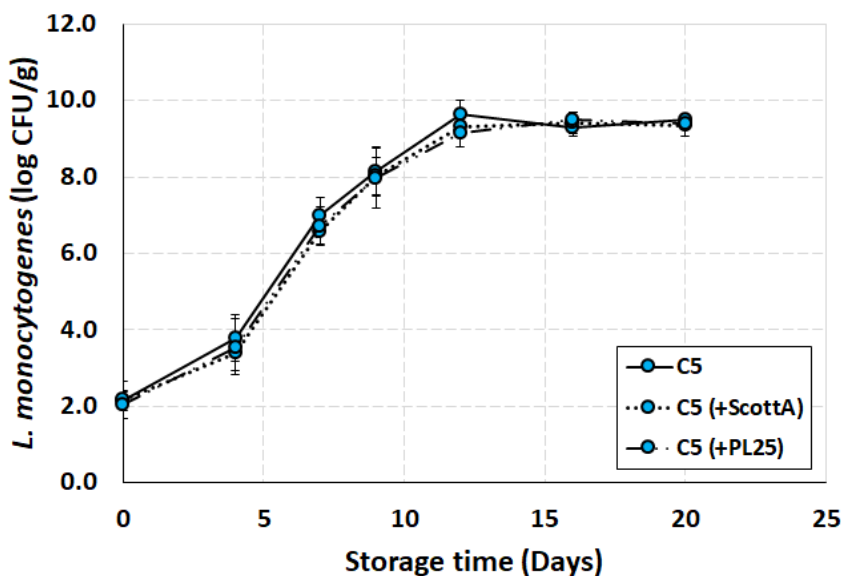
3.1.2 Υποξικές συνθήκες

3.1.2a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ **υπήρξε** ανάπτυξη του στελέχους C5 η οποία παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.1.2a



Γράφημα 3.1.2a: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους C5 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη Scott A και PL25, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε ημιστερεό υπόστρωμα υπό υποξικές συνθήκες.

3.1.2b Σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με 1,2% άγαρ υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους C5 η οποία παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.1.2b



Γράφημα 3.1.2b: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους C5 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη Scott A και PL25, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε στερεό υπόστρωμα υπό υποξικές συνθήκες.

Όπως προκύπτει από την παρουσίαση των αποτελεσμάτων (βλ 3.1.1a) δεν υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους C5 σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ ούτε σε μονοκαλλιέργεια ούτε σε συγκαλλιέργεια με τα άλλα 2 στελέχη, **κάτω από αερόβιες συνθήκες**. Υπήρξε όμως ανάπτυξη του συγκεκριμένου στελέχους **κάτω από υποξικές συνθήκες** η οποία μάλιστα ήταν παρόμοια είτε είχαμε μονοκαλλιέργεια είτε είχαμε συγκαλλιέργεια με τα στελέχη ScottA και PL25 (βλ 3.1.2a).

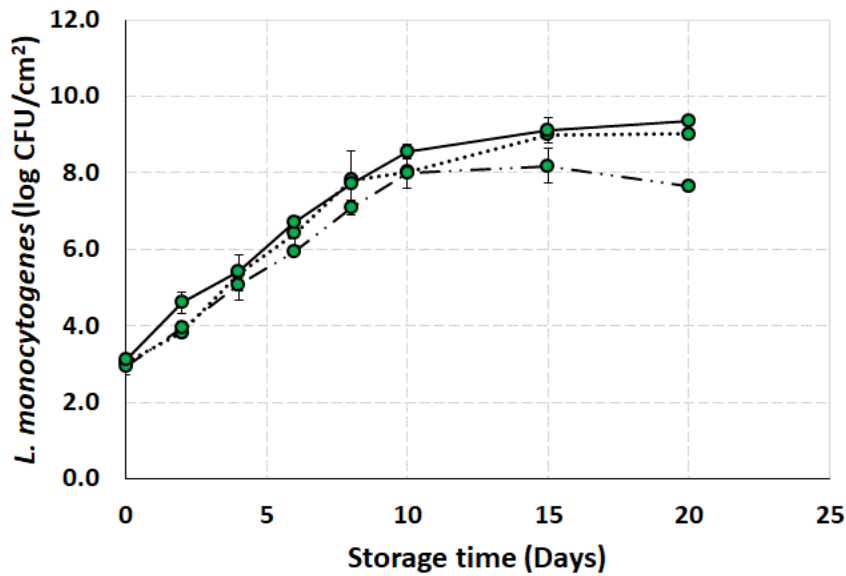
Αντίθετα, σε στερεό με 1,2% άγαρ είχαμε ανάπτυξη του στελέχους C5 **τόσο σε αερόβιες όσο και σε υποξικές συνθήκες**. Η ανάπτυξη του C5 ήταν παρόμοια είτε είχαμε μονοκαλλιέργεια, είτε το C5 βρισκόταν σε συγκαλλιέργεια με τα στελέχη ScottA και PL25 (βλ 3.1.1b και 3.1.2b)

3.2 Ανάπτυξη του στελέχους ScottA του *L.monocytogenes* σε TSA-YE άγαρ
Παρακάτω, παρουσιάζονται με τη μορφή γραφημάτων οι σχέσεις μεταξύ του log CFU/cm² και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη του στελέχους ScottA κατά τη μονή καλλιέργεια (σημεία συνδεόμενα με συνεχή γραμμή) στα διάφορα υποστρώματα. Στα ίδια γραφήματα παρουσιάζονται και οι αντίστοιχες σχέσεις για τις συγκαλλιέργειες του ScottA με C5 (σημεία συνδεόμενα με γραμμή που αποτελείται από παύλες και τελείες) καθώς και με PL25 (σημεία συνδεόμενα με διακεκομμένη γραμμή).

3.2.1 Αερόβιες συνθήκες

3.2.1a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ δεν υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους ScottA .

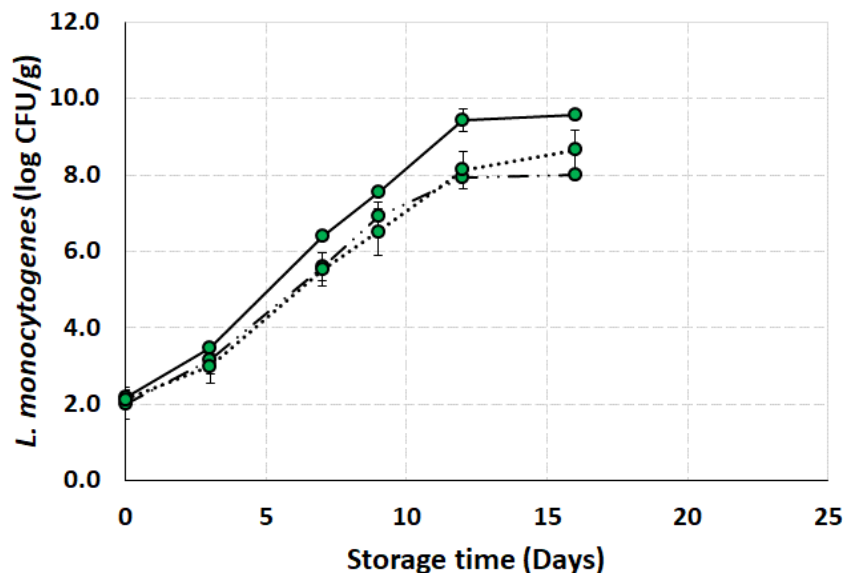
3.2.1b Αντίθετα σε στερεό με 1,2% άγαρ υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους ScottA και η σχέση μεταξύ του log CFU/cm² και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες, παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.2.1.



Γράφημα 3.2.1: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους Scott A του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και PL25, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε στερεό υπόστρωμα υπό αερόβιες συνθήκες.

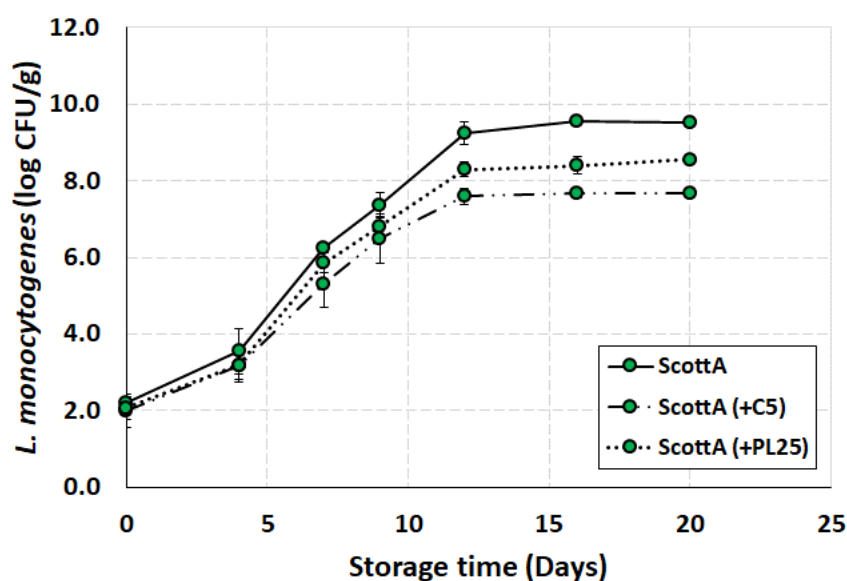
3.2.2 Υποξικές συνθήκες

3.2.2a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ **υπήρξε** ανάπτυξη του στελέχους ScottA κάτω από υποξικές συνθήκες και αυτή παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.2.2a



Γράφημα 3.2.2a: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους Scott A του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε ημιστερεό υπόστρωμα κάτω από υποξικές συνθήκες.

3.2.2b Σε στερεό με 1,2% άγαρ υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους Scott A κάτω από υποξικές συνθήκες και αυτή παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.2.2b.



Γράφημα 3.2.2b: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους ScottA του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7° C σε στερεό υπόστρωμα κάτω από υποξικές συνθήκες

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, όσον αφορά στην καλλιέργεια του ScottA είτε αναφερόμαστε σε μονοκαλλιέργεια είτε σε συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα, δεν υπήρξε ανάπτυξη του μικροβίου **κάτω από αερόβιες συνθήκες** σε ημιστερεό υπόστρωμα με 0,6% άγαρ (βλ 3.2.1a).

Κατά την μονοκαλλιέργεια όμως του ScottA καθώς και κατά την συγκαλλιέργειά του με τα στελέχη C5 και PL25 **κάτω υπό υποξικές συνθήκες** σε ημιστερεό υπόστρωμα με άγαρ 0,6% υπήρξε ανάπτυξη του μικροβίου η οποία ήταν μεγαλύτερη στην περίπτωση της μονοκαλλιέργειας, ενώ κατά τη συγκαλλιέργειά του με τα άλλα στελέχη, η μικρότερη ανάπτυξη ήταν κατά τη συγκαλλιέργειά του με το C5. Η ανάπτυξη κατά τη συγκαλλιέργεια του ScottA με το PL25 ήταν ελαφρά μεγαλύτερη από εκείνη με το C5 και μικρότερη από την αντίστοιχη μονοκαλλιέργεια του ScottA (βλ 3.2.2a).

Σε στερεό με υπόστρωμα 1,2% άγαρ υπήρξε ανάπτυξη τόσο κάτω από αερόβιες όσο και κάτω από υποξικές συνθήκες. **Κατά τις αερόβιες συνθήκες** η ανάπτυξη του

ScottA κατά τη μονοκαλλιέργεια ήταν παρόμοια με εκείνη κατά τη συγκαλλιέργειά του με το στέλεχος C5. Η ανάπτυξη όμως του Scott A, σε στερεό με υπόστρωμα 1,2% άγαρ κατά τη συγκαλλιέργειά του με το στέλεχος PL25 ήταν στο τέλος της συντήρησης αισθητά μικρότερη (βλ 3.1.1b).

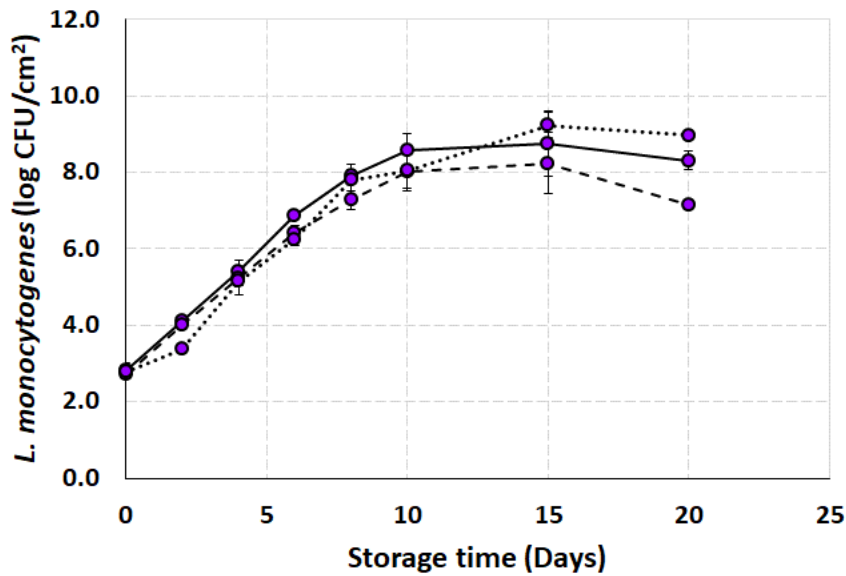
Κατά την μονοκαλλιέργεια του ScottA καθώς και κατά τη συγκαλλιέργειά του με το στέλεχος C5 και PL25 αντίστοιχα, **κάτω υπό υποξικές συνθήκες** υπήρξε ανάπτυξη του μικροβίου, με τη μονοκαλλιέργεια να υπερέχει των συγκαλλιεργειών του με τα άλλα 2 στελέχη αισθητά. Η συγκαλλιέργεια του Scott A με το PL25 έδωσε τελικά ελαφρά μεγαλύτερη ανάπτυξη από εκείνη με το C5 (βλ 3.2.2b).

3.3. Ανάπτυξη του στελέχους PL25 του *L.monocytogenes* σε TSA-YE άγαρ
Παρακάτω, παρουσιάζονται με τη μορφή γραφημάτων οι σχέσεις μεταξύ του \log CFU/cm² και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη του στελέχους PL25 κατά τη μονή καλλιέργεια (σημεία συνδεόμενα με συνεχή γραμμή) στα διάφορα υποστρώματα. Στα ίδια γραφήματα παρουσιάζονται και οι αντίστοιχες σχέσεις για τις συγκαλλιέργειες του PL25 με C5 (σημεία συνδεόμενα με γραμμή που αποτελείται από παύλες και τελείες) καθώς και με Scott A (σημεία συνδεόμενα με διακεκομμένη γραμμή).

3.3.1 Αερόβιες συνθήκες

3.3.1a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ δεν υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους PL25.

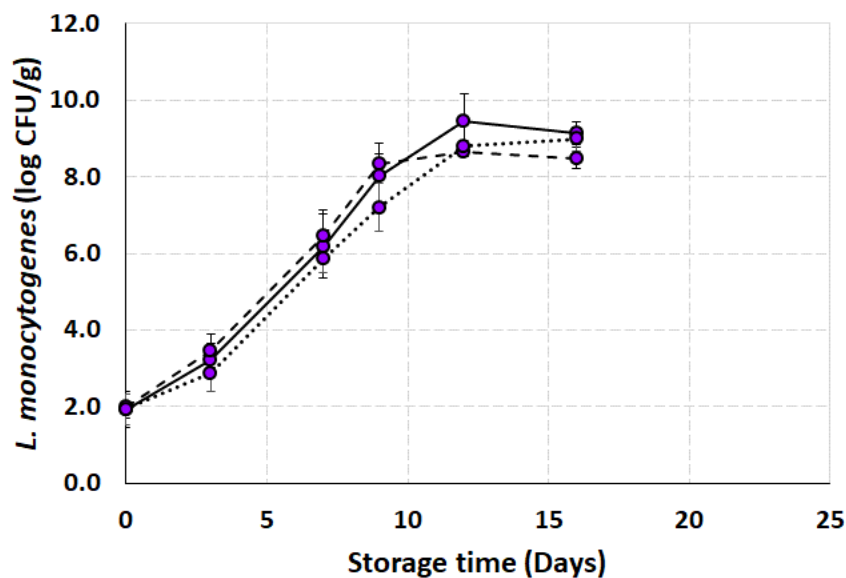
3.3.1b Αντίθετα σε στερεό με 1,2% άγαρ υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους PL25 και η σχέση μεταξύ του \log CFU/cm² και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες, παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.2.1.



Γράφημα 3.3.1: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους PL25 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και ScottA αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε στερεό υπόστρωμα υπό αερόβιες συνθήκες.

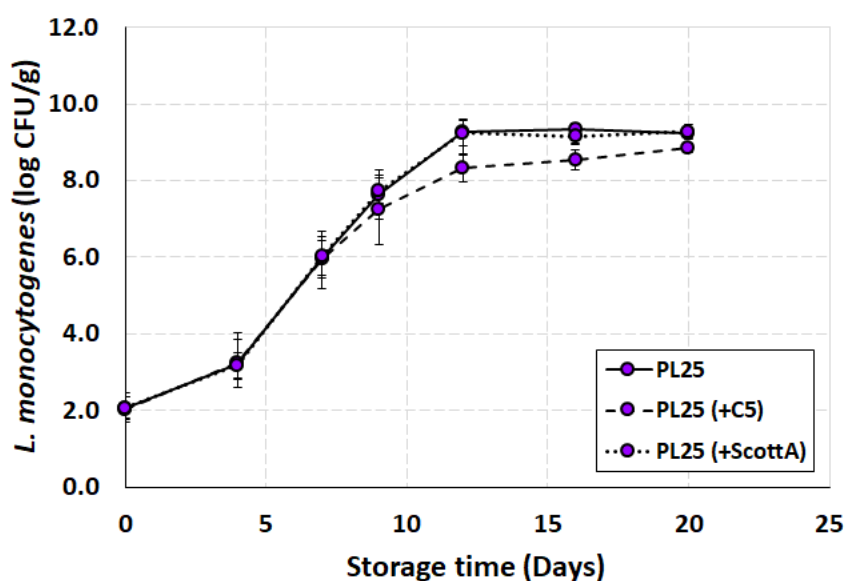
3.3.2 Υποξικές συνθήκες

3.3.2a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ **υπήρξε** ανάπτυξη του στελέχους PL25 κάτω από υποξικές συνθήκες και αυτή παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.3.2a.



Γράφημα 3.3.2a: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους PL25 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και ScottA αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε ημιστερεό υπόστρωμα κάτω από υποξικές συνθήκες.

3.3.2b Σε στερεό με 1,2% άγαρ **υπήρξε** ανάπτυξη του στελέχους PL25 κάτω από υποξικές συνθήκες και αυτή παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.3.2b.



Γράφημα 3.3.2b: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους PL25 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και ScottA αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε στερεό υπόστρωμα κάτω από υποξικές συνθήκες

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι, δεν υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους PL25 σε ημιστερεό υπόστρωμα με άγαρ 0,6% τόσο κατά τη μονοκαλλιέργειά του όσο και κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη Scott A και C5 αντίστοιχα, **κάτω από αερόβιες συνθήκες**.

Αντίθετα, **κάτω από υποξικές συνθήκες** σε ημιστερεό με άγαρ 0,6% υπήρξε ανάπτυξη και κατά την μονοκαλλιέργεια και κατά τις συγκαλλιέργειες του μικροοργανισμού, με την μονοκαλλιέργεια να υπερέχει ελαφρά των συγκαλλιεργειών ως προς την τελική ανάπτυξή του. Από τις συγκαλλιέργειες υπερέχει ελαφρά εκείνη με το Scott A η οποία όμως κατέληξε σε πολύ λίγο μικρότερη ανάπτυξη από εκείνη της μονοκαλλιέργειας (βλ 3.3.2a).

Σε στερεό με υπόστρωμα 1,2% άγαρ υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους PL25 του μικροοργανισμού τόσο κάτω από αερόβιες όσο και κάτω από υποξικές συνθήκες. **Κάτω από αερόβιες συνθήκες** η ανάπτυξη του μικροβίου ήταν διαφοροποιημένη στο τέλος με τη συγκαλλιέργεια του PL25 με το Scott A να παρουσιάζει ελαφρά

μεγαλύτερη ανάπτυξη από εκείνη της μονοκαλλιέργειας του PL25 και της συγκαλλιέργειάς του με το C5. Τη μικρότερη ανάπτυξη τελικά την είχε η συγκαλλιέργεια του PL25 με το C5 (βλ 3.3.1b).

Η μονοκαλλιέργεια του PL25 καθώς και η συγκαλλιέργειά του με το Scott A σε στερεό με υπόστρωμα 1,2 % άγαρ **κάτω από υποξικές συνθήκες** ήταν πανομοιότυπες και έφτασαν στο ίδιο επίπεδο ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Ελαφρά διαφοροποιημένη ως προς την ανάπτυξη υπήρξε η συγκαλλιέργεια του PL25 με το C5 διατηρούμενη όμως μικρότερη από τη μονοκαλλιέργεια και την αντίστοιχη συγκαλλιέργεια με το Scott A καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης (βλ 3.3.2b).

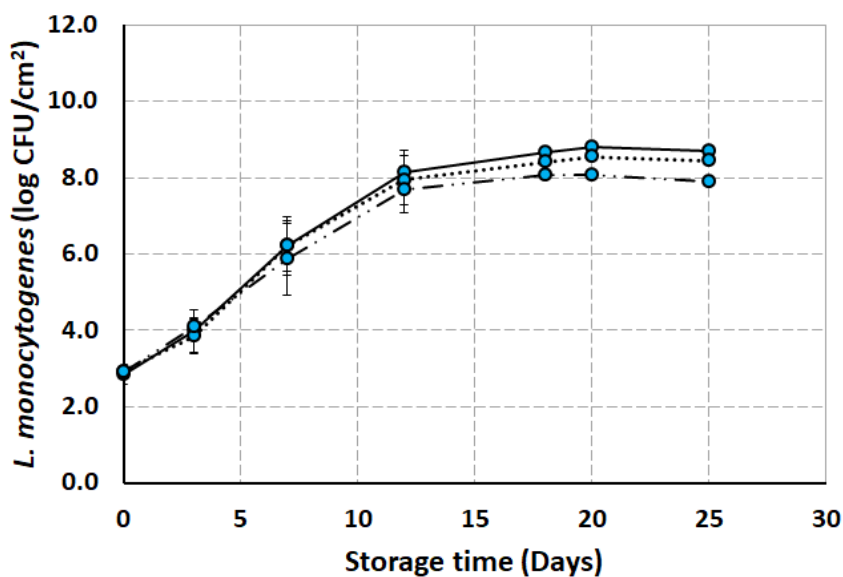
Παρακάτω, παρουσιάζονται με τη μορφή γραφημάτων οι σχέσεις μεταξύ του \log CFU/cm² και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη του στελέχους C5 κατά τη μονή καλλιέργεια (σημεία συνδεόμενα με συνεχή γραμμή) στα διάφορα υποστρώματα με βάση το τυρί Ricotta. Στα ίδια γραφήματα παρουσιάζονται και οι αντίστοιχες σχέσεις για τις συγκαλλιέργειες του C5, με ScottA (σημεία συνδεόμενα με διακεκομμένη γραμμή) καθώς και με PL25 (σημεία συνδεόμενα με γραμμή που αποτελείται από παύλες και τελείες).

3.4 Ανάπτυξη του στελέχους C5 του *L.monocytogenes* σε θρεπτικό μέσο με βάση το τυρί Ricotta

3.4.1 Αερόβιες συνθήκες

3.4.1a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ δεν υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους C5 .

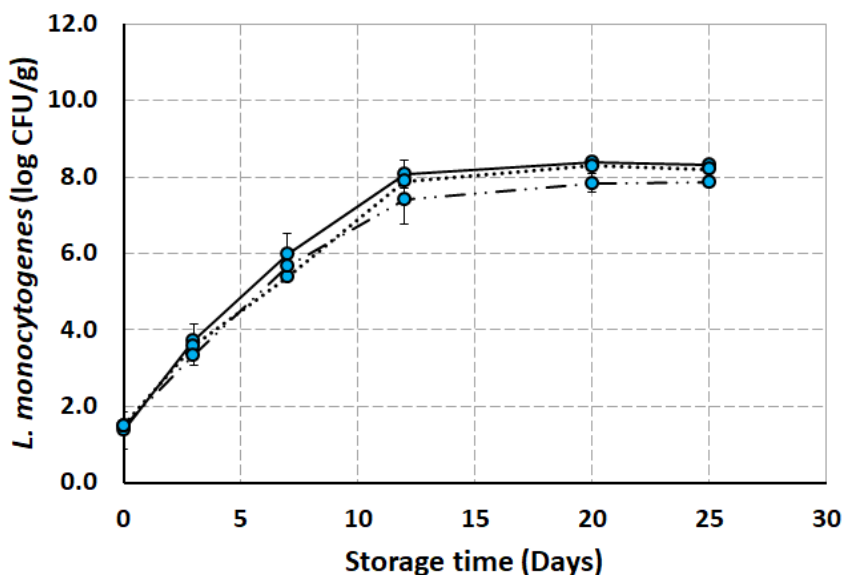
3.4.1b Αντίθετα σε στερεό με 1,4% άγαρ υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους C5 και η σχέση μεταξύ του \log CFU/cm² και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες, παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.4.1.



Γράφημα 3.4.1: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους C5 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη ScottA και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 1,4% άγαρ, σε τυρί Ricotta κάτω από αερόβιες συνθήκες

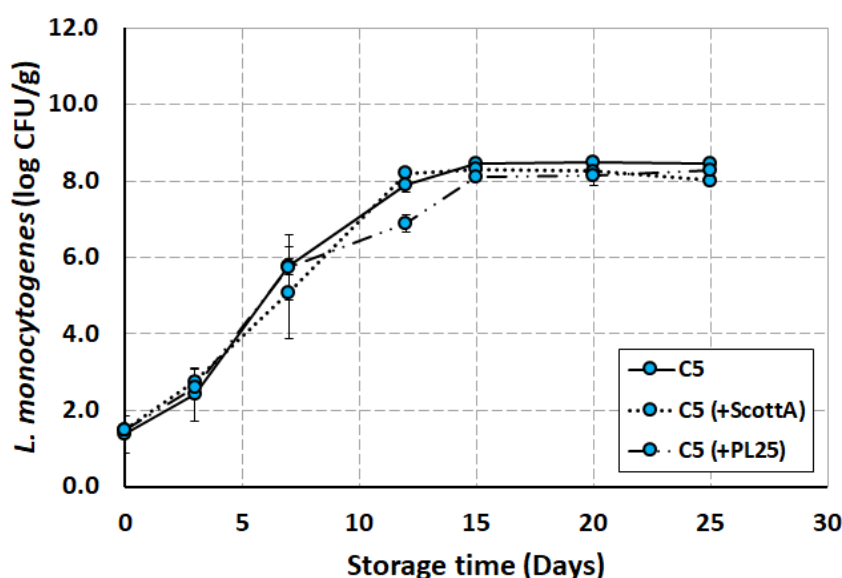
3.4.2 Υποξικές συνθήκες

3.4.2a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ **υπήρξε** ανάπτυξη του στελέχους C5 η οποία παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.4.2a



Γράφημα 3.4.2a: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους C5 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη ScottA και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 0,6% άγαρ, σε τυρί Ricotta κάτω από υποξικές συνθήκες.

3.4.2b Σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με 1,4% άγαρ υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους C5 η οποία παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.4.2b



Γράφημα 3.4.2b: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους C5 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη ScottA και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 1,4% άγαρ, σε τυρί Ricotta κάτω από υποξικές συνθήκες.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, ανάπτυξη του στελέχους C5 σε ημιστερεό υπόστρωμα με άγαρ 0,6% και με βάση το τυρί Ricotta, δεν υπήρξε **κάτω από αερόβιες συνθήκες** ούτε κατά τη μονοκαλλιέργεια αλλά ούτε και κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη Scott A και PL25 αντίστοιχα (βλ 3.4.1a).

Αντίθετα σε στερεό υπόστρωμα με άγαρ 1,4% και με βάση το τυρί Ricotta υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους C5 του μικροοργανισμού **κάτω από αερόβιες συνθήκες** (βλ 3.4.1b) τόσο κατά τη μονοκαλλιέργειά του όσο και με τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη Scott A και PL25 αντίστοιχα. Όπως φαίνεται και στο Γράφημα 3.4.1, η ανάπτυξη του πληθυσμού του C5 κατά τη μονοκαλλιέργεια ήταν σχεδόν παρόμοια με εκείνη κατά τη συγκαλλιέργεια με το στέλεχος Scott A, ενώ η ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά τη συγκαλλιέργεια με το PL25 ήταν ελάχιστα μικρότερη.

Οι αναπτύξεις του στελέχους C5 σε ημιστερεό υπόστρωμα με άγαρ 0,6% και με βάση το τυρί Ricotta **κάτω από υποξικές συνθήκες** τόσο κατά τη μονοκαλλιέργεια του στελέχους όσο και κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη Scott A και PL25

αντίστοιχα ήταν σχεδόν παρόμοιες (βλ 3.4.2a). Την ίδια μορφή περίπου είχαν και οι αναπτύξεις του C5 (μονοκαλλιέργεια και συγκαλλιέργειες με τα Scott A και PL25 αντίστοιχα) σε στερεό υπόστρωμα με άγαρ 1,4% με βάση το τυρί Ricotta (βλ 3.4.2b).

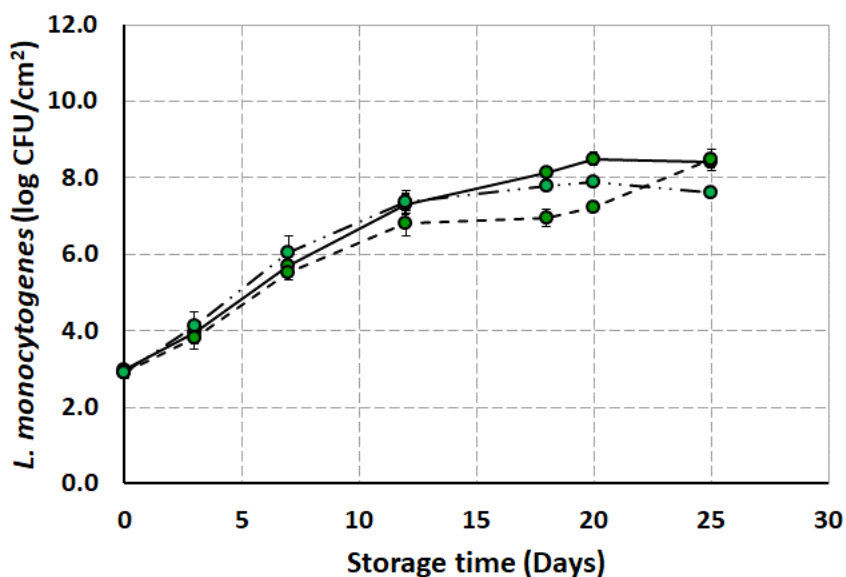
3.5 Ανάπτυξη του στελέχους ScottA του *L.monocytogenes* σε θρεπτικό μέσο με βάση το τυρί Ricotta

Παρακάτω, παρουσιάζονται με τη μορφή γραφημάτων οι σχέσεις μεταξύ του log CFU/cm² και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη του στελέχους ScottA κατά τη μονή καλλιέργεια (σημεία συνδεόμενα με συνεχή γραμμή) στα διάφορα υποστρώματα. Στα ίδια γραφήματα παρουσιάζονται και οι αντίστοιχες σχέσεις για τις συγκαλλιέργειες του ScottA με C5 (σημεία συνδεόμενα με γραμμή που αποτελείται από παύλες και τελείες) καθώς και με PL25 (σημεία συνδεόμενα με διακεκομμένη γραμμή).

3.5.1 Αερόβιες συνθήκες

3.5.1a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ δεν υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους ScottA .

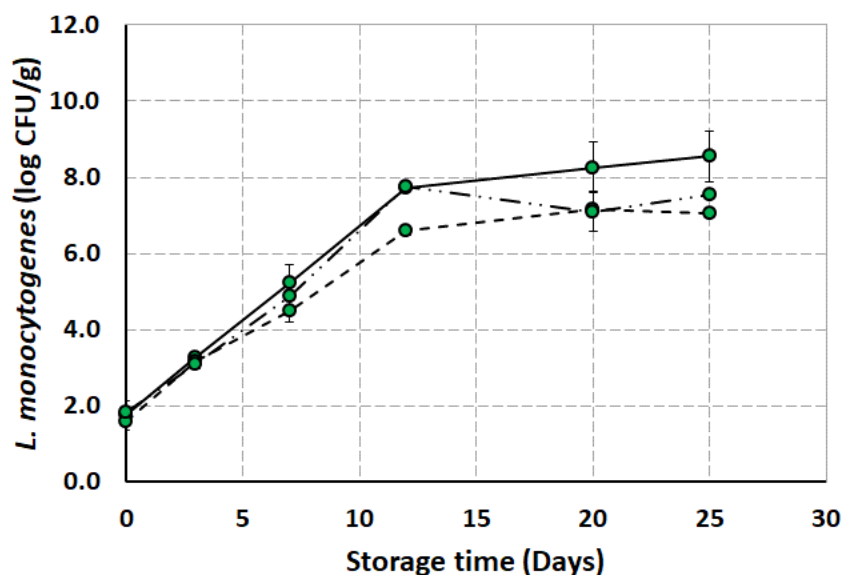
3.5.1b Αντίθετα σε στερεό με 1,4% άγαρ υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους ScottA και η σχέση μεταξύ του log CFU/cm² και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες, παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.5.1.



Γράφημα 3.5.1: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους ScottA του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και PL25, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 1,4% άγαρ, σε τυρί Ricotta υπό αερόβιες συνθήκες.

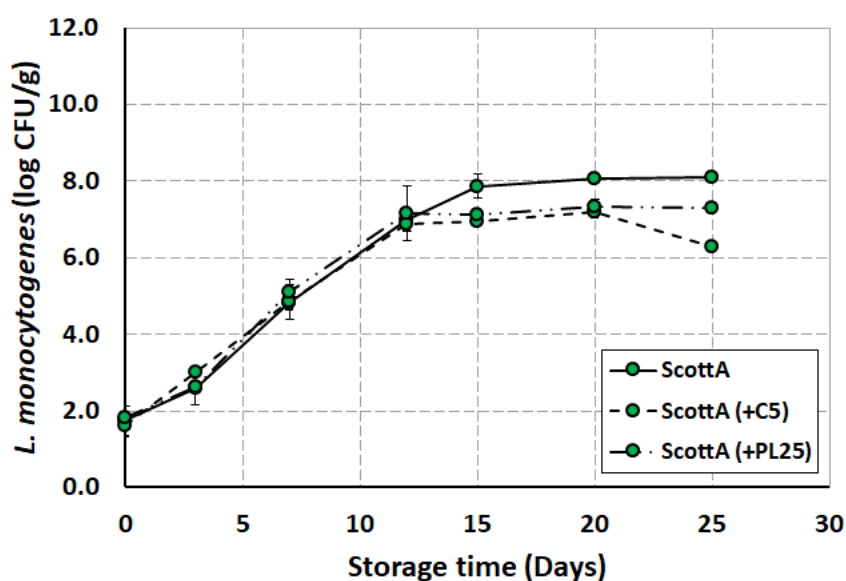
3.5.2 Υποξικές συνθήκες

3.5.2α Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ **υπήρξε** ανάπτυξη του στελέχους ScottA κάτω από υποξικές συνθήκες και αυτή παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.5.2α



Γράφημα 3.5.2α: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους Scott A του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 0,6% άγαρ σε τυρί Ricotta κάτω από υποξικές συνθήκες

3.5.2b Σε στερεό με 1,4% άγαρ **υπήρξε** ανάπτυξη του στελέχους Scott A κάτω από υποξικές συνθήκες και αυτή παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.5.2b.



Γράφημα 3.5.2b: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους ScottA του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 1,4% άγαρ σε τυρί Ricotta κάτω από υποξικές συνθήκες.

Ανάπτυξη του στελέχους Scott A σε ημιστερεό υπόστρωμα με άγαρ 0,6% και με βάση το τυρί Ricotta δεν υπήρξε **κάτω από αερόβιες συνθήκες** ούτε κατά τη μονοκαλλιέργεια αλλά ούτε και κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα (βλ 3.5.1a).

Σε στερεό όμως υπόστρωμα με άγαρ 1,4% και βάση το τυρί Ricotta υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους Scott A **κάτω από αερόβιες συνθήκες** τόσο κατά την μονοκαλλιέργειά του όσο και κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα (βλ 3.5.1b). Όπως δείχνει το Γράφημα 3.5.1 η ανάπτυξη του πληθυσμού του Scott A κατά τη μονοκαλλιέργεια ήταν τελικά ελαφρά μεγαλύτερη από την ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα άλλα δύο στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα με τη συγκαλλιέργεια του C5 να υπολείπεται αρχικά της μονοκαλλιέργειας αλλά τελικά να καταλήγει σε παρόμοιο πληθυσμό με αυτήν ενώ η συγκαλλιέργεια με το PL25 να καταλήγει σε μικρότερο πληθυσμό του παθογόνου κάτι που πιθανά να υποδεικνύει διαστελεχειακή αλληλεπίδραση.

Η ανάπτυξη του στελέχους Scott A του παθογόνου κατά τη μονοκαλλιέργεια σε ημιστερεό υπόστρωμα με άγαρ 0,6% με βάση το τυρί Ricotta **σε υποξικές συνθήκες** φαίνεται να είναι αισθητά διαφορετική από την ανάπτυξη που έχει το στέλεχος αυτό κατά τη συγκαλλιέργειά του με τα στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα (βλ 3.5.2a). Ειδικότερα, η ανάπτυξη κατά τη συγκαλλιέργεια με το στέλεχος PL25 αρχικά συμβαδίζει με εκείνη της μονοκαλλιέργειας, αλλά μετά τη δωδέκατη μέρα συντήρησης διαφοροποιείται από αυτήν καταλήγοντας τελικά σε αρκετά μικρότερο πληθυσμό. Η συγκαλλιέργεια με το στέλεχος C5 διαφοροποιείται αρκετά νωρίτερα (μετά την 3^η μέρα συντήρησης). Καταλήγοντας όμως και πάλι σε μικρότερο πληθυσμό από την μονοκαλλιέργεια, αλλά ελάχιστα μεγαλύτερο από εκείνον της συγκαλλιέργειας με το PL25.

Η ανάπτυξη του στελέχους Scott A κατά τη μονοκαλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα με άγαρ 1,4% και βάση το τυρί Ricotta **σε υποξικές συνθήκες** αρχικά συμβαδίζει με τις συγκαλλιέργειες του στελέχους με τα στελέχη C5 και PL25 μέχρι τη 12^η μέρα συντήρησης. Από κει και μετά οι συγκαλλιέργειες διαφοροποιούνται αισθητά καταλήγοντας τελικά σε μικρότερους πληθυσμούς με τη συγκαλλιέργεια του Scott A με το C5 να καταλήγει στον μικρότερο πληθυσμό, ενώ εκείνη με το PL25 να καταλήγει σε λίγο μεγαλύτερο, αλλά και πάλι μικρότερο από εκείνον της μονοκαλλιέργειας. Οι διαφορές αυτές πιθανόν να καταδεικνύουν την ύπαρξη διαστελεχειακής αλληλεπίδρασης μεταξύ των στελεχών του παθογόνου (βλ 3.5.2b).

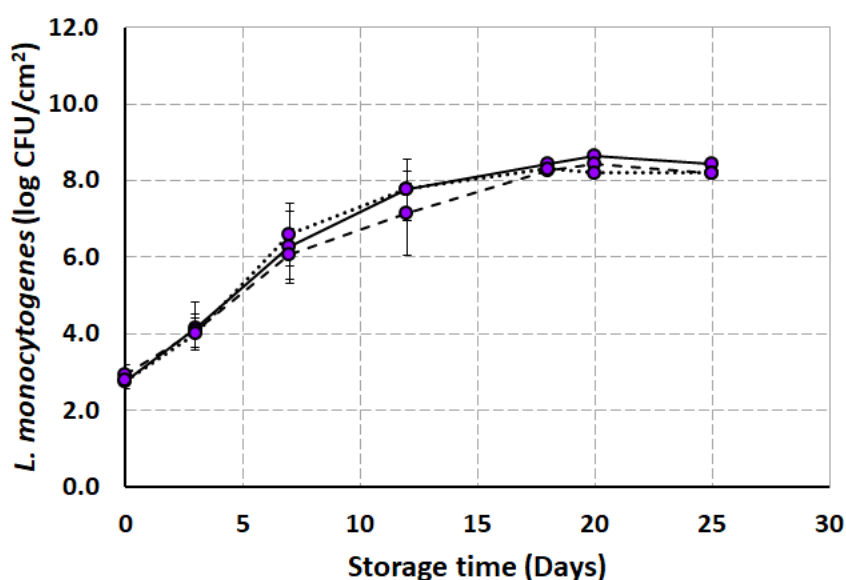
3.6. Ανάπτυξη του στελέχους PL25 του *L.monocytogenes* σε θρεπτικό μέσο με βάση το τυρί Ricotta

Παρακάτω, παρουσιάζονται με τη μορφή γραφημάτων οι σχέσεις μεταξύ του log CFU/cm² και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη του στελέχους PL25 κατά τη μονή καλλιέργεια (σημεία συνδεόμενα με συνεχή γραμμή) στα διάφορα υποστρώματα. Στα ίδια γραφήματα παρουσιάζονται και οι αντίστοιχες σχέσεις για τις συγκαλλιέργειες του PL25 με C5 (σημεία συνδεόμενα με γραμμή που αποτελείται από παύλες και τελείες) καθώς και με Scott A (σημεία συνδεόμενα με διακεκομμένη γραμμή).

3.6.1 Αερόβιες συνθήκες

3.6.1a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ δεν υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους PL25.

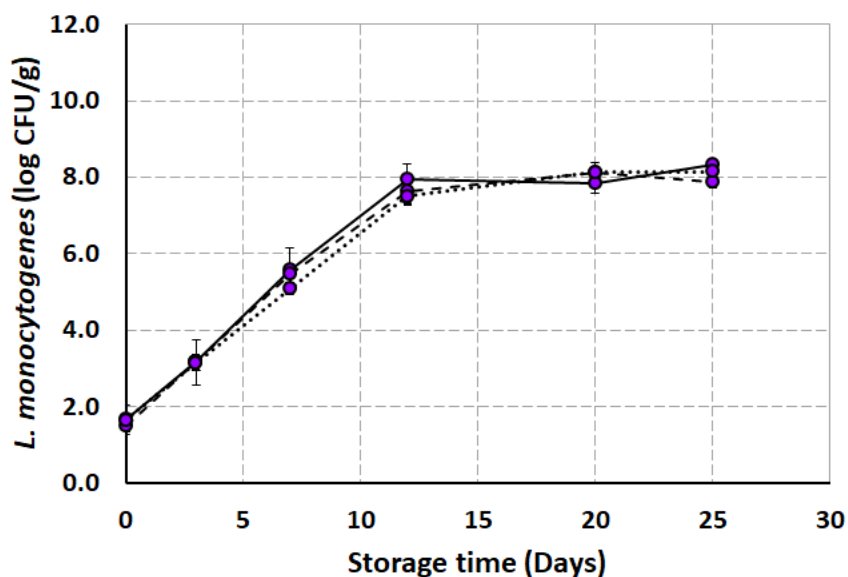
3.6.1b Αντίθετα σε στερεό με 1,4% άγαρ υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους PL25 και η σχέση μεταξύ του $\log \text{CFU}/\text{cm}^2$ και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες, παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.6.1.



Γράφημα 3.6.1: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους PL25 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και ScottA αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε στερεό υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 1,4% άγαρ σε τυρί Ricotta υπό αερόβιες συνθήκες.

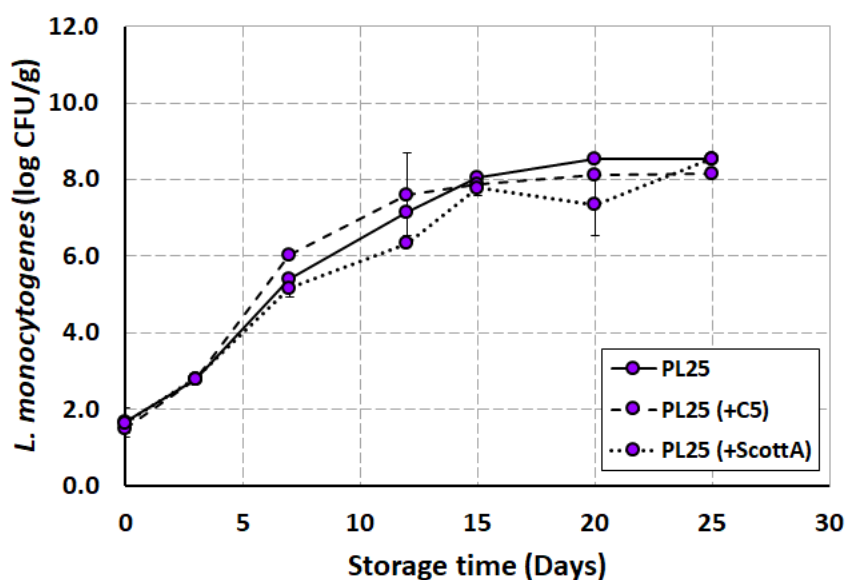
3.6.2 Υποξικές συνθήκες

3.6.2a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ **υπήρξε** ανάπτυξη του στελέχους PL25 κάτω από υποξικές συνθήκες και αυτή παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.6.2a



Γράφημα 3.6.2a: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους PL25 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και ScottA αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε ημιστερεό υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 0,6% άγαρ σε τυρί Ricotta κάτω από υποξικές συνθήκες

3.6.2b Σε στερεό με 1,4% άγαρ **υπήρξε** ανάπτυξη του στελέχους PL25 κάτω από υποξικές συνθήκες και αυτή παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.6.2b.



Γράφημα 3.6.2b: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους PL25 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και ScottA αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 1,4% άγαρ σε τυρί Ricotta κάτω από υποξικές συνθήκες.

Ανάπτυξη του στελέχους PL 25 σε ημιστερεό υπόστρωμα με άγαρ 0,6% και με βάση το τυρί Ricotta, δεν υπήρξε **κάτω από αερόβιες συνθήκες** (βλ 3.6.1a).

Αντίθετα, σε στερεό υπόστρωμα με 1,4% άγαρ και **κάτω από αερόβιες συνθήκες**, υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους PL 25 τόσο κατά τη μονοκαλλιέργειά του, όσο και κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη C5 και Scott A αντίστοιχα και η ανάπτυξη του μικροοργανισμού ήταν παρόμοια και στις τρεις περιπτώσεις καλλιέργειας του μικροοργανισμού (βλ 3.6.1b).

Σε ημιστερεό υπόστρωμα με άγαρ 0,6% και με βάση το τυρί Ricotta, κάτω από υποξικές συνθήκες υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους PL 25 τόσο κατά τη μονοκαλλιέργειά του όσο και κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη C5 και Scott A αντίστοιχα ακολουθώντας παρόμοια ανάπτυξη και στις τρεις περιπτώσεις καλλιέργειας κατά τις οποίες επετεύχθη τελικά το ίδιο μέγεθος πληθυσμού (βλ 3.6.2a).

Σε στερεό υπόστρωμα με άγαρ 1,4% και με βάση το τυρί Ricotta, **κάτω από υποξικές συνθήκες**, υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους PL 25 κατά τη μονοκαλλιέργειά του και κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη C5 και Scott A αντίστοιχα. Η ανάπτυξη κατά τη μονοκαλλιέργεια και κατά τη συγκαλλιέργεια με το στέλεχος C5 ήταν σχεδόν παρόμοια. Κατά τη συγκαλλιέργεια με το Scott A υπήρξαν κάποιες μικρές διαφοροποιήσεις από τους αντίστοιχους στη μονοκαλλιέργεια πληθυσμούς κατά την δωδέκατη και κατά την εικοστή μέρα συντήρησης, αλλά ο τελικός πληθυσμός ήταν παρόμοιος με εκείνον της μονοκαλλιέργειας (βλ 3.6.2b).

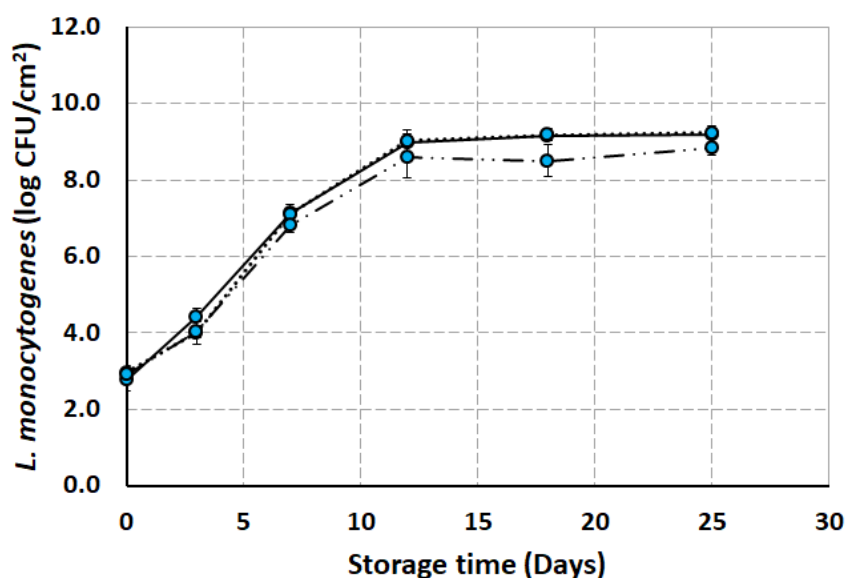
Παρακάτω, παρουσιάζονται με τη μορφή γραφημάτων οι σχέσεις μεταξύ του \log CFU/cm² και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη του στελέχους C5 κατά τη μονή καλλιέργεια (σημεία συνδεδόμενα με συνεχή γραμμή) στα διάφορα υποστρώματα. Στα ίδια γραφήματα παρουσιάζονται και οι αντίστοιχες σχέσεις για τις συγκαλλιέργειες του C5, με ScottA (σημεία συνδεδόμενα με διακεκομμένη γραμμή) καθώς και με PL25 (σημεία συνδεδόμενα με γραμμή που αποτελείται από παύλες και τελείες).

3.7 Ανάπτυξη του στελέχους C5 του *L.monocytogenes* σε θρεπτικό μέσο με βάση το τυρί Camembert

3.7.1 Αερόβιες συνθήκες

3.7.1a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ δεν υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους C5.

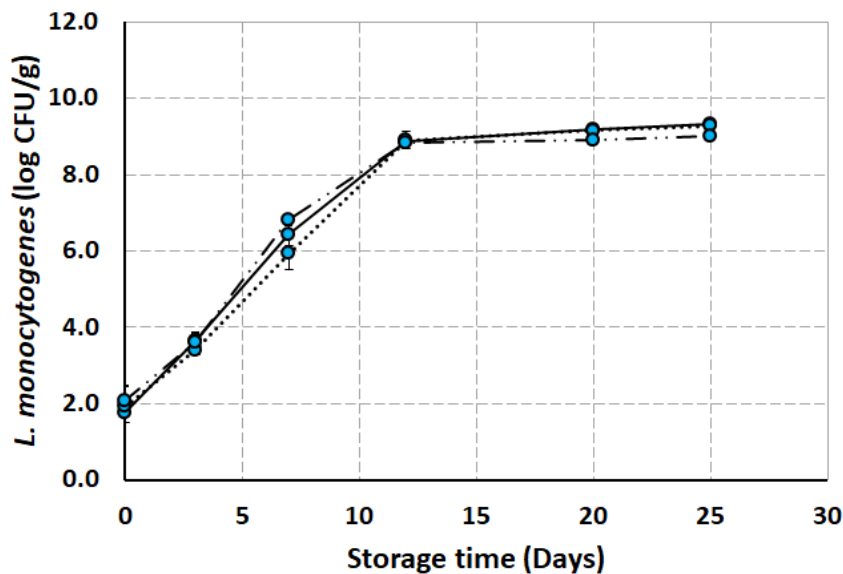
3.7.1b Αντίθετα σε στερεό με 1,4% άγαρ υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους C5 και η σχέση μεταξύ του log CFU/cm² και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες, παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.7.1.



Γράφημα 3.7.1: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους C5 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη ScottA και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 1,4% άγαρ, σε τυρί Camembert κάτω από αερόβιες συνθήκες.

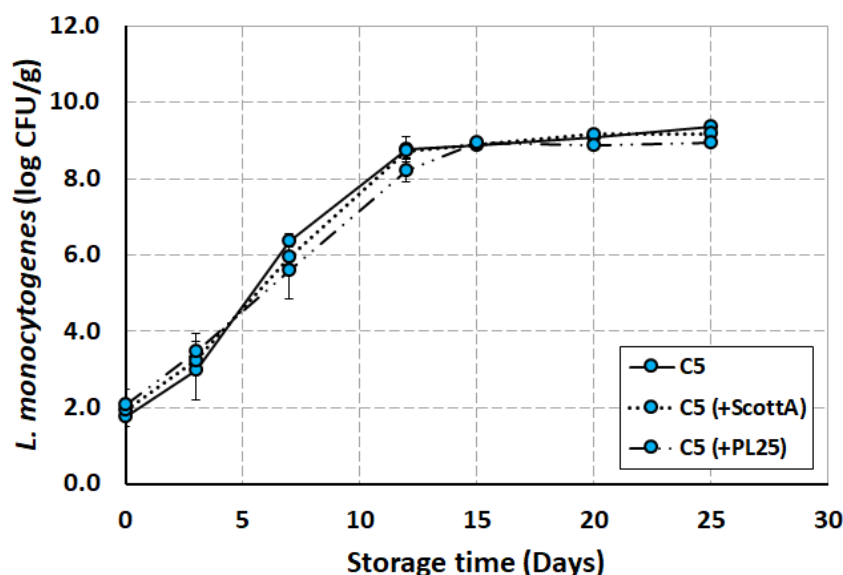
3.7.2 Υποξικές συνθήκες

3.7.2a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ **υπήρξε** ανάπτυξη του στελέχους C5 η οποία παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.7.2a



Γράφημα 3.7.2a: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους C5 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη ScottA και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 0,6% άγαρ, σε τυρί Camembert κάτω από υποξικές συνθήκες

3.7.2b Σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με 1,4% άγαρ υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους C5 η οποία παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.7.2b



Γράφημα 3.7.2b: : Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους C5 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη ScottA και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 1,4% άγαρ, σε τυρί Camembert κάτω από υποξικές συνθήκες.

Ανάπτυξη του στελέχους C5 σε ημιστερεό υπόστρωμα με άγαρ 0,6% και με βάση το τυρί Camembert δεν υπήρξε **κάτω από αερόβιες συνθήκες** ούτε κατά τη μονοκαλλιέργεια αλλά ούτε και κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη Scott A και PL25 αντίστοιχα (βλ 3.7.1a).

Αντίθετα σε στερεό υπόστρωμα με άγαρ 1,4% και με βάση το τυρί Camembert υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους C5 του μικροοργανισμού **κάτω από αερόβιες συνθήκες** (βλ 3.7.1b) τόσο κατά τη μονοκαλλιέργειά του όσο και με τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη Scott A και PL25 αντίστοιχα. Όπως φαίνεται και στο Γράφημα 3.7.1, η ανάπτυξη του πληθυσμού του C5 κατά τη μονοκαλλιέργεια ήταν παρόμοια με εκείνη κατά τη συγκαλλιέργεια με το στέλεχος Scott A, ενώ η ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά τη συγκαλλιέργεια με το PL25 ήταν ελάχιστα μικρότερη.

Οι αναπτύξεις του στελέχους C5 σε ημιστερεό υπόστρωμα με άγαρ 0,6% και με βάση το τυρί Camembert **κάτω από υποξικές συνθήκες** τόσο κατά τη μονοκαλλιέργεια του στελέχους όσο και κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη Scott A και PL25 αντίστοιχα ήταν σχεδόν παρόμοιες (βλ 3.7.2a). Παρόμοια μορφή είχαν και οι αναπτύξεις του C5 (μονοκαλλιέργεια και συγκαλλιέργειες με τα Scott A και PL25 αντίστοιχα) σε στερεό υπόστρωμα με άγαρ 1,4% με βάση το τυρί Camembert (βλ 3.7.2b).

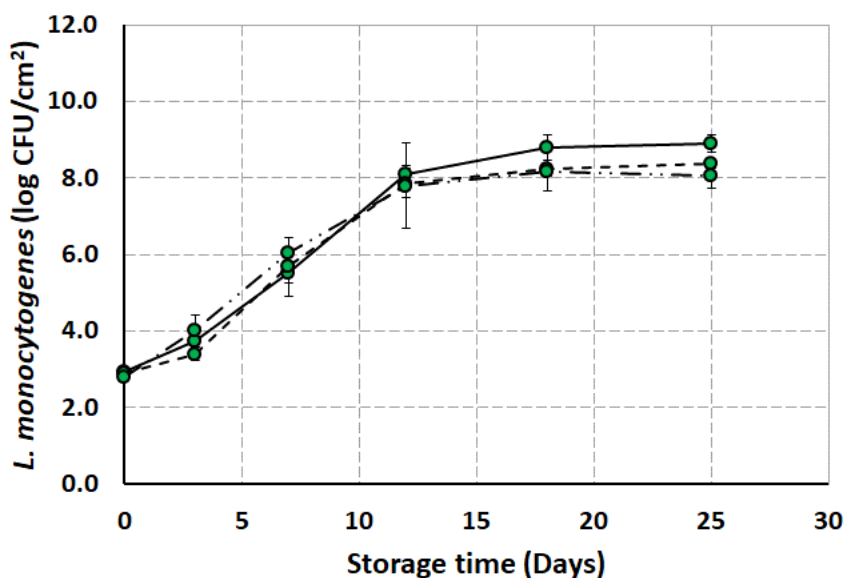
3.8 Ανάπτυξη του στελέχους ScottA του *L.monocytogenes* σε θρεπτικό μέσο με βάση το τυρί Camembert

Παρακάτω, παρουσιάζονται με τη μορφή γραφημάτων οι σχέσεις μεταξύ του \log CFU/cm² και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη του στελέχους ScottA κατά τη μονή καλλιέργεια (σημεία συνδεόμενα με συνεχή γραμμή) στα διάφορα υποστρώματα. Στα ίδια γραφήματα παρουσιάζονται και οι αντίστοιχες σχέσεις για τις συγκαλλιέργειες του ScottA με C5 (σημεία συνδεόμενα με γραμμή που αποτελείται από παύλες και τελείες) καθώς και με PL25 (σημεία συνδεόμενα με διακεκομμένη γραμμή).

3.8.1 Αερόβιες συνθήκες

3.8.1a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ δεν υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους ScottA .

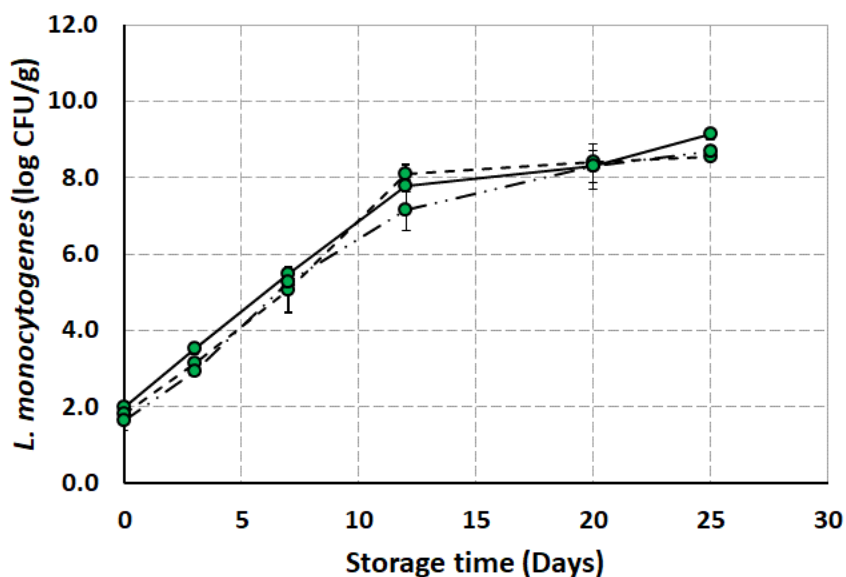
3.8.1b Αντίθετα σε στερεό με 1,4% άγαρ υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους ScottA και η σχέση μεταξύ του $\log \text{CFU}/\text{cm}^2$ και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες, παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.8.1.



Γράφημα 3.8.1: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους ScottA του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και PL25, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C σε υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 1,4% άγαρ, σε τυρί Camembert υπό αερόβιες συνθήκες.

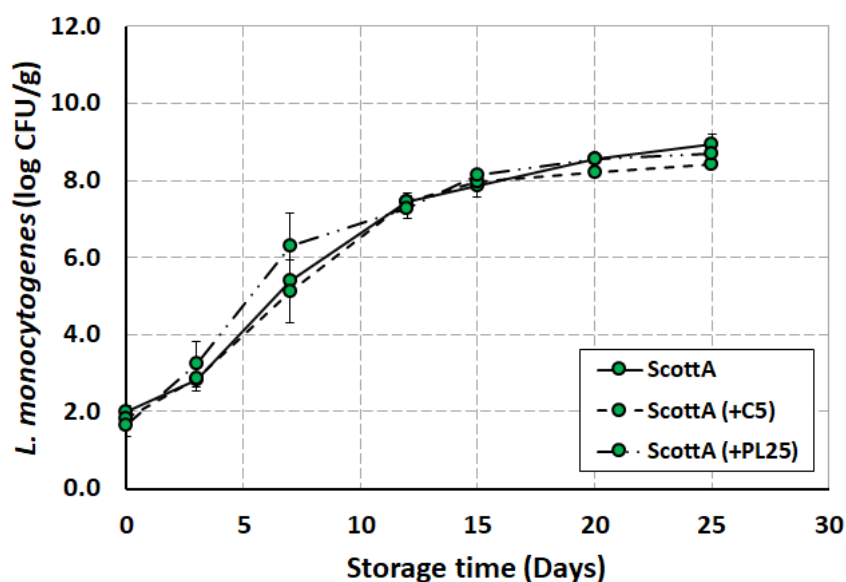
3.8.2 Υποξικές συνθήκες

3.8.2a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ **υπήρξε** ανάπτυξη του στελέχους ScottA κάτω από υποξικές συνθήκες και αυτή παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.8.2a



Γράφημα 3.8.2a: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους Scott A του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 0,6% άγαρ σε τυρί Camembert κάτω από υποξικές συνθήκες.

3.8.2b Σε στερεό με 1,4% άγαρ **υπήρξε** ανάπτυξη του στελέχους Scott A κάτω από υποξικές συνθήκες και αυτή παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.8.2b.



Γράφημα 3.8.2b: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους Scott A του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 1,4% άγαρ σε τυρί Ricotta κάτω από υποξικές συνθήκες.

Ανάπτυξη του στελέχους Scott A σε ημιστερεό υπόστρωμα με άγαρ 0,6% και με βάση το τυρί Camembert δεν υπήρξε **κάτω από αερόβιες συνθήκες** ούτε κατά τη μονοκαλλιέργεια αλλά ούτε και κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα (βλ 3.8.1a).

Σε στερεό όμως υπόστρωμα με άγαρ 1,4% και βάση το τυρί Camembert υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους Scott A **κάτω από αερόβιες συνθήκες** τόσο κατά την μονοκαλλιέργειά του όσο και κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα (βλ 3.8.1b). Όπως δείχνει το Γράφημα 3.8.1 η ανάπτυξη του πληθυσμού του Scott A κατά τη μονοκαλλιέργεια ήταν τελικά ελαφρά μεγαλύτερη από την ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα άλλα δύο στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα. Το γεγονός ότι οι συγκαλλιέργειες κατέληξαν τελικά σε μικρότερο πληθυσμό του παθογόνου πιθανά να υποδεικνύει κάποια μικρή διαστελεχειακή αλληλεπίδραση.

Η ανάπτυξη του στελέχους Scott A του παθογόνου κατά τη μονοκαλλιέργεια σε ημιστερεό υπόστρωμα με άγαρ 0,6% με βάση το τυρί Camembert **σε υποξικές συνθήκες** φαίνεται να είναι σχεδόν παρόμοια με την ανάπτυξη που έχει το στέλεχος αυτό κατά τη συγκαλλιέργειά του με τα στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα (βλ 3.8.2a). Ειδικότερα, οι αναπτύξεις κατά τις συγκαλλιέργειες αρχικά συμβαδίζουν με την ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά τη μονοκαλλιέργεια. Στη δωδέκατη μέρα συντήρησης η συγκαλλιέργεια του Scott A με το PL25 διαφοροποιείται από τη μονοκαλλιέργεια αναπτύσσοντας ελαφρά μικρότερο πληθυσμό αλλά κατόπιν καταλήγει σε παρόμοιο πληθυσμό με εκείνον της άλλης συγκαλλιέργειας ο οποίος είναι ελαφρά μικρότερος από τον τελικό πληθυσμό της μονοκαλλιέργειας.

Η ανάπτυξη του στελέχους Scott A κατά τη μονοκαλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα με άγαρ 1,4% και βάση το τυρί Camembert **σε υποξικές συνθήκες** συμβαδίζει με την συγκαλλιέργεια του στελέχους με το στέλεχος C5 μέχρι και το τέλος της συντήρησης. Η συγκαλλιέργεια με το PL25 παρουσιάζει μια έξαρση αρχικά στην έβδομη μέρα συντήρησης αλλά κατόπιν συμπίπτει με τους πληθυσμούς της άλλης συγκαλλιέργειας και της μονοκαλλιέργειας με αποτέλεσμα ο τελικός πληθυσμός να είναι σχεδόν ο ίδιος με αυτές (βλ 3.8.2b).

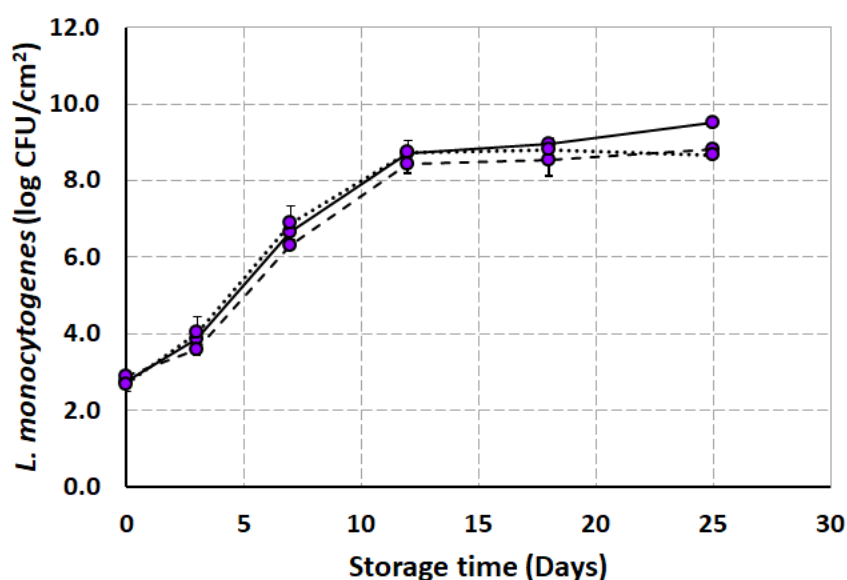
3.9. Ανάπτυξη του στελέχους PL25 του *L.monocytogenes* σε θρεπτικό μέσο με βάση το τυρί Camembert

Παρακάτω, παρουσιάζονται με τη μορφή γραφημάτων οι σχέσεις μεταξύ του log CFU/cm² και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη του στελέχους PL25 κατά τη μονή καλλιέργεια (σημεία συνδεόμενα με συνεχή γραμμή) στα διάφορα υποστρώματα. Στα ίδια γραφήματα παρουσιάζονται και οι αντίστοιχες σχέσεις για τις συγκαλλιέργειες του PL25 με C5 (σημεία συνδεόμενα με γραμμή που αποτελείται από παύλες και τελείες) καθώς και με Scott A (σημεία συνδεόμενα με διακεκομμένη γραμμή).

3.9.1 Αερόβιες συνθήκες

3.9.1a Σε ημιστερέο με 0,6% άγαρ δεν υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους PL25.

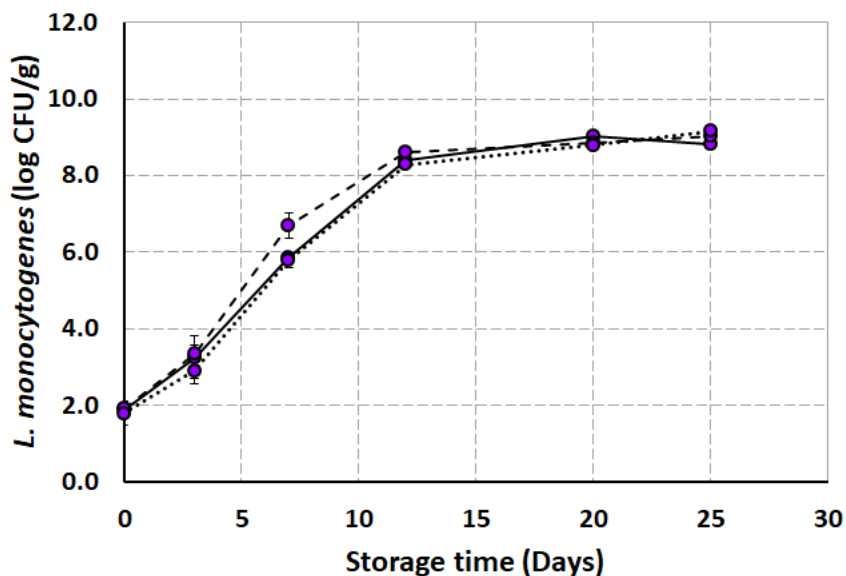
3.9.1b Αντίθετα σε στερέο με 1,4% άγαρ υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους PL25 και η σχέση μεταξύ του log CFU/cm² και του χρόνου αποθήκευσης σε ημέρες, παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.9.1.



Γράφημα 3.9.1: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους PL25 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και Scott A αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε στερεό υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 1,4% άγαρ σε τυρί Camembert υπό αερόβιες συνθήκες.

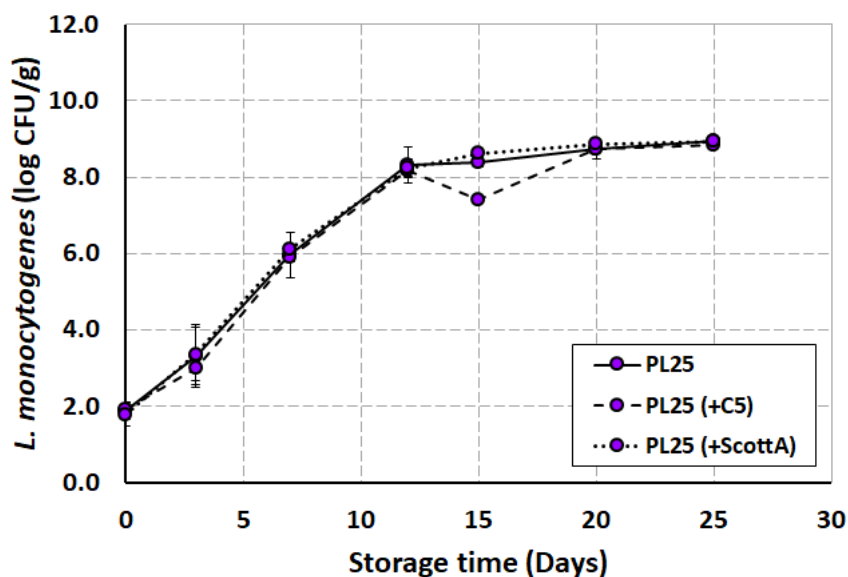
3.9.2 Υποξικές συνθήκες

3.9.2a Σε ημιστερεό με 0,6% άγαρ **υπήρξε** ανάπτυξη του στελέχους PL25 κάτω από υποξικές συνθήκες και αυτή παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.9.2a



Γράφημα 3.9.2a: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους PL25 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και Scott A αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε ημιστερεό υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 0,6% άγαρ σε τυρί Camembert κάτω από υποξικές συνθήκες.

3.9.2b Σε στερεό με 1,4% άγαρ **υπήρξε** ανάπτυξη του στελέχους PL25 κάτω από υποξικές συνθήκες και αυτή παρουσιάζεται στο Γράφημα 3.9.2b.



Γράφημα 3.9.2b: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους PL25 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και ScottA αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε υπόστρωμα τεχνητής μικροδομής με προσθήκη 1,4% άγαρ σε τυρί Camembert κάτω από υποξικές συνθήκες.

Ανάπτυξη του στελέχους PL 25 σε ημιστερεό υπόστρωμα με άγαρ 0,6% και με βάση το τυρί Camembert, δεν υπήρξε **κάτω από αερόβιες συνθήκες** (βλ 3.9.1a).

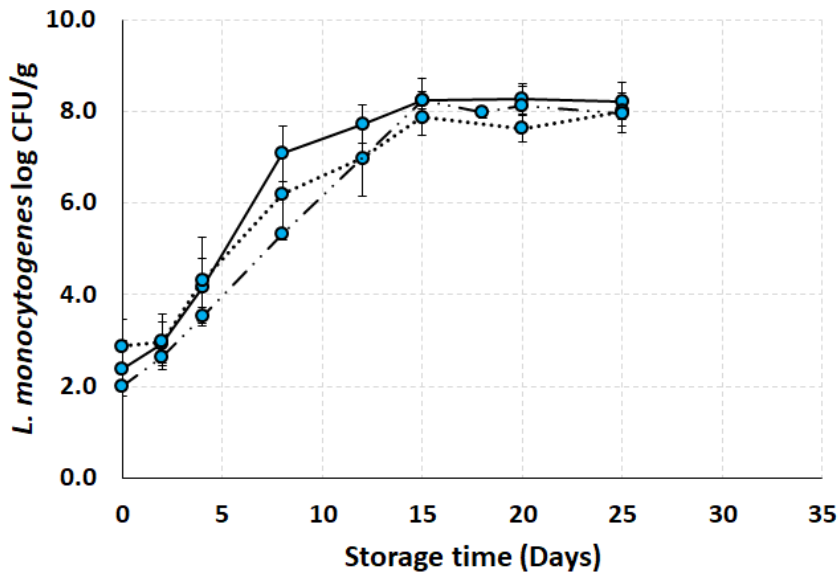
Αντίθετα, σε στερεό υπόστρωμα με 1,4% άγαρ και **κάτω από αερόβιες συνθήκες**, υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους PL 25 τόσο κατά τη μονοκαλλιέργειά του, όσο και κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη C5 και Scott A αντίστοιχα και η ανάπτυξη του μικροοργανισμού ήταν παρόμοια και στις τρεις περιπτώσεις καλλιέργειας του μικροοργανισμού μέχρι και τη 18^η μέρα συντήρησης. Κατόπιν, στις μεν συγκαλλιέργειες ο πληθυσμός παρέμεινε σταθερός ενώ στη μονοκαλλιέργεια ο τελικός πληθυσμός ήταν ελαφρά μεγαλύτερος (βλ 3.9.1b).

Σε ημιστερεό υπόστρωμα με άγαρ 0,6% και με βάση το τυρί Camembert, **κάτω από υποξικές συνθήκες** υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους PL 25 τόσο κατά τη μονοκαλλιέργειά του όσο και κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη C5 και Scott A αντίστοιχα ακολουθώντας παρόμοια ανάπτυξη και στις τρεις περιπτώσεις καλλιέργειας εκτός από μία μικρή διαφοροποίηση που είχε η συγκαλλιέργεια του PL 25 με το C5 στην 6^η μέρα. Τελικά όμως επετεύχθη το ίδιο μέγεθος πληθυσμού και στις τρεις περιπτώσεις καλλιέργειας (βλ 3.9.2a).

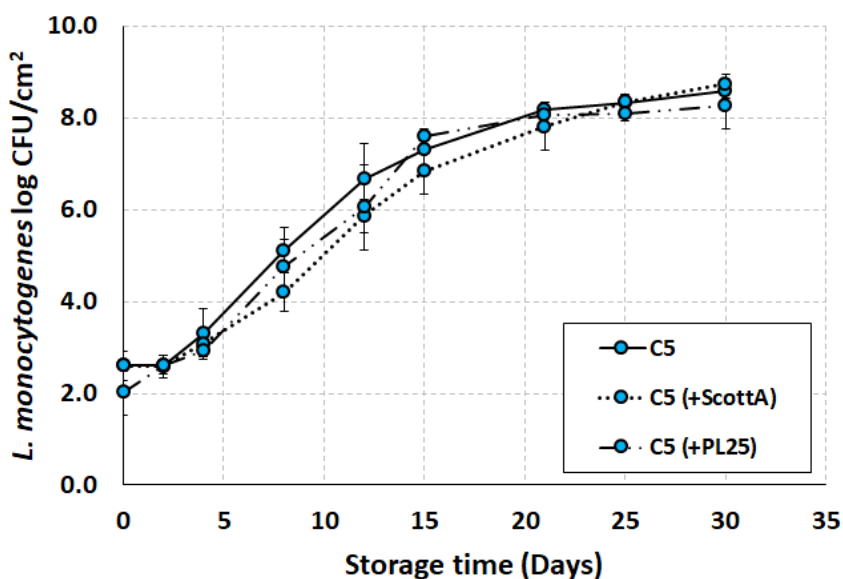
Σε στερεό υπόστρωμα με άγαρ 1,4% και με βάση το τυρί Camembert, **κάτω από υποξικές συνθήκες**, υπήρξε ανάπτυξη του στελέχους PL 25 κατά τη μονοκαλλιέργειά του και κατά τις συγκαλλιέργειές του με τα στελέχη C5 και Scott A αντίστοιχα. Η ανάπτυξη ήταν παρόμοια μέχρι και την 12^η μέρα κατά τη μονοκαλλιέργεια και κατά τις συγκαλλιέργειες με τα άλλα 2 στελέχη. Μετά τη 12^η μέρα η μονοκαλλιέργεια του PL25 και η συγκαλλιέργειά του με το Scott A ακολούθησαν ίδια πορεία φτάνοντας τελικά στον ίδιο πληθυσμό. Η συγκαλλιέργεια όμως με το C5 παρουσίασε λίγο μικρότερο πληθυσμό στη 15^η μέρα αλλά κατόπιν έφτασε και αυτή στον ίδιο πληθυσμό με τις άλλες 2 (βλ 3.9.2b).

3.10 Ανάπτυξη του στελέχους C5 του *L.monocytogenes* σε τυριά Ricotta και Camembert

Για να εκτιμηθεί η επίδραση που έχει η συγκαλλιέργεια δύο στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *L.monocytogenes* μελετήθηκε η ανάπτυξη κάθε στελέχους ξεχωριστά. Έτσι έγινε εμβολιασμός των τυριών Ricotta και Camembert με κάθε ένα από τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σαν μονοκαλλιέργειες αρχικά και κατόπιν σαν συγκαλλιέργειες με κάποιο άλλο στέλεχος. Στα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζεται η ανάπτυξη του στελέχους C5 στα τυριά Ricotta και Camembert ως μονοκαλλιέργεια (σημεία που συνδέονται με συνεχή γραμμή) καθώς και η ανάπτυξη του C5 ως συγκαλλιέργεια με το στέλεχος Scott A (σημεία συνδεόμενα με διακεκομμένη γραμμή) καθώς και ως συγκαλλιέργεια με το στέλεχος PL25 (σημεία συνδεόμενα με γραμμή που αποτελείται από παύλες και τελείες).



Γράφημα 3.10α: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους C5 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη ScottA και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε τυρί Ricotta.



Γράφημα 3.10β: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους C5 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη ScottA και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε τυρί Camembert.

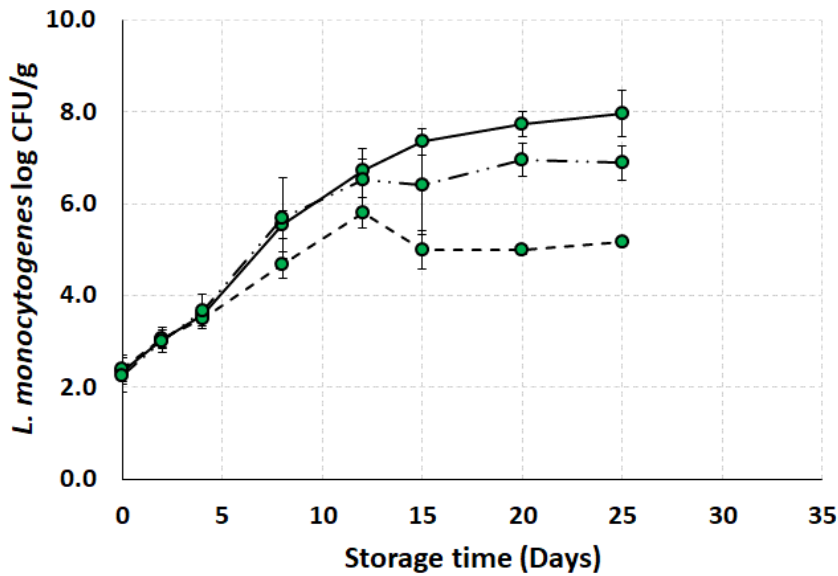
Ο εμβολιασμός με το στέλεχος C5 του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε τυρί **Ricotta** είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξή του τόσο κατά τη μονοκαλλιέργεια όσο και κατά τις συγκαλλιέργειες με τα στελέχη Scott A και PL25. Όπως καταδεικνύεται και στο Γράφημα 3.10α η ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατέληξε σε παρόμοιους

πληθυσμούς κατά τη συντήρηση μέχρι και την 25^η ημέρα τόσο κατά τη μονοκαλλιέργεια όσο και κατά τις συγκαλλιέργειες με μια μικρή διαφοροποίηση των συγκαλλιέργειών κατά την 8^η και 12^η μέρα όπου υπήρξε σχετικά μικρότερη ανάπτυξη πληθυσμών του παθογόνου μικροοργανισμού.

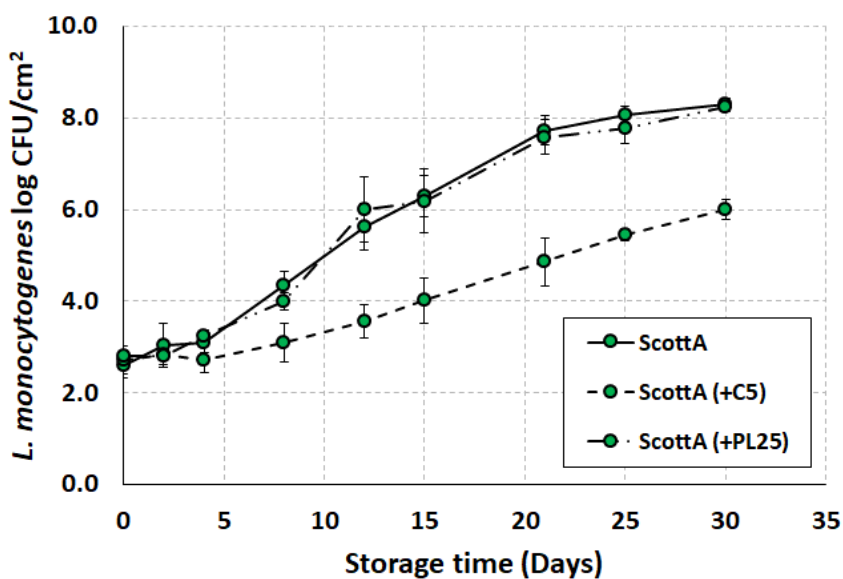
Ο εμβολιασμός με το στέλεχος C5 του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* σε τυρί **Camembert** είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξή του τόσο κατά τη μονοκαλλιέργεια όσο και κατά τις συγκαλλιέργειες με τα στελέχη Scott A και PL25. Όπως καταδεικνύεται και στο Γράφημα 3.10b η ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατέληξε σε παρόμοιους πληθυσμούς κατά τη συντήρηση μέχρι και την 25^η ημέρα τόσο κατά τη μονοκαλλιέργεια όσο και κατά τις συγκαλλιέργειες. Και πάλι υπήρξε διαφοροποίηση των συγκαλλιέργειών με μικρότερη ανάπτυξη πληθυσμών του παθογόνου μικροοργανισμού κατά την 8^η και 12^η ημέρα σε μικρότερο όμως βαθμό απ' ότι στο τυρί Ricotta.

3.11 Ανάπτυξη του στελέχους ScottA του *L.monocytogenes* σε τυριά Ricotta και Camembert

Στα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζεται η ανάπτυξη του στελέχους ScottA στα τυριά Ricotta και Camembert ως μονοκαλλιέργεια (σημεία που συνδέονται με συνεχή γραμμή) καθώς και η ανάπτυξη του ScottA ως συγκαλλιέργεια με το στέλεχος C5(σημεία συνδεόμενα με διακεκομμένη γραμμή) καθώς και ως συγκαλλιέργεια με το στέλεχος PL25 (σημεία συνδεόμενα με γραμμή που αποτελείται από παύλες και τελείες).



Γράφημα 3.11a: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους ScottA του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε τυρί Ricotta.



Γράφημα 3.11b: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους ScottA του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και PL25 αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε τυρί Camembert.

Ο εμβολιασμός με το στέλεχος Scott A του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* σε τυρί Ricotta είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξή του τόσο κατά τη μονοκαλλιέργεια όσο και κατά τις συγκαλλιέργειες με τα στελέχη C5 και PL25. Όπως καταδεικνύεται και στο Γράφημα 3.11a η ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατέληξε σε πολύ

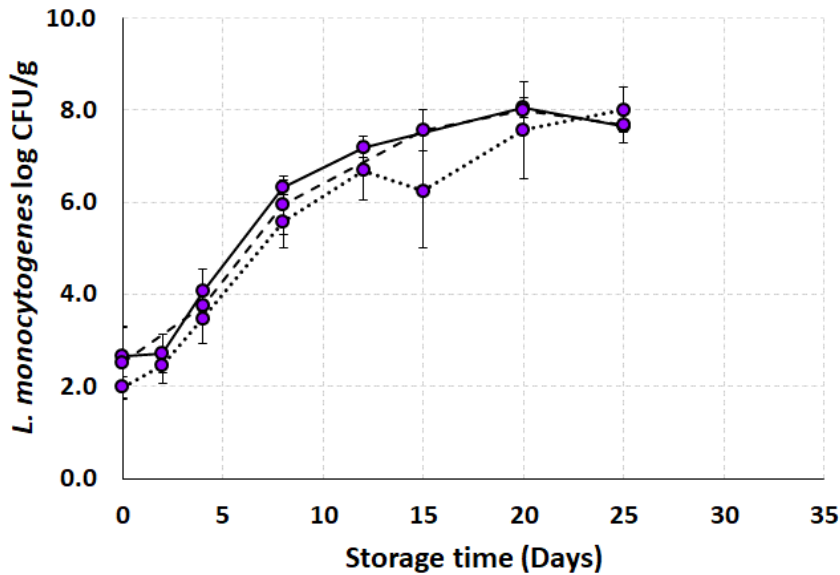
διαφορετικούς πληθυσμούς του μικροοργανισμού κατά τη συντήρηση μέχρι και την 25^η ημέρα. Η διαφοροποίηση των πληθυσμών που αναπτύχθηκαν κατά τις συγκαλλιέργειες για μεν τη συγκαλλιέργεια του Scott A με το C5 ξεκίνησε από την 4^η μέρα και μετά καταλήγοντας στο τέλος σε πολύ μικρότερο πληθυσμό από εκείνον της μονοκαλλιέργειας ενώ η διαφοροποίηση του πληθυσμού του μικροβίου για τη συγκαλλιέργεια του Scott A με το PL25 ξεκίνησε από τη 12^η ημέρα και μετά καταλήγοντας σε τελικό πληθυσμό μικροοργανισμού μικρότερο από εκείνον της μονοκαλλιέργειας αλλά μεγαλύτερο από εκείνον της συγκαλλιέργειας του Scott A με το C5. Εδώ βλέπουμε ότι υπάρχει σοβαρή διαφοροποίηση των τελικών πληθυσμών η οποία καταδεικνύει σημαντική διαστελεχειακή αλληλεπίδραση.

Ο εμβολιασμός με το στέλεχος Scott A του μικροοργανισμού ***L.monocytogenes*** σε τυρί **Camembert** είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη του τόσο κατά τη μονοκαλλιέργεια όσο και κατά τις συγκαλλιέργειες με τα στελέχη C5 και PL25. Όπως καταδεικνύεται και στο Γράφημα 3.11b η ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά τη μονοκαλλιέργεια του Scott A καθώς και κατά τη συγκαλλιέργειά του με το στέλεχος PL25 ήταν πανομοιότυπη, με αποτέλεσμα και στις δύο περιπτώσεις να καταλήξει στον ίδιο πληθυσμό του μικροοργανισμού την 25^η ημέρα. Η συγκαλλιέργεια του Scott A με το C5 έδωσε τελείως διαφορετική ανάπτυξη του μικροοργανισμού διαφοροποιούμενη από τις πρώτες μέρες συντήρησης και τελικά κατέληξε σε αισθητά μικρότερο πληθυσμό την 25^η ημέρα. Εδώ βλέπουμε να υπάρχει σοβαρή διαφοροποίηση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού κατά τη συγκαλλιέργεια Scott A με το C5 και της μονοκαλλιέργειας, καθώς και των τελικών πληθυσμών που αναπτύχθηκαν, γεγονός που καταδεικνύει και πάλι σημαντική διαστελεχειακή αλληλεπίδραση μεταξύ των συγκεκριμένων στελεχών του παθογόνου.

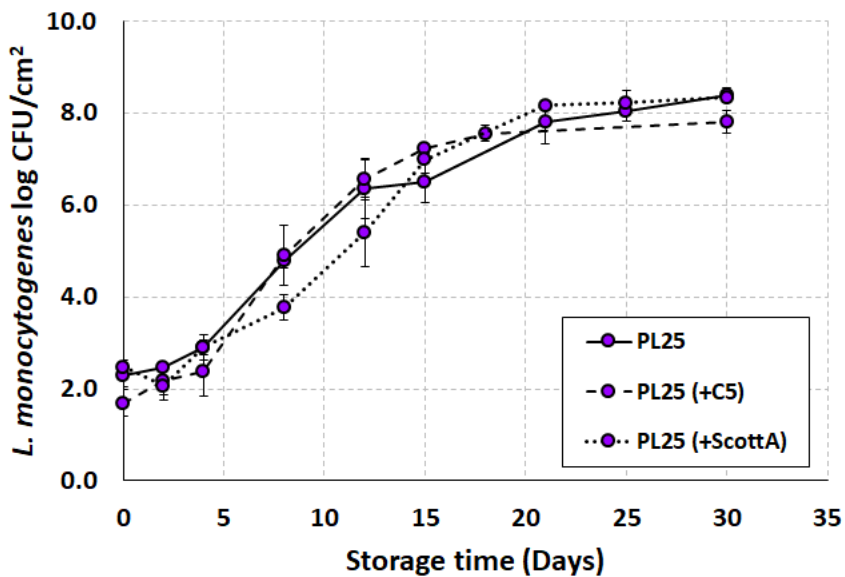
3.12 Ανάπτυξη του στελέχους PL25 του *L.monocytogenes* σε τυριά Ricotta και Camembert

Στα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζεται η ανάπτυξη του στελέχους PL25 στα τυριά Ricotta και Camembert ως μονοκαλλιέργεια (σημεία που συνδέονται με συνεχή γραμμή) καθώς και η ανάπτυξη του PL25 ως συγκαλλιέργεια με το στέλεχος

ScottA (σημεία συνδεδεμένα με διακεκομμένη γραμμή) καθώς και ως συγκαλλιέργεια με το στέλεχος C5(σημεία συνδεδεμένα με γραμμή που αποτελείται από παύλες και τελείες).



Γράφημα 3.12α: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους PL25 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και ScottA αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε τυρί Ricotta.



Γράφημα 3.12β: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του στελέχους PL25 του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά τη μονή και κατά την συγκαλλιέργεια με τα στελέχη C5 και ScottA αντίστοιχα, κατά τη συντήρησή του στους 7 °C πάνω σε τυρί Camembert.

Ο εμβολιασμός με το στέλεχος PL25 του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* σε τυρί **Ricotta** είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξή του τόσο κατά τη μονοκαλλιέργεια όσο και κατά τις συγκαλλιέργειες με τα στελέχη C5 και Scott A. Όπως καταδεικνύεται και στο Γράφημα 3.12a η ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατέληξε σε παρόμοιους πληθυσμούς κατά τη συντήρηση μέχρι και την 25^η ημέρα τόσο κατά την μονοκαλλιέργεια όσο και κατά τις συγκαλλιέργειες με μια μικρή διαφοροποίηση της συγκαλλιέργειας του PL25 με το Scott A κατά την 15^η ημέρα όπου υπήρξε σχετικά μικρότερη ανάπτυξη πληθυσμών του παθογόνου μικροοργανισμού. Ο τελικός όμως πληθυσμός ήταν σχεδόν ο ίδιος με εκείνους της μονοκαλλιέργειας και της συγκαλλιέργειας του PL25 με το C5.

Ο εμβολιασμός με το στέλεχος PL25 του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* σε τυρί **Camembert** είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξή του τόσο κατά τη μονοκαλλιέργεια όσο και κατά τις συγκαλλιέργειες με τα στελέχη C5 και Scott A. Όπως καταδεικνύεται και στο Γράφημα 3.12b η ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατέληξε σε παρόμοιους πληθυσμούς κατά τη συντήρηση μέχρι και την 30^η ημέρα τόσο κατά την μονοκαλλιέργεια όσο και κατά τη συγκαλλιέργεια με το Scott A, με την τελευταία να έχει μια μικρή διαφοροποίηση προς τα κάτω κατά την 8^η και 12^η μέρα συντήρησης. Η συγκαλλιέργεια του PL25 με το C5 ήταν πανομοιότυπη με τη μονοκαλλιέργεια κατέληξε όμως τελικά σε ελαφρά μικρότερο πληθυσμό του παθογόνου στην 30^η ημέρα συντήρησης.

4. Συμπεράσματα

Με δεδομένες τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ στελεχών του *Listeria monocytogenes* είναι δυνατόν κανείς να καταλήξει σε εσφαλμένες εκτιμήσεις όσον αφορά στις σχέσεις των στελεχών με την επικινδυνότητα που παρουσιάζουν.

Φαίνεται ότι η διαθεσιμότητα του οξυγόνου (που έχει σχέση με τις συνθήκες συσκευασίας) αποτελεί σημαντικό παράγοντα στη διαφοροποίηση της ανάπτυξης και στην επικράτηση ενός συγκεκριμένου στελέχους, ιδιαίτερα για το στέλεχος Scott A κάτω από υποξικές συνθήκες αλλά και κατά την επιμόλυνση του συγκεκριμένου στελέχους στα τυριά Ricotta και Camembert.

Τα στελέχη C5 και PL25 παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές όσον αφορά στον μέγιστο αριθμό αύξησής τους σε υποξικές συνθήκες σε υγρό υπόστρωμα απ' ότι σε αερόβιες. Παρόμοια συμπεριφορά είχε και το στέλεχος C5 σε στερεό υπόστρωμα.

5. Βιβλιογραφία

- Bremer P. J., Monk I., Osborne C. M. (2001). Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. *J. Food Prot.* 64: 1369–1376.
- Buchanan, & Klawitter. (1990). Effects of Temperature I, 55(6), 6–8.
- Buchanan, R. L., & Phillips, J. G. (1990). Response Surface Model for Predicting the Effects of Temperature pH, Sodium Chloride Content, Sodium Nitrite Concentration and Atmosphere on the Growth of *Listeria monocytogenes*, 53(5), 370–376.
- Buchanan R. L., Bagi L. K. (1999). Microbial competition: effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 16: 523–529.
- CAC, (2007). Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods. CAC-GL 61, 1–28.
- Cole, M. B. (1990). The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*, 6.
- Collins M. D., Wallbanks S., Lane D. J., Shah J., Nietupskin R., Smida J., Dorsch M., Stackebrandt E. (1991). Phylogenetic Analysis of the Genus *Listeria* Based on Reverse Transcriptase Sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 41, 2: 240–246.
- Cornu M., M. Kalmokoff, J-P Flandrois. (2002). Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology* 73, 261– 274.
- Dailey R.C., Martin Keely G., and Smiley R.D. (2014). The effects of competition from non-pathogenic foodborne bacteria during the selective enrichment of *Listeria monocytogenes* using buffered *Listeria* enrichment broth. *Food Microbiol.* December; 44: 173–179.
- Farber J. M., and Peterkin P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen, 55(3), 476–511.
- Giaouris E., Chorianopoulos N., Doulgeraki A., Nychas G.-J. (2013). Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride. *PLoS One.* 8: e77276.
- Gill, A. (1937). Ovine Bacterial Encephalitis (Circling Disease) and the Bacterial Genus *Listerella*.
- Gkerekou M. A., Athanaseli K. G., Kapetanakou A. E., Drosinos E. H., Skandamis P. N. (2021). Evaluation of oxygen availability on growth and inter-strain interactions of *L. monocytogenes* in/on liquid, semi-solid and solid laboratory media. *International Journal of Food Microbiology* 341, 109052.
- Goerges S., Aigner U., Silakowski B., Scherer S. (2006). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 313–318.

- Gorski, L., Flaherty, D., & Mandrell, R. E. (2006). Competitive Fitness of *Listeria monocytogenes* Serotype 1 / 2a and 4b Strains in Mixed Cultures with and without Food in the U . S . Food and Drug Administration Enrichment Protocol, 72(1), 776–783
- Gray M. L. and Killinger A. H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev.* 30 (2): 309-382.
- Harvey P.J.H. (1940). *Listeria* change of name for a genus of bacteria. *Nature.* 145 (3668): 264.
- Huang Y., Ye K., Yu K., Wang K., Zhou G. (2016). The potential influence of two *Enterococcus faecium* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 67: 18–24.
- Ikonomou, L., and D. Todorov. (1964). Studies of the viability of *Listeria monocytogenes* in ewe's milk and dairy products. *Vet. Med.* 1,7:23-29.
- Jaana R. Junttila, S.I. Niemelä, J. Hirn, (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria. *Journal of applied microbiology.* 65, 4: 321–327.
- Johnson, J. L., Doyle, M. P., Cassens, R. G., & Schoeni, J. L. (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* in Tissues of Experimentally Infected Cattle and in Hard Salami, 54(2), 497–501.
- Junttila J.R., Niemelä S.I. and Hirn J., (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65: 321 – 327.
- Jydegaard-Axelsen, A.-M., Høiby, P. E., Holmstrøm, K., Russell, N., & Knøchel, S. (2004). CO₂ - and Anaerobiosis-Induced Changes in Physiology and Gene Expression of Different *Listeria monocytogenes* Strains, 70(7), 4111–4117.
- Lovett J., (1989). Foodborne bacterial pathogens: *Listeria monocytogenes*. M.P. Doyle (Ed.), Marcel Dekker, Inc, New York. 290–291.
- Mellefont L. A., McMeekin T. A., Ross T. (2008). Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 157–68.
- Murray, E. G. D., Webb, R. A., & Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(4), 407–439.
- Parish, M. E., & Higgins, D. P. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in Low pH Model Broth Systems 1, 52(3), 144–147.
- Ramaswamy, V., Cresence, V. M., Rejitha, J. S., Lekshmi, M. U., Dharsana, K. S., Prasad, S. P., & Vijila, H. M. (2007). *Listeria* — review of epidemiology and pathogenesis, 4–13.
- Saraoui, T., Fall, P.A., Leroi, F., Antignac, J.-P., Chéreau, S., Pilet, M.F. (2016). Inhibition mechanism of *Listeria monocytogenes* by a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium*. *Food Microbiol.* 53, 70–78.

- Seeliger H.P.R., Höhne K. (1979). Chapter II Serotyping of *Listeria monocytogenes* and Related Species. *Methods in Microbiology*. 13: 31–49.
- Smith T. (2005). *Making Artisan Cheese: Fifty Fine Cheeses That You Can Make in Your Own Kitchen*. Published by Quarry Books, pp 177.
- Sorqvist, S. (1994). Heat resistance of different serovars of *Listeria monocytogenes*.
- Swaminathan, B., & Gerner-smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis *, 9, 1236–1243.
- Tienungoon S., Ratkowsky D. A., Meekin T. A. M. C., Ross T., & Icrobiol, A. P. P. L. E. N. M. (2000). Growth Limits of *Listeria monocytogenes* as a Function of Temperature, pH , NaCl, and Lactic Acid, 66(11), 4979–4987.
- Walker S.J. & Stringer M.F. (1987). Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures. Campden Food Preservation Research Association, Technical Memorandum, No. 462
- Walker S.J., Archer P., Banks J.G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*. 68, 2: 157–162
- Weller D., Andrus A., Wiedmann M., C. den Bakker H. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *Int J Syst Evol Microbiol*. 65: 286-292.
- Zilelidou E. A., Rychli K., Manthou E., & Ciolacu L. (2015). Highly Invasive *Listeria Monocytogenes* Strains Have Growth and Invasion Advantages in Strain Competition, 1–17.
- Zilelidou E., Karmiri C.V., Zoumpopoulou G., Mavrogonatou E., Kletsas D., Tsakalidou E., Papadimitriou K., Drosinos E., Skandamis P. (2016, a). *Listeria Monocytogenes* strains which are underrepresented during selective 2 enrichment with the ISO method might dominate during passage through 3 simulated gastric fluid and in vitro infection of Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol*.
- Zilelidou E., Manthou E., Skandamis P. (2016, b) Growth differences and competition between *Listeria monocytogenes* strains determine their predominance on ham slices and lead to bias during selective enrichment with the ISO protocol. *International Journal of Food Microbiology*. 235: 60-70.
- Καμινάριδης Σ. και Μοάτσου Γ. (2009) Γαλακτοκομία, Εκδόσεις Έμβρυο. Αθήνα, σελ. 245-255.
- Κανονισμός (ΕΚ) 2073/2005, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

The impact of oxygen availability, structure and nutrients of different substrates on growth and inter-strain interactions of *L. monocytogenes* strains

ORIGINALITY REPORT

14% SIMILARITY INDEX
13% INTERNET SOURCES
8% PUBLICATIONS
7% STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	dspace.aua.gr Internet Source	3%
2	hdl.handle.net Internet Source	1%
3	watermark.silverchair.com Internet Source	1%
4	ikee.lib.auth.gr Internet Source	1%
5	atrium.lib.uoguelph.ca Internet Source	<1%
6	m.riunet.upv.es Internet Source	<1%
7	pesquisa.bvsalud.org Internet Source	<1%
8	ir.lib.uth.gr Internet Source	<1%
	dx.doi.org	

9	Internet Source	<1%
10	fst.aua.gr Internet Source	<1%
11	Submitted to Georgetown University Student Paper	<1%
12	polynoelib.uniwa.gr Internet Source	<1%
13	nek.istanbul.edu.tr:4444 Internet Source	<1%
14	www.locus.ufv.br Internet Source	<1%
15	dehesa.unex.es Internet Source	<1%
16	doktori.bibl.u-szeged.hu Internet Source	<1%
17	d-nb.info Internet Source	<1%
18	www.didaktorika.gr Internet Source	<1%
19	mic.microbiologyresearch.org Internet Source	<1%
20	www.tdx.cat Internet Source	<1%