



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ:
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
Με κατεύθυνση
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΩΝ
ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Διπλωματική εργασία:

‘ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΙΟΥΜΕΝΙΟΥ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ
ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ LISTERIA MONOCYTOGENES
ΣΕ ΜΕΤΑΛΛΙΚΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ

ΒΙΤΟΥΛΑΔΙΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ ΒΙΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ, ΤΕΙ ΛΑΡΙΣΑΣ

Επιβλέπων καθηγητής:

ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΠΟΖΙΑΡΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2017

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ:
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

Με κατεύθυνση
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΩΝ
ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Διπλωματική εργασία:

‘ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΙΟΥΜΕΝΙΟΥ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ
ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ LISTERIAMONOCYTOGENES
ΣΕ ΜΕΤΑΛΛΙΚΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ’

ΒΙΤΟΥΛΑΔΙΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ ΒΙΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ, ΤΕΙ ΛΑΡΙΣΑΣ

Επιβλέπων καθηγητής:

ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΠΟΖΙΑΡΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2017

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

Ι. ΜΠΟΖΙΑΡΗΣ , Αναπληρωτής Καθηγητής

Υγιεινής και Συντήρησης Ιχθυρών ,Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΜΕΛΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Χ.ΧΑΤΖΗΧΡΙΣΤΟΔΟΛΟΥ, Καθηγητής

Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Ιατρικό Τμήμα Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ν.ΣΟΥΛΤΟΣ, Καθηγητής

Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως , Τμήμα Κτηνιατρικής ΑΠΘ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου προς τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας κ. Μποζιάρη Ιωάννη για τη καθοδήγησή του, τη συνεχή επίβλεψη καθώς και την άμεση και ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας για την παρούσα διπλωματική εργασία.

Επίσης είμαι ευγνώμων στα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς μου Επιτροπής κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου κ. Σούλτο Νικόλαο για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου και τις πολύτιμες υποδείξεις τους και την άριστη συνεργασία μας.

Τέλος, οφείλω τις ευχαριστίες μου για έναν ακόμη λόγο στον καθηγητή κ. Μποζιάρη Ιωάννη για τη δυνατότητα που μου έδωσε να διεκπεραιώσω το εργαστηριακό κομμάτι της διπλωματικής μου εργασίας στο Εργαστήριο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, καθώς και το προσωπικό του εργαστηρίου για την άρτια φιλοξενία και καθοδήγηση τους στο χώρο του εργαστηρίου καθώς και την πολύτιμη βοήθεια τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο : ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.1 <i>Listeria Monocytogenes</i>	3
1.2 Τροφιμογενείς.....	4
1.3 Βιουμένια	6
1.4 Μηχανισμοί προσκόλλησης κυττάρων σε επιφάνειες	7
1.5 Σκοπός.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	10
2.1 Πειραματική διαδικασία:.....	10
2.2 Μικροβιολογικά υλικά.....	11
2.2.1 TryptonSoyBroth (TSB) και TryptonSoyAgar (TSA).....	11
2.2.2 Palcam Agar.....	13
2.2.3 CFC Agar.....	11
2.2.4 Iron Agar.....	12
2.2.5 VRBGA.....	12
2.2.6 MRS.....	12
2.3 Παρασκευή ιχθυοζωμού.....	13
2.4 Ανανέωση καλλιέργειων.....	13
2.5 Διαδικασία προσκόλλησης κυττάρων.....	14
2.6 Ανάπτυξη βιουμενίου.....	14
2.7 Απαρίθμηση πληθυσμού βιουμενίου	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	17
3.1 Πείραμα 1 ^ο	17
3.2 Πείραμα 2 ^ο	18
3.3 Πείραμα 3 ^ο	19
3.3.1 Άυξηση <i>Listeria Monocytogenes</i>	19
3.3.2 Άυξηση <i>Pseudomonas</i>	20
3.3.3 Άυξηση Υδροθειοπαραγωγών Βακτηρίων.....	22
3.3.4 Άυξηση Enterobacteriaceae.....	23
3.3.5 Άυξηση Οξυγαλακτικών.....	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο : ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	29
Βιβλιογραφία	30

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της διατριβής ήταν η παρακολούθηση της ανάπτυξης βιοϋμενίου του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες προσομοιώνοντας το πραγματικό περιβάλλον που είναι οι επιφάνειες μιας μονάδας επεξεργασίας αλιευμάτων. Προκειμένου να επιτευχθεί ο σκοπός, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός από σάρκα τσιπούρας, ο οποίος παρασκευάστηκε στο εργαστήριο από τσιπούρες υδατοκαλλιέργειας και αποτέλεσε το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του βιοϋμενίου *L. monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες (κουπόνια) ανοξείδωτου χάλυβα τύπου AISI-304, διαστάσεων $3 \times 1.0 \times 0.1$ cm, που χρησιμοποιείται για κατασκευή εξοπλισμού που έρχεται σε επαφή με τα τρόφιμα. Η συνολική διάρκεια ανάπτυξης του βιοϋμενίου ήταν έξι ημέρες, σε θερμοκρασία 16°C, συνήθης μέση θερμοκρασία στις εγκαταστάσεις μεταποίησης αλιευτικών προϊόντων.

Πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα: (i) Αρχικά, μελετήθηκε η αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων βιοϋμενίου σε μεταλλικές επιφάνειες στους 16°C εμβαπτισμένες σε ιχθυοζωμό, από πλακτονικά κύτταρα *L. monocytogenes* που προήλθαν μετά από αύξηση σε υγρό εργαστηριακό υλικό TSB και σε ιχθυοζωμό. (ii) Στη συνέχεια, μελετήθηκε η αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων βιοϋμενίου σε μεταλλικές επιφάνειες στους 16°C εμβαπτισμένες σε ιχθυοζωμό, από κύτταρα *L. monocytogenes* που προήλθαν μετά από αύξηση σε ιχθυοζωμό (πλακτονικά κύτταρα) και κύτταρα που είχαν προέλθει μετά από απόξεση κυττάρων βιοϋμενίου (κύτταρα βιοϋμενίου) που είχε σχηματισθεί σε μεταλλικές επιφάνειες εμβαπτισμένες σε ιχθυοζωμό. Τέλος, (iii) μελετήθηκε η ανάπτυξη βιοϋμενίου *L. monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες στους 16°C εμβαπτισμένες σε μη-αποστειρωμένο ιχθυοζωμό από κύτταρα που είχαν προέλθει από αύξηση σε ιχθυοζωμό (πλακτονικά κύτταρα) και κύτταρα που είχαν προέλθει μετά από απόξεση κυττάρων βιοϋμενίου (κύτταρα βιοϋμενίου) που είχε σχηματισθεί σε μεταλλικές επιφάνειες εμβαπτισμένες σε ιχθυοζωμό. Ταυτόχρονα μελετήθηκε και η ανάπτυξη πληθυσμού βιοϋμενίου των αλλοιογόνων μικροοργανισμών του μη-αποστειρωμένου ιχθυοζωμού όπως *Pseudomonas*, υδροθειοπαραγωγών βακτηρίων, Enterobacteriaceae και οξυγαλακτικών βακτηρίων, απουσία *L. monocytogenes*, και παρουσία πλακτονικών κυττάρων και κυττάρων βιοϋμενίου *L. monocytogenes*.

Στα πειράματα με τον αποστειρωμένο ιχθυοζωμό, τα πλακτονικά κύτταρα *L. monocytogenes* που είχαν προέλθει από ιχθυοζωμό προσκολλήθηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό, ενώ και η αύξησή τους ήταν ταχύτερη σε σχέση με αυτά που προήλθαν από το TSB. Τα κύτταρα *L. monocytogenes* που είχαν προέλθει από κύτταρα βιοϋμενίου προσκολλήθηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό, από αυτά που είχαν προέλθει μετά από υγρή καλλιέργεια (πλακτονικά), ωστόσο οι τελικοί πληθυσμοί του βιοϋμενίου δεν διέφεραν στατιστικά. Με παρουσία μικροοργανισμών (περίπτωση μη-αποστειρωμένου ιχθυοζωμού), ο βαθμός προσκόλλησης της *L. monocytogenes* ήταν πολύ χαμηλότερος σε σχέση με την περίπτωση απουσίας άλλων μικροοργανισμών (περίπτωση αποστειρωμένου ιχθυοζωμού), ωστόσο η προσκόλληση και η περαιτέρω αύξηση βιοϋμενίου *L. monocytogenes* δεν διέφερε από το αν τα κύτταρα προέρχονταν από υγρή καλλιέργεια (πλακτονικά κύτταρα) ή από βιοϋμένιο. Τέλος η παρουσία ή όχι *L. monocytogenes* επηρέασε την προσκόλληση και την αύξηση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών (περίπτωση μη-αποστειρωμένου ιχθυοζωμού). Κάποιοι μικροοργανισμοί (*Pseudomonas*, οξυγαλακτικά) ευνοήθηκαν της απουσίας ενώ άλλοι (Enterobacteriaceae), ευνοήθηκαν της παρουσίας *L. monocytogenes*.

Abstract

The aim of this thesis was to monitor the biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on metallic surfaces, simulating the real conditions of a seafood processing plant. For this reason, fish juice (FJ) was used, instead of laboratory broth, for the formation of *Listeria monocytogenes* biofilm on stainless steel coupons AISI-304, with dimensions $3 \times 1.0 \times 0.1$ cm. The biofilm formation was studied for 6 days at 16°C, which is the average temperature at a seafood processing plant.

Three experiments were carried out: (i) The monitoring of biofilm formation on metallic surfaces immersed in sterile FJ for 6 days at 16°C, using *Listeria monocytogenes* cells which had grown initially in FJ and TSB (ii) The monitoring of biofilm formation on metallic surfaces immersed in sterile FJ for 6 days at 16°C, using *Listeria monocytogenes* cells which had grown initially in FJ (planktonic cells) and on metallic surfaces immersed in sterile FJ (biofilm cells), and finally (iii) the formation of mixed biofilm on metallic surfaces immersed in non-sterile FJ for 6 days at 16°C, using *Listeria monocytogenes* cells which had grown initially in FJ (planktonic cells) and on metallic surfaces immersed in sterile FJ (biofilm cells), was studied. At the same time the attachment and growth of spoilage microorganisms of non-sterile FJ, such as *Pseudomonas*, H₂S producing bacteria, Enterobacteriaceae and Lactic Acid bacteria (LAB), in absence and presence of planktonic and biofilm cells of *L. monocytogenes*, was also monitored.

L. monocytogenes planktonic cells that grew in fish juice were attached in higher numbers on coupons compared to those grew in TSB, while their growth on coupons surface was also higher. *L. monocytogenes* cells that came from biofilm were attached in higher numbers on coupons compared to those came from planktonic culture in FJ, however, their final populations in biofilm formed on coupons were not differ significantly. In the presence of other microorganisms (case of non-sterile FJ) *L. monocytogenes* attachment on coupons was lower compared to the absence of competitive microbiota (case of sterile FJ), however both attachment and subsequent biofilm growth was not different for *L. monocytogenes* cells that came from planktonic or biofilm cultures. Finally, presence or absence of *L. monocytogenes* affected the attachment and growth of spoilage microorganisms (case of non-sterile FJ). Some microorganisms (*Pseudomonas* and LAB) were promoted and other (Enterobacteriaceae) were not in presence of *L. monocytogenes*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* είναι ένα Gram+ βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο, μη σπορογόνο, με ραβδοειδή μορφή (βάκιλος), κινητό (με τη βοήθεια μαστιγίων). Το γένος *Listeria* αποτελείται από επτά είδη (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. murrayi*, *L. grayi*), από τα οποία μόνο η *L. monocytogenes* προκαλεί τροφικές δηλητηριάσεις στον άνθρωπο. Η *L. monocytogenes* αναπτύσσεται και επιβιώνει σε ένα μεγάλο εύρος ακραίων περιβαλλόντων, τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλές θερμοκρασίες (θερμοκρασίες ψυγείου), υψηλές οσμωτικές συνθήκες (10 – 11 % NaCl) και τιμές pH από 4 ως 9, συνθήκες οι οποίες αναστέλλουν την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων (Chae & Schraft 2001; Hanna & Wang 2007; Hansen & Vogel 2011). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του κυμαίνεται σε 30°C με 37°C, σε αντίθεση με πολλά άλλα μεσόφιλα βακτήρια, μπορεί να αναπτυχθεί ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες από -4 ως 10°C (ψυχρότροφος) (Lorber 2007). Γενικά το θερμοκρασιακό εύρος ανάπτυξής του, κυμαίνεται από -4 ως 45°C (Hanna & Wang 2007) και είναι αρκετά ανθεκτικό στις επιβλαβείς επιπτώσεις της κατάψυξης, της ξήρανσης και της παστερίωσης. Οι θερμοκρασίες ψύξης δεν αναστέλλουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού ο οποίος είναι ικανός να διπλασιάζεται κάθε 1,5 ημέρα, στους 4°C. Θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 77°C απενεργοποιούν τη δράση του μικροοργανισμού, συνεπώς η επιμόλυνση των τροφίμων απ' το περιβάλλον, μετά το στάδιο παραγωγής τους αποτελεί κρίσιμο σημείο ελέγχου.

Έχει αποδειχτεί ο πιο ανθεκτικός μικροοργανισμός όταν υποβάλλεται σε ακτινοβολία, συγκρινόμενη με άλλους βλαστικούς παθογόνους μικροοργανισμούς των τροφίμων. Αποτελεί απειλή για τη βιομηχανία τροφίμων λόγω της ικανότητας της να αναπτύσσεται σε συνθήκες ψύξης και να επιβιώνει σε θερμοκρασίες παστερίωσης (72 °C για 15sec). Η *L. monocytogenes* είναι ανθεκτική σε διαλύματα άλατος και έχει αποδειχτεί πως επιβιώνει σε συγκεντρώσεις άλατος ως και 30,5% για 100 ημέρες, στους 4°C. Οι απαιτήσεις της *L. monocytogenes* σε θρεπτικά συστατικά, είναι οι τυπικές των Gram-θετικών βακτηρίων. Η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* αναστέλλεται κυρίως από την παρουσία οξυγαλακτικών βακτηρίων, επειδή αυτά

παράγουν βακτηριοσίνες οι οποίες μπορούν να την αδρανοποιήσουν (Χατζηδάκη 2015).

Το βακτήριο *L. monocytogenes* μπορεί να απομονωθεί από διάφορα περιβάλλοντα. Έχει απομονωθεί από πολλά προϊόντα περιλαμβανομένων λαχανικών, γάλατος, τυριών, ψαριών και κρεατικών, καθώς και έτοιμων φαγητών προς κατανάλωση (Norwood & Gilmour 1999). Επίσης, από επιφανειακά νερά, από το έδαφος, από ζωοτροφές που βρίσκονται σε αποθήκες φύλαξης, από φυτά σε αποσύνθεση και από κόπρανα θηλαστικών, (Huss *et al.* 2000; Lorber 2007; Belessi *et al.* 2011; Jeong & Frank 1994). Όταν περάσει στον οργανισμό των ανθρώπων και των ζώων μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ασθένειες (Orsi *et al.* 2011). Μέχρι τη δεκαετία του '80 η επίδρασή του στον ανθρώπινο οργανισμό ήταν αβέβαιη. Έπειτα από διάφορα επεισόδια λιστερίωσης στη Βόρεια Αμερική, οι μελέτες έδειξαν ότι τα αίτια οφείλονταν στην επομόλυνση των τροφίμων. Μετά την απομόνωση και τη μελέτη της *L. monocytogenes* από κλινικές και τροφικές πηγές, διαπιστώθηκε ότι έχει την ικανότητα να αποικίζει τις επιφάνειες σε μονάδες επεξεργασίας τροφίμων με επακόλουθη επιμόλυνση των τροφίμων προς κατανάλωση (Harvey *et al.* 2007).

1. 2. ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΕΙΣ ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ

Η λιστερίωση στους ανθρώπους τυπικά συμβαίνει από την κατάποση της *L. monocytogenes* από τα τρόφιμα. Υπάρχουν όμως και άλλοι τρόποι, όπως ο κατακόρυφος (από τη μητέρα στο παιδί), ο ζωο-νοσογόνος (από την επαφή των ζώων με τον άνθρωπο), και ο νοσοκομειακός (Low and Donachie 1997; Churchill *et al.* 2006; Lorber 2007). Η ικανότητα της *L. monocytogenes* να προκαλεί προβλήματα στην υγεία των ανθρώπων, έγκειται στην παραγωγή της λιστεριολισίνης, ενός ενζύμου που προκαλεί λύση των κυττάρων του αίματος. Η ακριβής μολυσματική δόση είναι άγνωστη και ποικίλει για τις διάφορες κατηγορίες ανθρώπων. Συνεπώς η πιθανότητα να νοσήσει κάποιος, εξαρτάται από τη λοιμογόνο δύναμη του παθογόνου, των αριθμό των κυττάρων κατά την κατάποση, την υγεία του ανθρώπου (FAO 2004). Η ανάμειξη της *L. monocytogenes* σε τροφικές δηλητηριάσεις υστερεί σε σχέση με αυτές που προκαλούνται από τα είδη της *Salmonella*, *Campylobacter* κ.α. τα οποία παραμένουν μόνιμοι κίνδυνοι στην ασφάλεια τροφίμων, ωστόσο η *L. monocytogenes* αποτελεί έναν ιδιαίτερο μικροοργανισμό για έρευνα, εξ' αιτίας του υψηλού ρυθμού θνησιμότητας που προκαλεί, ο οποίος έχει εύρος από 20 έως 35% (Agle 2007). Στις περισσότερες

περιπτώσεις τα συμπτώματα της νόσου προσομοιάζουν με εκείνα της ελαφριάς γαστρεντερίτιδας ή της γρίπης (febrile gastroenteritis). Ωστόσο, σε ανθρώπους που ανήκουν σε πληθυσμιακές ομάδες υψηλού κινδύνου, η νόσος εξελίσσεται συνήθως στη σοβαρότερη μορφή της (invasive disease, listeriosis) που χαρακτηρίζεται από σηψαιμία, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, αποβολές και θνητότητα περίπου 30%. Ευπαθείς πληθυσμιακές ομάδες αποτελούν οι ηλικιωμένοι, τα βρέφη, οι έγκυες καθώς και άτομα με ανοσοκαταστολή παθολογικής ή ιατρογενούς αιτιολογίας, όπως διαβητικοί, ασθενείς με AIDS, ασθενείς που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία κ.α.

Εκτεταμένες φυλογενετικές έρευνες δείχνουν ότι η *L. monocytogenes* αποτελείται από τέσσερις αποκλίνουσες φυλογενετικές «καταγωγές» (divergent phylogenetic lineages I-IV) . Τα περισσότερα από τα στελέχη που απομονώνονται από κλινικά περιστατικά στον άνθρωπο ανήκουν στις «καταγωγές» I και II. Η *L. monocytogenes* έχει προκαλέσει τροφιμογενείς επιδημίες μέσω πληθώρας διαφορετικών τροφίμων όπως παστεριωμένο γάλα, τυριά, κρεατοσκευάσματα, βούτυρο, τουρσί λάχανο, καπνιστό σολομό, έτοιμες σαλάτες, κανταλούπες κ.α. Η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα τα οποία είναι επιρρεπή στην μόλυνση με *L. monocytogenes*, περιλαμβάνουν το ακατέργαστο γάλα, το ανεπαρκώς παστεριωμένο γάλα, τα μαλακά και τα ωριμασμένα τυριά, το παγωτό και το βούτυρο.

Η επιμόλυνση του κρέατος προέρχεται απ' το περιβάλλον και μπορεί να προκύψει σε όλα τα στάδια της επεξεργασίας ή της διάθεσης του στο εμπόριο. Πηγές μόλυνσης μπορούν ν' αποτελέσουν τα σφαγεία και οι θάλαμοι ψύξης, τα χέρια των εργαζομένων και ο μηχανολογικός εξοπλισμός. Τα επιρρεπή τρόφιμα αυτής της κατηγορίας περιλαμβάνουν όλους τους τύπους ακατέργαστου κρέατος, τα ζυμωμένα αλλαντικά, τα ακατέργαστα και τα μαγειρεμένα πουλερικά.

Η δυνατότητα της *L. monocytogenes* να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες ψύξης, έτσι έχει απομονωθεί από ψάρια και θαλασσινά. Ο μικροοργανισμός μπορεί να βρεθεί διάσπαρτος στα εργοστάσια επεξεργασίας ιχθυηρών και συγκεκριμένα στο στάδιο 'καπνίσματος' του προϊόντος (π.χ. παραγωγή καπνιστού σολομού) καθώς επίσης και στα ακατέργαστα ψάρια (π.χ. επεξεργασία ωμών γαρίδων). Η *L. monocytogenes* απαντάται συχνά σε τροφές των delicatessen και των μπουφέ, λόγω της ικανότητας της να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες ψύξης.

Λόγω της σύγχρονης μαζικής παραγωγής και ευρείας διακίνησης τροφίμων, οι τροφιμογενείς επιδημίες μπορούν να επηρεάσουν εκατοντάδες ή χιλιάδες καταναλωτές,

για παράδειγμα η επιδημία λιστερίωσης από κατανάλωση μαλακού τυριού στις ΗΠΑ. Μέχρι τις 25 Οκτωβρίου 2012 συνολικά 22 άνθρωποι προσβλήθηκαν σε 13 πολιτείες των ΗΠΑ (<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-09-12/index.html>).

Οι κανόνες υγιεινής στην παραγωγή τροφίμων ολοένα και βελτιώνονται, όμως έχει διαπιστωθεί ότι ακόμα και αν λαμβάνονται αυστηρά μέτρα υγιεινής και τρόποι απολύμανσης προκειμένου να μειωθεί η *Listeria* στο ελάχιστο, κάποια στελέχη με ιδιαίτερη αντοχή παραμένουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα, στον εξοπλισμό και τους χώρους που χρησιμοποιούνται στην παραγωγική διαδικασία (Chae & Schraft 2000). Εκτιμάται ότι η δημιουργία βιοϋμενίου από τη *L. monocytogenes* σε επιφάνειες ίσως είναι ένας σημαντικός λόγος για την επιβίωση των στελεχών (Harvey *et al.* 2007).

1.3 ΒΙΟΪΜΕΝΙΑ

Ένα βιοϋμένιο θεωρείται μια κοινότητα μικροβίων αποτελούμενη από κύτταρα, τα οποία, προσκολλώνται σε ένα υπόστρωμα ή το ένα στο άλλο και με το ξέπλυμα δεν μπορούν να απομακρυνθούν. Αυτά τα κύτταρα είναι ενσωματωμένα σε ένα εξωκυτταρικό πολυμερικό στρώμα. Τα κύτταρα στο βιοϋμένιο παρουσιάζουν διαφορετικού είδους ανάπτυξη καιγονιδιακή αντιγραφή σε σύγκριση με τα μεμονωμένα κύτταρα (Agle 2007; Lourenco *et al.* 2011). Το βιοϋμένιο μπορεί να σχηματιστεί υπό κατάλληλες συνθήκες, από κάθε είδους μικροοργανισμό, περιλαμβανομένων αλλοιωγόνων και παθογόνων.

Τα βιοϋμένια μπορούν να σχηματιστούν σε κάθε είδους επιφάνεια στα περισσότερα οικοσυστήματα όπου τα θρεπτικά συστατικά είναι άφθονα. Έχουν βρεθεί οπουδήποτε όπως στη φύση, σε βιομηχανίες, σε αστικές περιοχές. Στη βιομηχανία τροφίμων η δημιουργία βιοϋμενίου μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη μεταφορά θερμότητας, αυξημένη αντίσταση στη ροή και σε επιμόλυνση των τροφίμων (Agle 2007). Αυτό που τους επιτρέπει να σχηματίζονται και να εγκαθίστανται σε διάφορα περιβάλλοντα κάνοντάς τα ανθεκτικά σε συνθήκες στρες (νερό, θρεπτικά συστατικά) αλλά και στα ποικίλα απολυμαντικά και βιοκτόνα, είναι η δημιουργία της εξωκυτταρικής πολυσακχαριδικής μεμβράνης (Kives 2006).

Αρχικά προσκολλώνται τα μεμονωμένα κύτταρα σε κάποια επιφάνεια, δημιουργείται μια αποικία η οποία με το πέρασμα το χρόνου ωριμάζει και έπειτα κάποια κύτταρα μπορούν να αποκολληθούν και να αποτελέσουν τη βάση για το σχηματισμό ενός νέου βιοϋμενίου. Τα βιοϋμένια δεν είναι ομογενή αποτελούμενα από μία στρώση κυττάρων. Είναι ετερογενή και αποτελούνται από μικροκοινωνίες. Αποτελούνται κατά

15% από κύτταρα και κατά 85% από ένα στρώμα πολυμερούς. Τα κύτταρα εσωκλείονται μέσα στο στρώμα πολυμερούς και δημιουργούν διάφορους σχηματισμούς. Στα κενά που υπάρχουν μεταξύ των σχηματισμών, ουσίες, όπως θρεπτικά συστατικά και διαλυμένο οξυγόνο. Η ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών, δίνει στο βιοϋμένιο τις ιδιότητες της πυκνότητας και της ελαστικότητας (Agle 2007).

Τα ώριμα βιοϋμένια είναι οργανωμένα και δομημένα έτσι ώστε να υπάρχουν κανάλια νερού παντού διασκορπισμένα για να διευκολύνουν την ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών, μεταβολιτών αλλά και για την απέκκριση άχρηστων ουσιών – προϊόντων (Shi & Zhu 2009). Κάθε βιοϋμένιο μπορεί να αποτελείται από μία ως και πολλών ειδών κοινωνίες, με τα βιοϋμένια του δεύτερου τύπου να τείνουν να είναι πυκνότερα.

Οι κοινότητες μικροβίων μπορεί να διακοπούν κάποια στιγμή και να αποτελέσουν τον ‘σπόρο’ για τη δημιουργία ενός νέου βιοϋμένιου οπουδήποτε αλλού. Τα βιοϋμένια μπορεί να χρειαστούν πάνω από 10 μέρες για να σχηματιστούν πλήρως. Η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, το είδος του οργανισμού, αλλά και οι περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, pH, διαλυμένο οξυγόνο, αλατότητα, σίδηρος) επηρεάζουν τη δημιουργία βιοϋμένιου (Agle 2007).

1.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ

Τα βιοϋμένια σχηματίζονται σταδιακά. Υπάρχουν δύο ειδών μοντέλα προσκόλλησης των κυττάρων σε κάποια επιφάνεια για το σχηματισμό βιοϋμένιου. Το πρώτο αφορά το μοντέλο των δύο σταδίων, όπου το πρώτο βήμα περιλαμβάνει τη μεταφορά των βακτηρίων πολύ κοντά στην επιφάνεια έτσι ώστε να μπορούν να προσροφηθούν από την επιφάνεια.

Αυτό το στάδιο είναι αναστρέψιμο – τα βακτήρια μπορούν να μετακινηθούν με το απλό πλύσιμο. Αφού προσκολληθούν, το δεύτερο βήμα εξαρτάται από το χρόνο και αφορά την παραγωγή του εξωκυτταρικού υλικού το οποίο προσκολλά τα βακτήρια στην επιφάνεια (Hood & Zottola 1995).

Το δεύτερο μοντέλο, των τριών σταδίων δείχνει τη διαδικασία προσκόλλησης, σε σχέση με την απόσταση των βακτηρίων από την επιφάνεια. Σε απόσταση μεγαλύτερη των 50nm, μόνο μεγάλου εύρους δυνάμεις λαμβάνουν χώρα και η προσκόλληση είναι αναστρέψιμη. Καθώς η απόσταση φτάνει τα 20 nm, μαζί, μεγάλου εύρους δυνάμεις και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις πραγματοποιούνται. Το τρίτο στάδιο συμβαίνει σε

αποστάσεις μικρότερες των 15 nm, όπου επιπλέον δυνάμεις εμπλέκονται, όπως η παραγωγή πολυμερών που τελικά οδηγούν στη μη αναστρέψιμη επικόλληση.

Και στα δύο μοντέλα, το τελικό στάδιο εξαρτάται από την ικανότητα του μικροοργανισμού να μεταβολίζει και να παράγει υλικό που μπορεί να κολλήσει στην επιφάνεια (Hood & Zottola 1995). Ισχυρές δυνάμεις όπως δυνάμεις van der Waals, ηλεκτροστατικές και υδροφοβικές αρχίζουν και αναπτύσσονται, ενώ τα κύτταρα είναι ακόμα σε θέση να μετακινηθούν από την επιφάνεια.

Μετά την αρχική προσκόλληση ο οργανισμός πρέπει να διατηρήσει επαφή με την επιφάνεια, να προσκολληθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να μην υπάρχει περίπτωση αποκόλλησης (μη αντιστρεπτή κατάσταση) και να αναπτυχθεί ώστε να σχηματιστεί το βιοϋμένιο. Στο μη αντιστρεπτό στάδιο μικρότερες δυνάμεις λαμβάνουν χώρα όπως διπολικές δυνάμεις, υδρογόνου, ιοντικές και ομοιοπολικές, καθώς και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις.

Μετά το μη αντιστρεπτό στάδιο η έκπλυση δεν μπορεί να αποκολλήσει τα κύτταρα, παρά μόνο η έντονη αναμόχλευση. Η μετάβαση από τις αδύναμες στις ισχυρές αλληλεπιδράσεις με την επιφάνεια οφείλεται κυρίως στη δημιουργία της εξωπολυμερικής ουσίας, η οποία αποτελείται από διαφορετικές σειρές βιοσυνθετικών πολυμερών τα οποία μπορεί να αποτελούνται από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και φωσφολιπίδια. Καθώς το βιοϋμένιο ωριμάζει, τα κανάλια και οι πόροι αναπτύσσονται και τα βακτήρια ανακατανέμονται. Τα κύτταρα στο βιοϋμένιο έχουν επίσης την ικανότητα να ανταλλάσσουν γενετικό στοιχείο με αυξανόμενο ρυθμό. Αυτό ίσως επιτρέπει στις επόμενες γενιές να αποκτήσουν αντιβιοτική αντοχή, τοξικότητα και επιβίωση έναντι των περιβαλλοντικών συνθηκών (Agle 2007).

Εξαιτίας της ανθεκτικότητας των βιοϋμενίων σε σχέση με τα μεμονωμένα κύτταρα, οidiάφορες ουσίες εξόντωσής τους μπορεί να αποδειχτούν αναποτελεσματικές (Longhi *et al.* 2008; Shi & Zhu 2009). Τα βιοϋμένια μπορούν να αποτελέσουν συνεχή πηγή μόλυνσης στη βιομηχανία τροφίμων ακόμα και μετά τη χρήση απολυμαντικών. Αυτό οφείλεται στην εξωκυτταρική μεμβράνη η οποία μπορεί να μην εξαλειφθεί πλήρως, ακόμα και όταν όλα τα κύτταρα του εκάστοτε μικροοργανισμού έχουν καταστραφεί. Αν κάποιο μέρος της παραμείνει θα ευνοήσει την προσκόλληση νέων κυττάρων τα οποία στη συνέχεια θα δημιουργήσουν νέο βιοϋμένιο (Kives 2006). Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων αποτελεί μια από τις πιο κύριες εστίες μόλυνσης (Aarnisalo *et al.* 2006).

Η επιλογή των κατάλληλων απολυμαντικών, εξαρτάται από την κατανόηση της φύσης του εκάστοτε μικροοργανισμού που δημιουργεί το βιοϋμένιο, από την αποτελεσματικότητά τους, την ασφάλεια και την ευκολία απολύμανσης. Ιδιαίτερη σημασία δίνεται στη διαβρωτική ικανότητα των χημικών συστατικών, και στις μετέπειτα επιπτώσεις στα τελικά προϊόντα (Simoes *et al.* 2010) .

1.5 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της διατριβής ήταν η παρακολούθηση της ανάπτυξης βιοϋμένιου του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες τύπου AISI - 304, 3 x 1 x 0.1 cm, προσομοιώνοντας το πραγματικό περιβάλλον, που είναι οι επιφάνειες μιας μονάδας επεξεργασίας αλιευμάτων.

Επίσης σκοπός ήταν να διελευκανθεί η πιθανή διαφορετική συμπεριφορά κυττάρων με διαφορετικό ιστορικό προέλευσης όπως, κυττάρων που προέρχονται από υγρή καλλιέργεια (πλαγκτονικά κύτταρα) αλλά και από βιοϋμένιο, καθώς αναπτύσσονται σε αποστειρωμένο ιχθυοζωμό καθώς και σε μη αποστειρωμένο ώστε να μελετηθεί και η συμπεριφορά στην ανάπτυξη βιοϋμένιου παρουσία και άλλων μικροοργανισμών των ιχθύων όπως *Pseudomonas spp.*, βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H₂S), Enterobacteriaceae και Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB) τα οποία περιέχονται στον μη αποστειρωμένο ιχθυοζωμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα για την μελέτη της ανάπτυξης βιουμενίου *L. monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες εμβαπτισμένες σε ιχθυοζωμό αποστειρωμένο στους 16°C. Όλες οι μεταλλικές επιφάνειες ήταν τύπου AISI-304, διαστάσεων 3 × 1 × 0.1 cm ίδιου με αυτό που χρησιμοποιείται για την κατασκευή εξοπλισμού σε επαφή με τρόφιμα και η θερμοκρασία των 16°C επιλέχθηκε λόγο ότι είναι η συνήθης θερμοκρασία που επικρατεί σε χώρους μονάδων επεξεργασίας αλιευμάτων.

1. Στο πρώτο πείραμα μελετήθηκε η ανάπτυξη βιουμενίου από προσκολλημένα κύτταρα *L. monocytogenes* τα οποία είχαν προέλθει από διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης όπως (i) εργαστηριακή και (ii) πραγματική. Πιο συγκεκριμένα στην πρώτη (i) κύτταρα *L. monocytogenes* που αυξήθηκαν σε εργαστηριακό θρεπτικό ζωμό (Tryptone Soy Broth-TSB) μετά από επώαση στους 37°C και στην δεύτερη (ii) κύτταρα *L. monocytogenes* που αυξήθηκαν σε αποστειρωμένο ιχθυοζωμό μετά από επώαση στους 16°C, το οποίο προσομοιάζει τις πραγματικές συνθήκες μονάδες μεταποίησης ιχθύων.

2. Στο δεύτερο πείραμα μελετήθηκε η ανάπτυξη βιουμενίου από προσκολλημένα κύτταρα *L. monocytogenes* σε αποστειρωμένο ιχθυοζωμό μετά από επώαση στους 16°C, τα οποία κύτταρα είχαν προέλθει από καλλιέργεια *L. monocytogenes* (i) πλαγκτονικού τύπου και (ii) βιουμενίου όπου είχαν προέλθει και στις δύο περιπτώσεις μετά από ανάπτυξη στους 16°C σε θρεπτικό υλικό αποστειρωμένο ιχθυοζωμό.

3. Στο τελευταίο μελετήθηκε η ανάπτυξης βιουμενίου από προσκολλημένα κύτταρα *L. monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες εμβαπτισμένες σε μη αποστειρωμένο ιχθυοζωμό στους 16°C, για να μελετηθεί η επίδραση του υπόλοιπου μικροβιακού πληθυσμού. Τα κύτταρα *L. monocytogenes* είχαν προέλθει από καλλιέργεια (i) πλαγκτονικού τύπου και (ii) βιουμενίου μετά από επώαση στους 16°C σε θρεπτικό υλικό αποστειρωμένο ιχθυοζωμό.

2.2 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Τα μικροβιολογικά υλικά προέρχονταν από την LABM (Lancashire, UK), Τα χημικά αντιδραστήρια προέρχονταν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

2.2.1 Tryptone Soy Broth (TSB) και Tryptone Soy Agar (TSA)

Το υλικό αυτό είναι ένας ζωμός γενικής χρήσης που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών οι οποίοι είναι ικανοί να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά.

2.2.2 Palcam Agar

Ο προσδιορισμός της *L. monocytogenes* πραγματοποιείται με το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Palcam. Η σύνθεσή του αναστέλλει την ανάπτυξη όλων των κατά Gram θετικών βακτηρίων αλλά και των περισσοτέρων Gram αρνητικών βακτηρίων. Η εκλεκτικότητά του οφείλεται στα συστατικά του, όπως πολυμυξίνη, acriflavin, κεφταζιμίνη και χλωριούχο λίθιο. Η *L. monocytogenes* εμφανίζεται με χρώμα πράσινο ελιάς στις αποικίες της και όταν βρίσκονται πολλές μαζί το πράσινο μετατρέπεται σε μαύρο. Η επώαση των τρυβλίων γινόταν για 24 – 48 ώρες στους 37°C

2.2.3 CFC Agar

Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. απαριθμήθηκαν σε CFC agar. Παρέχει όλα εκείνα τα συστατικά (π.χ. αμινοξέα, βιταμίνες, κτλ) που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των βακτηρίων του συγκεκριμένου είδους, ενώ η προσθήκη αντιβιοτικού κάνει το θρεπτικό εκλεκτικό για *Pseudomonas* spp. Η πεπτόνη ζελατίνης και η καζεΐνη από ενζυματική πέψη παρέχουν το άζωτο (N), το θείο (S) και τις βιταμίνες που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί. Το χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) και το θειικό κάλιο (K_2SO_4) παράγουν χρωστική. Η γλυκερόλη συμπληρώνεται ως πηγή άνθρακα (C). Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες Sodium Nalidixate, Fucidin και Cephaloridine είναι εκλεκτικά υλικά και χρησιμοποιούνται για να αναστείλουν Gram⁺ και ορισμένα Gram⁻ βακτήρια.

2.2.4 Iron Agar

Το Iron Agar χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση μικροοργανισμών τα οποία παράγουν υδρόθειο (H_2S). Η καζεΐνη και οι ιστοί ζώων από ενζυματική πέψη, καθώς και η εμπλουτισμένη με μαγιά πεπτόνη, παρέχουν άζωτο (N), άνθρακα (C) και βιταμίνες που απαιτούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Επίσης παρέχει τρεις υδατάνθρακες (H/C), τη δεξτρόζη, τη λακτόζη και την σακχαρόζη. Όταν οι υδατάνθρακες αυτοί υποστούν ζύμωση, παράγεται οξύ το οποίο ανιχνεύεται από τον δείκτη ερυθρό της φαινόλης. Το θειικό νάτριο ($Na_2S_2O_2$) ανάγεται προς υδρόθειο (H_2S), αντιδρά με τα άλατα του σιδήρου (Fe) και αποδίδει ένα τυπικό μαύρο χρώμα (σουλφίδιο του σιδήρου Fe) στις αποικίες.

2.2.5 VRBGA

Ο προσδιορισμός των Enterobacteriaceae γίνεται σε θρεπτικό υπόστρωμα *Violet-Red-Bile-Glucose-Agar* (VRBGA). Χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση των εντεροβακτηριδίων σε τρόφιμα. Είναι εκλεκτικό υλικό χάρη στη δράση των χολικών αλάτων (biles) και του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet) και έτσι αναπτύσσονται μόνο τα βακτηρίδια της οικογένειας Enterobacteriaceae. Η ζελατίνη από ενζυματική πέψη παρέχει άζωτο (N), αμινοξέα και άνθρακα (C). Το εκχύλισμα ζύμης προσφέρει τις απαραίτητες βιταμίνες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η δεξτρόζη παρέχει υδατάνθρακες (H/C). Η αντίδραση των βακτηρίων με τη δεξτρόζη χρωματίζει τις αποικίες κόκκινες με ένα κόκκινο-μωβ φωτοστέφανο παρουσία δείκτη pH (Ουδέτερο κόκκινο, Neutralred).

2.2.6 MRS

Ο προσδιορισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα deMan - Rogosa–Sharpeagar (MRS). Το οξικό νάτριο ($C_2H_3NaO_2$) καθώς και το βασικό pH καταστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Η ενζυματική πέψη ζωικού ιστού καθώς και το εκχύλισμα βοδινού και ζύμης είναι οι πηγές άνθρακα (C), αζώτου (N) και βιταμινών. Η δεξτρόζη είναι ο ζυμούμενος υδατάνθρακας (H/C). Το οξικό νάτριο ($C_2H_3NaO_2$) είναι ανασταλτικός παράγοντας, ενώ μαζί με το κιτρικό αμμώνιο ($C_6H_{17}N_3O_7$) δρουν ως εκλεκτικοί παράγοντες. Το φωσφορικό κάλιο (K_3PO_4) δρα ως ρυθμιστικός παράγοντας, ενώ το θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$) και το θειικό μαγγάνιο ($MnSO_4$) παρέχουν θετικά ιόντα για τον μεταβολισμό. Το πολυσορβικό (Polysorbate,

Tween ® 80) είναι επιφανειοδραστικό, διευκολύνοντας την πρόσληψη των θρεπτικών από τους μικροοργανισμούς.

2.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΙΧΘΥΟΖΩΜΟΥ

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, απαιτείται η δημιουργία ενός θρεπτικού ζωμού προερχόμενου από τσιπούρες για να χρησιμοποιηθεί ως υλικό ανάπτυξης του βιοϋμενίου, προσομοιάζοντας έτσι τις πραγματικές συνθήκες ενός χώρου επεξεργασίας αλιευμάτων. Αγοράστηκαν τσιπούρες ιχθυοτροφείου (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) από ιχθυοπωλείο του Βόλου.

Μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και από κάθε τσιπούρα χρησιμοποιήθηκε το φιλέτο του ψαριού (200-250g) το οποίο μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένες σακούλες, όπου προστέθηκε απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:1. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε συσκευή τύπου stomacher (Interscience) και πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση για πέντε λεπτά. Μετά την ομογενοποίηση όλων των δειγμάτων, θα χρησιμοποιήθηκε ως φίλτρο ένα τούλι, από το οποίο φιλτράρει όλο το δείγμα του ζωμού ιχθύος.

Έπειτα ο ζωμός ιχθύος μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη και πραγματοποιήθηκε βρασμός για πέντε λεπτά. Μετά τον βρασμό πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα του ζωμού ιχθύος με ηθμούς whatman No2 125 mm και αφού μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη πραγματοποιήθηκε βρασμός για 30 λεπτά προκειμένου να αποστειρωθεί το δείγμα. Μετά το βρασμό ο ζωμός ιχθύος μεταφέρθηκε ασηπτικά σε αποστειρωμένη φιάλη, μετρίεται το pH και σταθεροποιείται στην τιμή 6,4 με τη βοήθεια ρυθμιστικών φωσφορικών διαλυμάτων (KH_2PO_4 και K_2HPO_4). Για την παραγωγή μη αποστειρωμένου ιχθυοζωμού επαλείφθηκε το στάδιο του βρασμού για 30 λεπτά.

2.4 ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΑΤΑ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο *L.monocytogenes* ScottA, τα κύτταρα του οποίου ήταν αποθηκευμένοι σε φιαλίδια με πλαστικά σφαιρίδια (Protect, UK) σε θερμοκρασία -80°C . Με τον μικροβιολογικό κρίκο, ελήφθησαν σφαιρίδια και

εμβαπτίστηκαν σε 10 ml αποστειρωμένο TSB. Μετά από 24 ώρες στους 37°C, οι μικροοργανισμοί ήταν έτοιμοι για να χρησιμοποιηθούν.

Για την δημιουργία ενοφθαλμίσματος *L. monocytogenes* για να χρησιμοποιηθούν στην προσκόλληση στις μεταλλικές επιφάνειες, μεταφέρονταν 10ml με βακτηριολογικό κρίκο σε 10 ml αποστειρωμένο ιχθυοζωμό και επωάζονταν στους 16°C για περίπου 7 ημέρες ώστε ο πληθυσμός να φθάσει σε υψηλά επίπεδα, περίπου 10^{8-9} cfu/ml.

Στις περιπτώσεις ενοφθαλμίσματος κυττάρων που προήλθαν από βιουμένιο *L. monocytogenes*, ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως περιγράφεται στα 2.5, 2.6 και 2.7, όπου έγινε αποξέωση κυττάρων από μεταλλικές επιφάνειες μετά από παρέλευση 6 ημερών επώασης.

2.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν αποστειρωμένες μεταλλικές επιφάνειες τύπου AISI-304, διαστάσεων $3 \times 1 \times 0.1$ cm (συνολικής επιφάνειας των δύο πλευρών 6 cm^2), μεταφέρθηκαν ασηπτικά 5 ml αποστειρωμένου NaCl 0.85 % (w/v) και 1 ml καλλιέργειας κυττάρων *L. monocytogenes*, με τελικό πληθυσμό στον τελικό όγκο 6 ml εναιωρήματος περίπου 10^4 cfu/ml.

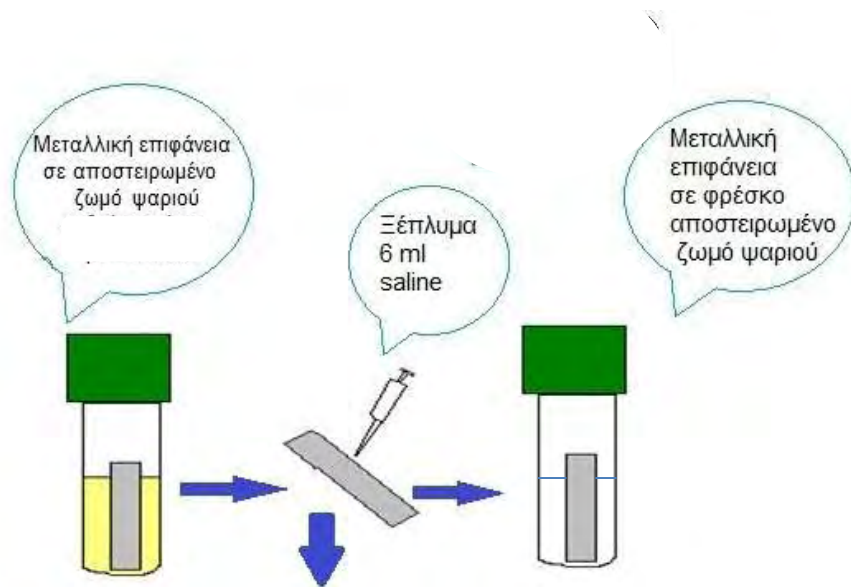
Κατόπιν τοποθετήθηκαν στους 16 °C για 2 ώρες, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η προσκόλληση των κυττάρων του μικροοργανισμού στις μεταλλικές επιφάνειες. Μετά το πέρασμα των 2 ωρών, αφού έγινε η πρώτη καταμέτρηση του πληθυσμού στις μεταλλικές επιφάνειες, κάθε μεταλλική επιφάνεια ξεπλήθηκε με 5 ml NaCl 0.85 % (w/v) η κάθε πλευρά, προκειμένου να απομακρυνθούν τα κύτταρα που δεν είχαν προσκολληθεί επιτυχώς στην επιφάνεια και τοποθετήθηκαν στον ιχθυοζωμό.

Στο 3 πείραμα η προσκόλληση πραγματοποιήθηκε πάλι σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν αποστειρωμένες μεταλλικές επιφάνειες αλλά μεταφέρθηκαν 5 ml μη αποστειρωμένου ιχθυοζωμού καθώς και 1 ml καλλιέργειας κυττάρων *L. monocytogenes*, με τελικό πληθυσμό στον τελικό όγκο 6 ml εναιωρήματος περίπου 10^4 cfu/ml και παρέμειναν για 2 ώρες στους 16 °C.

2.6 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΥΜΕΝΙΟΥ

Οι μεταλλικές επιφάνειες με τα προσκολλημένα κύτταρα μεταφέρθηκαν η κάθε μία σε αποστειρωμένο σωλήνα με 6 ml αποστειρωμένο ιχθυοζωμό για επώαση στους 16°C. Κάθε 48 ώρες οι μεταλλικές επιφάνειες ξεπλένονταν με NaCl 0.85% w/νόπως

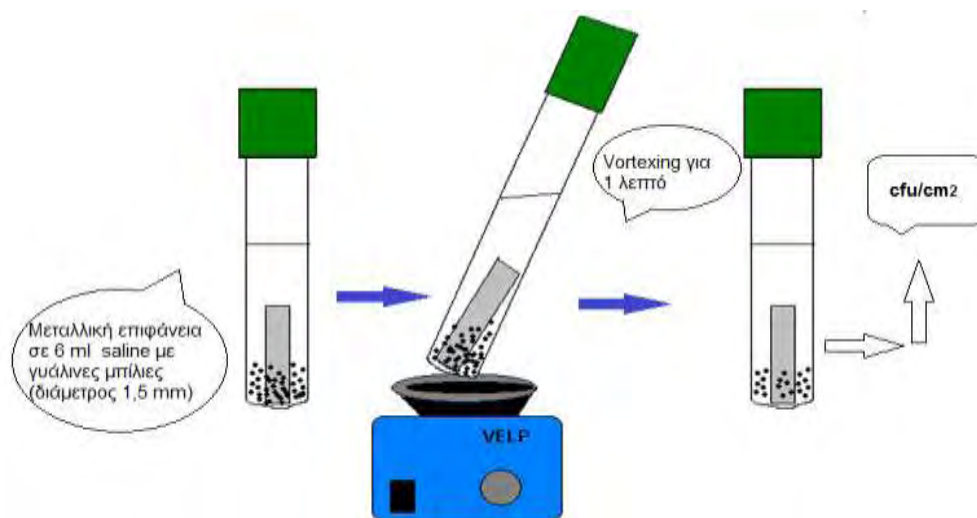
περιγράφηκε παραπάνω και τοποθετούνταν σε φρέσκο αποστειρωμένο ιχθυοζωμό (Εικόνα 1). Στο πείραμα 3 γινόταν ακριβώς το ίδιο με φρέσκο μη αποστειρωμένο ιχθυοζωμό.



Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση της διαδικασίας ανανέωσης του ζωμού ιχθύος κάθε 48 ώρες.

2.7 ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΒΙΟΥΜΕΝΙΟΥ

Για την απαρίθμηση (Εικόνα 2) η μεταλλική επιφάνεια, απομακρύνθηκε ασηπτικά από τον σωλήνα με το θρεπτικό υλικό στον οποίο βρισκόταν και ξεπλύθηκε με 10 ml NaCl 0.85 % (w/v), 5ml για κάθε πλευρά της μεταλλικής επιφάνειας. Κατόπιν οι επιφάνειες μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε αποστειρωμένο σωλήνα με 6 ml NaCl 0.85 % (w/v), και γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 1,5 mm. Ακολούθησε ανατάραξη σε vortex για 1 λεπτό προκειμένου τα σφαιρίδια να αποξέσουν τα κύτταρα του μικροοργανισμού από τη μεταλλική επιφάνεια και να εναιωρηθούν στο NaCl 0.85 % (w/v). Έπειτα 1 ml από το βακτηριακό εναιώρημα μεταφέρθηκαν σε 9 ml αποστειρωμένου NaCl 0.85 % (w/v), όπου πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις και κατόπιν όγκος 0.1 ml, από την κατάλληλη αραιώση χρησιμοποιήθηκε για την επίστρωσή του σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα TSA (TryptoneSoyAgar), επώστηκαν στους 37°C για 48 ώρες προκειμένου, να γίνει απαρίθμηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes*.



Εικόνα 2. Σχηματική παράσταση της διαδικασίας απαρίθμησης πληθυσμού βιουμενίου

Στο πείραμα 3, χρησιμοποιήθηκε PALCAM agar για να γίνει απαρίθμηση του πληθυσμού της *Listeria*. Επίσης στο πείραμα 3 έγινε απαρίθμηση με ενσωμάτωση 1 ml από τις κατάλληλες αραιώσεις, β) βακτηρίων που παράγουν H_2S σε Iron Agar, με καταμέτρηση μόνο των μαύρων αποικιών μετά από επώαση των τρυβλίων στους $25\text{ }^\circ\text{C}$ για 48 έως 72 ώρες, γ) Enterobacteriaceae σε VRBGA, με καταμέτρηση των μωβ αποικιών με δακτύλιο μετά από επώαση στους $37\text{ }^\circ\text{C}$ για 24 ώρες, δ) Οξυγαλακτικών βακτηρίων σε MRS Agar, με καταμέτρηση των αποικιών μετά από επώαση στους $25\text{ }^\circ\text{C}$ για 48 ώρες, και τέλος ε) *Pseudomonas* spp, με επίστρωση 0.1 ml σε CFC agar, και καταμέτρηση των αποικιών μετά από επώαση στους $25\text{ }^\circ\text{C}$ για 48 ώρες .

Στις περιπτώσεις όπου χρειαζόταν ενοφθάλμισμα κυττάρων βιουμενίου *L. monocytogenes* (βλέπε 2.4), τα κύτταρα μετά την απόξεση στο ελαιώρημα NaCl 0.85 % (w/v) χρησιμοποιούνταν για να ενοφθαλμίσουν αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες με μεταλλικές επιφάνειες που περιείχαν 5 ml αποστειρωμένου NaCl 0.85 % (w/v) όπου μεταφέρονταν 1 ml του εν λόγω ελαιωρήματος *L. monocytogenes*, ώστε ο τελικός πληθυσμός στον τελικό όγκο 6 ml να είναι περίπου περίπου 10^4 cfu/ml. (βλέπε 2.5).

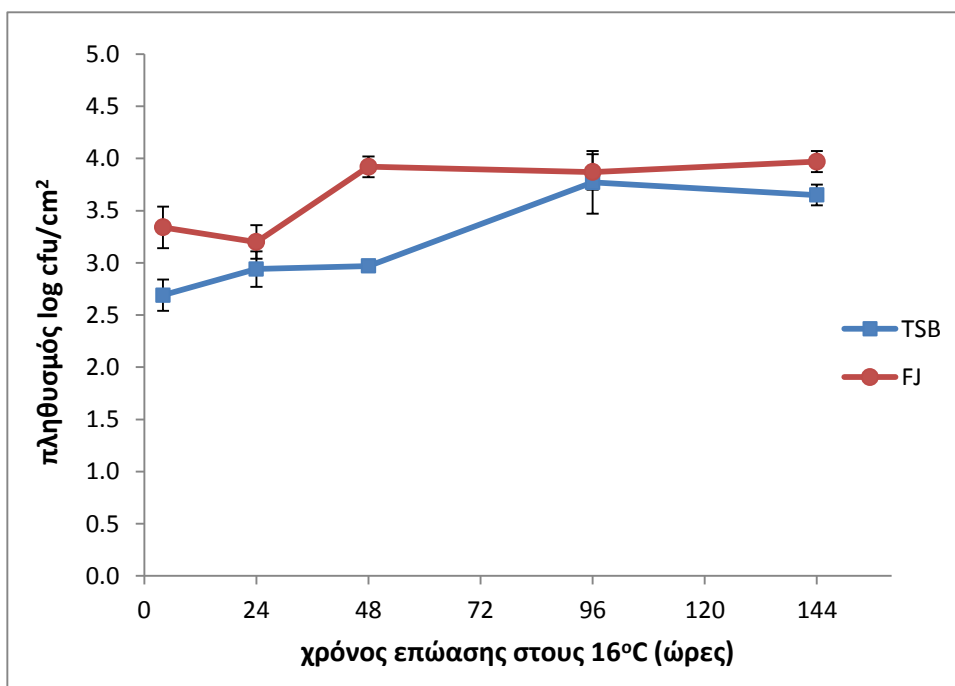
Στατιστική επεξεργασία

Όπου χρειάστηκε οι μέσοι των τιμών $\log\text{ cfu/cm}^2$, συγκρίθηκαν με το t-test με επίπεδο σημαντικότητας το 0.05, χρησιμοποιώντας το STATISTICA 6.0.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΠΕΙΡΑΜΑ 1^ο

Η αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων βιουμενίου σε μεταλλικές επιφάνειες στους 16°C με θρεπτικό υλικό ιχθυοζωμό από κύτταρα που προήλθαν μετά από αύξηση σε TSB και ιχθυοζωμό (FJ-FishJuice) παρουσιάζεται στο διάγραμμα 1.1.



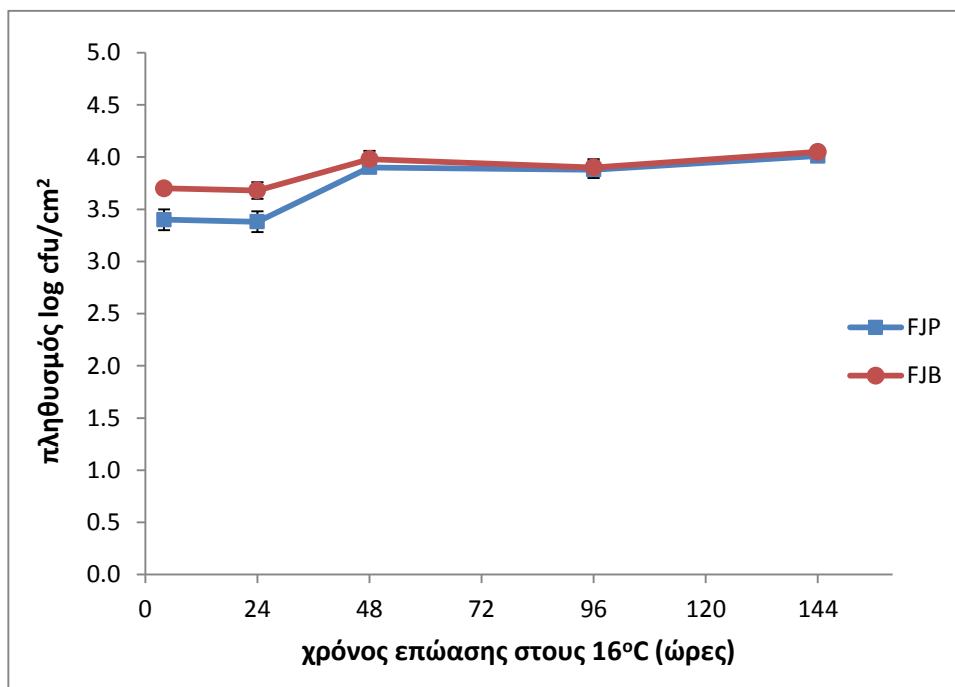
Διάγραμμα 1.1 : Ανάπτυξη βιουμενίου *L. monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό αποστειρωμένο ιχθυοζωμό στους 16°C, από προσκολλημένα κύτταρα που προήλθαν μετά από αύξηση σε TSB και ιχθυοζωμό (FJ-Fish Juice). Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων και οι μπάρες σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση.

Παρατηρούμε ότι κατά το στάδιο προσκόλλησης (2h), μεγαλύτερος πληθυσμός προσκολλήθηκε στις μεταλλικές επιφάνειες κυττάρων *L. monocytogenes* που είχαν προέλθει από τον ιχθυοζωμό. Πράγματι, μετά το στάδιο προσκόλλησης ο πληθυσμός στο βιουμενίο των κυττάρων *L. monocytogenes* που είχαν προέλθει από τον ιχθυοζωμό ήταν της τάξεως των 3,3 log cfu/cm², σε αντίθεση με τα 2,6 log cfu/cm² των κυττάρων *L. monocytogenes* που είχαν προέλθει από το TSB ($p \leq 0.05$). Επίσης η αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων του βιουμενίου ήταν ταχύτερη για τα κύτταρα *L. monocytogenes* που είχαν προέλθει από τον ιχθυοζωμό φθάνοντας το επίπεδο των 3,8

log cfu/cm² μετά από 48 ώρες , σε αντίθεση με τις 96 ώρες που χρειάστηκαν για τα κύτταρα βιουμενίου που είχαν προέλθει από το TSB να φθάσουν το ίδιο επίπεδο πληθυσμού (p>0.05). Μετά το πέρας των 6 ημερών ο πληθυσμός των κυττάρων βιουμενίου που είχαν προέλθει από τον ιχθυοζωμό ήταν περίπου 0,4 log cfu/cm² υψηλότερος από τα κύτταρα που είχαν προέλθει από το TSB (p≤0.05).

3.2 Πείραμα 2^ο

Η αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων βιουμενίου σε μεταλλικές επιφάνειες στους 16°C με θρεπτικό υλικό ιχθυοζωμό από κύτταρα που προήλθαν μετά από αύξηση σε ιχθυοζωμό (FJP-πλακτονικά κύτταρα) στους 16°C και κύτταρα που είχαν προέλθει μετά από απόξεση κυττάρων βιουμενίου (FJB-κύτταρα βιουμενίου) που είχε σχηματισθεί σε ιχθυοζωμό στους 16°C, παρουσιάζεται στο διάγραμμα 2.1.



Διάγραμμα 2.1 Ανάπτυξη βιουμενίου *L. monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό αποστειρωμένο ιχθυοζωμό στους 16°C, από προσκολλημένα κύτταρα που προήλθαν από αύξηση σε ιχθυοζωμό (FJP-πλακτονικά κύτταρα) στους 16°C και κύτταρα που είχαν προέλθει μετά από απόξεση κυττάρων βιουμενίου (FJB-κύτταρα βιουμενίου) που είχε σχηματισθεί σε ιχθυοζωμό στους 16°C. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων και οι μπάρες σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση.

Παρατηρούμε ότι κατά το στάδιο προσκόλλησης, μεγαλύτερος πληθυσμός προσκολλήθηκε στις μεταλλικές επιφάνειες κυττάρων *L. monocytogenes* που είχαν

προέλθει μετά από απόξεση από τις μεταλλικές επιφάνειες (FJB-κύτταρα βιουμενίου). Συγκεκριμένα, μετά το στάδιο της προσκόλλησης (2h) ο πληθυσμός που προήλθε από κύτταρα βιουμενίου (FJB) ήταν της τάξεως $3,7 \log \text{cfu/cm}^2$, σε αντίθεση με τα $3,4 \log \text{cfu/cm}^2$ ($p \leq 0.05$) των κυττάρων βιουμενίου *L. monocytogenes* που είχαν προέλθει μετά από υγρή καλλιέργεια σε ιχθυοζωμό (FJP-πλακτονικά κύτταρα). Στη συνέχεια, στις 48 ώρες, παρατηρήθηκε αύξηση στο επίπεδο των $4 \log \text{cfu/cm}^2$ στον πληθυσμό που προήλθε από κύτταρα βιουμενίου και των $3,9 \log \text{cfu/cm}^2$ στον πληθυσμό που είχαν προέλθει από πλακτονικά κύτταρα, όπου στατιστικά δεν υπήρχε διαφορά ($p > 0.05$), δείχνοντας ότι υπήρχε μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης των κυττάρων που είχαν προέλθει από πλακτονική καλλιέργεια σε σχέση με τα βιουμενικά κύτταρα. Τέλος, διαπιστώθηκε ότι από εκεί και πέρα ο πληθυσμός παρέμεινε ο ίδιος και για τις δύο περιπτώσεις φθάνοντας λίγο παραπάνω από $4 \log \text{cfu/cm}^2$ στο πέρας του πειράματος.

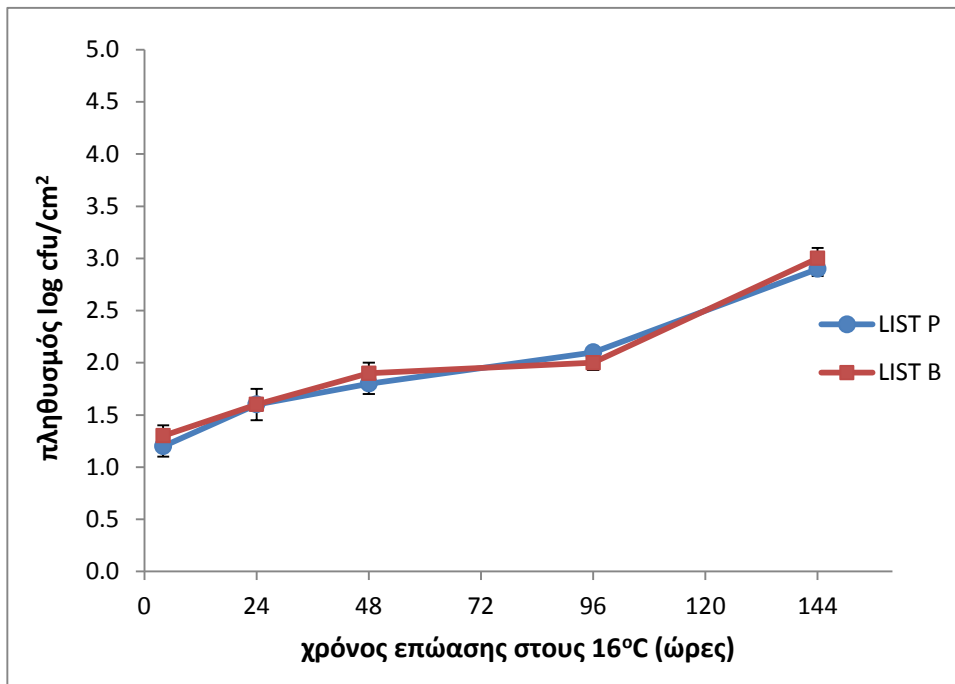
3.3 Πείραμα 3^ο

3.3.1 Αύξηση *L. monocytogenes*

Στο διάγραμμα 3.1 παρατηρούμε την ανάπτυξη βιουμενίου *L. monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες στους 16°C εμβαπτισμένες σε μη-αποστειρωμένο ιχθυοζωμό από προσκολλημένα κύτταρα που προήλθαν από αύξηση σε ιχθυοζωμό (ListP-πλακτονικά κύτταρα) στους 16°C και κύτταρα που είχαν προέλθει μετά από απόξεση κυττάρων βιουμενίου (ListB-κύτταρα βιουμενίου) που είχε σχηματισθεί σε ιχθυοζωμό στους 16°C .

Παρατηρούμε ότι κατά το στάδιο προσκόλλησης, παρόμοιος πληθυσμός προσκολλήθηκε στις μεταλλικές επιφάνειες σε σχέση με την προέλευση των κυττάρων. Πράγματι ο πληθυσμός των κυττάρων βιουμενίου (ListB-κύτταρα βιουμενίου) ήταν στο επίπεδο των $1,3 \log \text{cfu/cm}^2$, το οποίο ήταν ίδιο ($p > 0.05$) με τον πληθυσμό ($1,2 \log \text{cfu/cm}^2$) που προήλθε από αύξηση σε ιχθυοζωμό (ListP-πλακτονικά κύτταρα). Και στη συνέχεια, παρατηρήθηκε παρόμοια αύξηση μέχρι τους $3 \log \text{cfu/cm}^2$ στο τέλος των 144 ώρων επώασης. Επίσης συγκρίνοντας και τα αποτελέσματα από το προηγούμενο πείραμα (Διάγραμμα 2.1), η προσκόλληση των κυττάρων *L. monocytogenes* ήταν εντυπωσιακά μειωμένη κατά $3 \log \text{cfu/cm}^2$ παρουσία και άλλων μικροοργανισμών. Ο ρυθμός αύξησης φαίνεται να είναι μεγαλύτερος, ωστόσο μετά από παρέλευση 6 ημερών

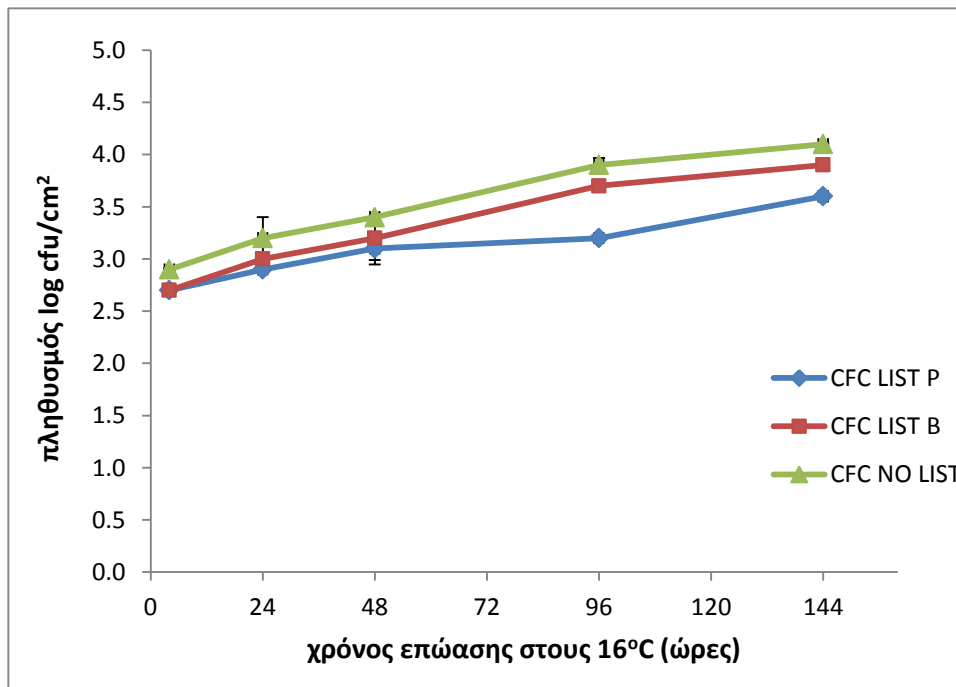
ο τελικός πληθυσμός ήταν κατά 1 log cfu/cm² μικρότερος ($p \leq 0.05$), σε σχέση με την μονοκαλλιέργεια βιουμενίου *L. monocytogenes*.



Διάγραμμα 3.1: Ανάπτυξη βιουμενίου *Listeria monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό μη-αποστειρωμένο ιχθυοζωμό στους 16°C, από προσκολλημένα κύτταρα που προήλθαν από αύξηση σε ιχθυοζωμό (ListP-πλακτονικά κύτταρα) στους 16°C και κύτταρα που είχαν προέλθει μετά από απόξεση κυττάρων βιουμενίου (ListB-κύτταρα βιουμενίου) που είχε σχηματισθεί σε ιχθυοζωμό στους 16°C. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων και οι μπάρες σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση.

3.3.2 Αύξηση *Pseudomonas*

Στο διάγραμμα 3.2, παρατηρούμε την ανάπτυξη πληθυσμού βιουμενίου των *Pseudomonas* σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό μη-αποστειρωμένο ιχθυοζωμό στους 16°C, απουσία *L. monocytogenes* (CFC-NO LIST), με την παρουσία πλακτονικών κυττάρων *L. monocytogenes* που είχαν προέλθει από αύξηση σε ιχθυοζωμό (CFC-ListP) και με την παρουσία κυττάρων βιουμενίου *L. monocytogenes* (CFC-ListB).

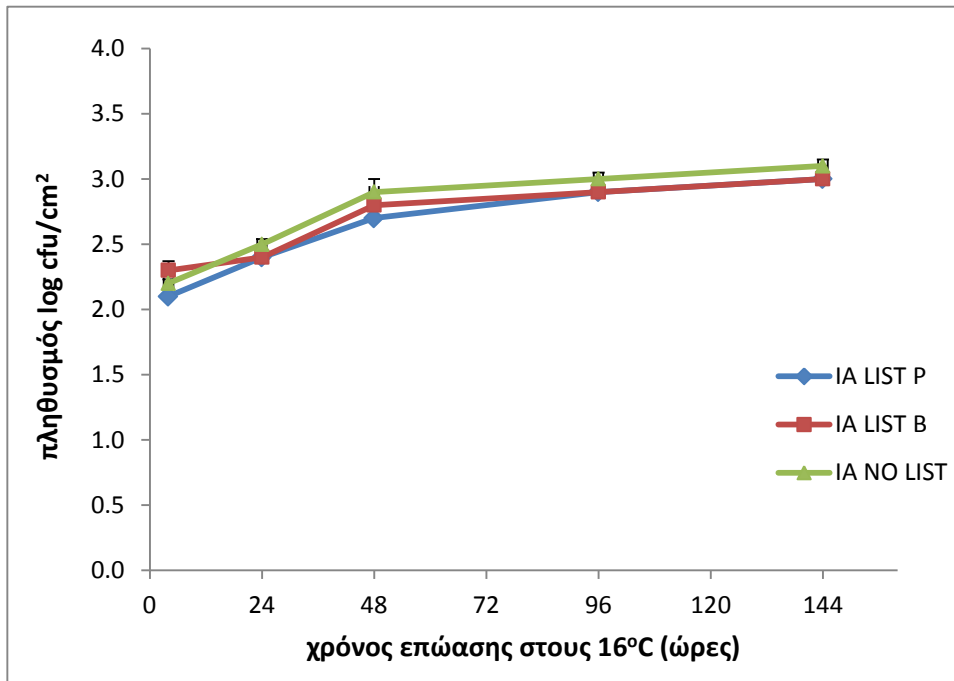


Διάγραμμα 3.2: Ανάπτυξη βιουμενίου *Pseudomonas* σε μη-αποστειρωμένο ιχθυοζωμό απουσία *L. monocytogenes* (CFC-NO LIST), με την παρουσία πλαγκτονικών κυττάρων *L. monocytogenes* (CFC-ListP) και με την παρουσία κυττάρων *L. monocytogenes* που προήλθαν από βιουμένιο (IA-ListB). Το κάθε σημείο, είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων και οι μπάρες σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση.

Παρατηρούμε ότι κατά το στάδιο προσκόλλησης, μεγαλύτερος πληθυσμός κυττάρων *Pseudomonas* προσκολλήθηκε στις μεταλλικές επιφάνειες απουσία *L. monocytogenes*. Πράγματι, μετά το στάδιο προσκόλλησης ο πληθυσμός στο βιουμένιο των κυττάρων *Pseudomonas* χωρίς την παρουσία *L. monocytogenes* ήταν της τάξεως 2,9 log cfu/cm², σε αντίθεση με τα 2,7 log cfu/cm² παρουσία πλαγκτονικών κυττάρων *L. monocytogenes* και κυττάρων βιουμενίου *L. monocytogenes* ($p \leq 0.05$). Στη συνέχεια παρατηρούμε αύξηση και στις τρεις περιπτώσεις, με μεγαλύτερη αύξηση στην περίπτωση απουσίας *L. monocytogenes* (*Pseudomonas* 4 log cfu/cm²) σε σχέση με την παρουσία πλαγκτονικών κυττάρων (πληθυσμός *Pseudomonas* 3,8 log cfu/cm²) και των κυττάρων βιουμενίου *L. monocytogenes*, όπου στην τελευταία περίπτωση ο πληθυσμός των *Pseudomonas* δεν ξεπέρασε τους 3,4 log cfu/cm² ($p \leq 0.05$), δεικνύοντας ανταγωνισμό μεταξύ *Pseudomonas* και *L. monocytogenes*.

3.3.3 Αύξηση υδροθειοπαραγωγών βακτηρίων

Στο διάγραμμα 3.3, παρατηρούμε την ανάπτυξη του πληθυσμού βιουμενίου από υδροθειοπαραγωγά βακτήρια σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό μη-αποστειρωμένο ιχθυοζωμό στους 16°C, απουσία *L. monocytogenes* (IA-NO LIST), με την παρουσία πλαγκτονικών κυττάρων *L. monocytogenes* που είχαν προέλθει από αύξηση σε ιχθυοζωμό (IA-ListP) και με την παρουσία κυττάρων βιουμενίου *L. monocytogenes* (IA-ListB).



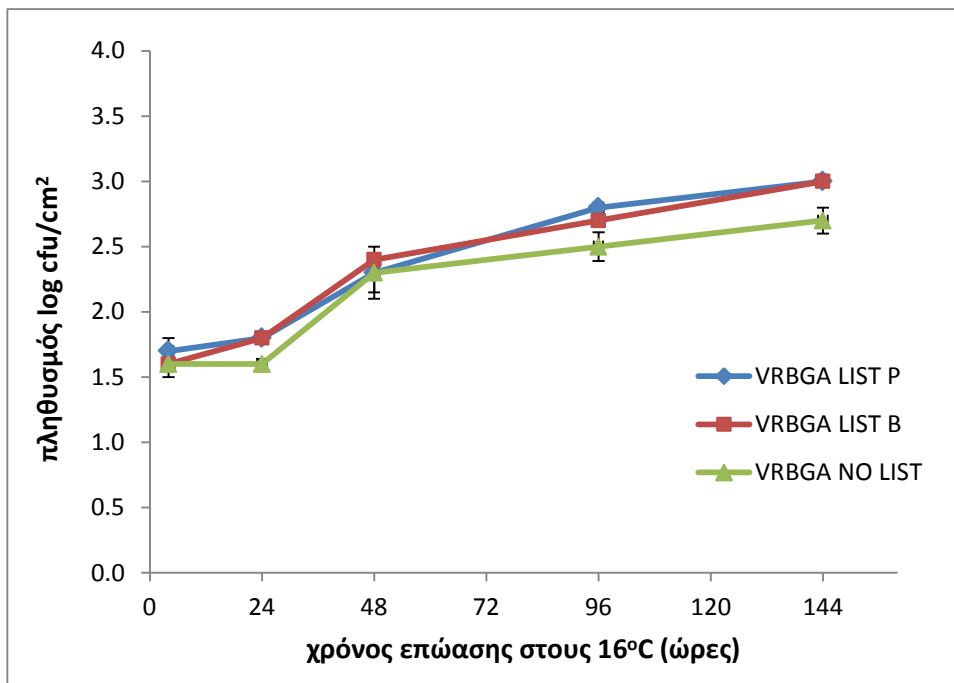
Διάγραμμα 3.3: Ανάπτυξη βιουμενίου υδροθειοπαραγωγών βακτηρίων σε μη-αποστειρωμένο ιχθυοζωμό απουσία *L. monocytogenes* (IA-NO LIST), με την παρουσία πλαγκτονικών κυττάρων *L. monocytogenes* (IA-ListP) και με την παρουσία κυττάρων *L. monocytogenes* που προήλθαν από βιουμένιο (IA-ListB). Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων και οι μπάρες σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση.

Παρατηρούμε ότι κατά το στάδιο προσκόλλησης, οριακά μεγαλύτερος μεγαλύτερος πληθυσμός προσκολλήθηκε στις μεταλλικές επιφάνειες παρουσία κυττάρων *L. monocytogenes* που είχαν προέλθει από βιουμένιο, σε σχέση με την περίπτωση απουσίας *L. monocytogenes* και παρουσίας πλαγκτονικών κυττάρων *L. monocytogenes* ($p \leq 0.05$). Ωστόσο στην συνέχεια, ο πληθυσμός των κυττάρων βιουμενίου των υδροθειοπαραγωγών βακτηρίων έφθασε σε οριακά αλλά ωστόσο στατιστικώς σημαντικά ($p \leq 0.05$) υψηλότερους πληθυσμούς απουσία *L. monocytogenes* σε σχέση με

την παρουσία κυττάρων *L. monocytogenes* που προέλθαν είτε από πλαγκτονική καλλιέργεια ή βιουμενίο.

3.3.4 Αύξηση Enterobacteriaceae

Στο διάγραμμα 3.4, παρατηρούμε την ανάπτυξη του πληθυσμού βιουμενίου από Enterobacteriaceae σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό μη-αποστειρωμένο ιχθυοζωμό στους 16°C, απουσία *L. monocytogenes* (VRBGA-NO LIST), με την παρουσία πλαγκτονικών κυττάρων *L. monocytogenes* που είχαν προέλθει από αύξηση σε ιχθυοζωμό (VRBGA-ListP) και με την παρουσία κυττάρων βιουμενίου *L. monocytogenes* (VRBGA-ListB).



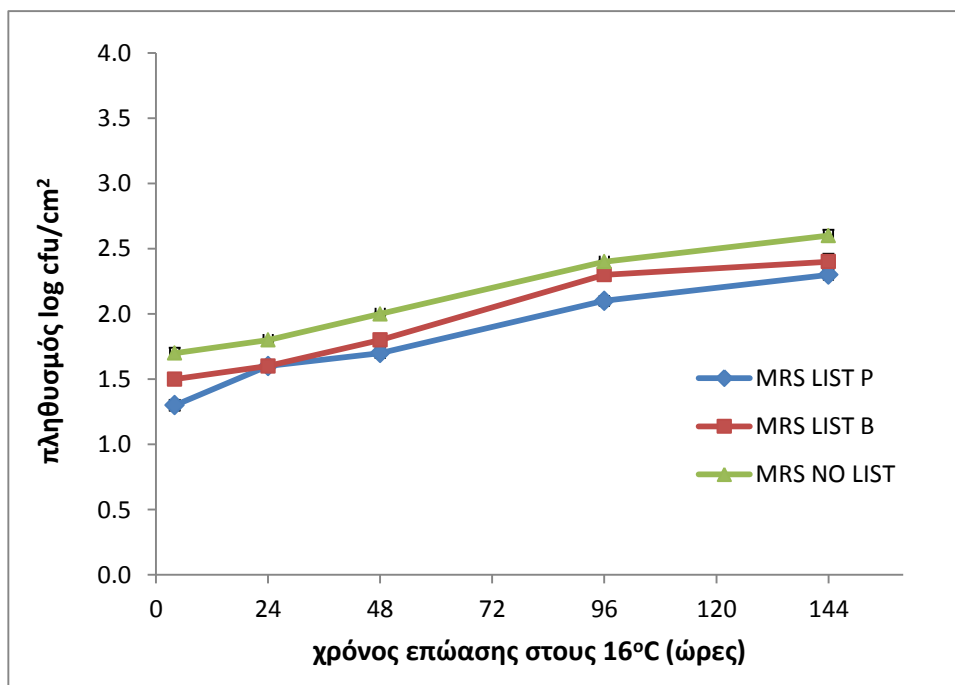
Διάγραμμα 3.4 Ανάπτυξη βιουμενίου Enterobacteriaceae σε μη-αποστειρωμένο ιχθυοζωμό απουσία *L. monocytogenes* (VRBGA-NO LIST), με την παρουσία πλαγκτονικών κυττάρων *L. monocytogenes* (VRBGA -ListP) και με την παρουσία κυττάρων *L. monocytogenes* που προήλθαν από βιουμενίο (VRBGA-ListB). Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων και οι μπάρες σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση.

Παρατηρούμαι ότι τα κύτταρα των Enterobacteriaceae, είτε απουσία *L. monocytogenes* είτε με την παρουσία κυττάρων βιουμενίου *L. monocytogenes* ή με την παρουσία πλαγκτονικών κυττάρων *L. monocytogenes* προσκολλήθηκαν το ίδιο ($p > 0.05$). Στη συνέχεια, απουσία *L. monocytogenes* παρατηρήθηκε ασθενέστερη αύξηση των

Enterobacteriaceae σε σχέση με τις άλλες δύο περιπτώσεις παρουσίας *L. monocytogenes* ($p \leq 0.05$), δεικνύοντας αντίστροφο ανταγωνισμό με αυτό που παρατηρήθηκε με την ανάπτυξη βιουμενίου *Pseudomonas* (Διάγραμμα 3.2).

3.3.5 Αύξηση Οξυγαλακτικών

Στο διάγραμμα 3.5 παρατηρούμε την ανάπτυξη πληθυσμού βιουμενίου οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό μη-αποστειρωμένο ιχθυοζωμό στους 16°C, απουσία *L. monocytogenes* (MRS-NO LIST), με την παρουσία πλαγκτονικών κυττάρων *L. monocytogenes* (MRS-ListP) και με την παρουσία κυττάρων βιουμενίου *L. monocytogenes* (MRS-ListB).



Διάγραμμα 3.5: Ανάπτυξη βιουμενίου οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μη-αποστειρωμένο ιχθυοζωμό απουσία *L. monocytogenes* (MRS-NO LIST), με την παρουσία πλαγκτονικών κυττάρων *L. monocytogenes* (MRS-ListP) και με την παρουσία κυττάρων *L. monocytogenes* που προήλθαν από βιουμένιο (MRS-ListB). Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων και οι μπάρες σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση.

Παρατηρούμαι ότι κατά το στάδιο προσκόλλησης, μεγαλύτερος πληθυσμός κυττάρων οξυγαλακτικών βακτηρίων προσκολλήθηκε στις μεταλλικές επιφάνειες απουσία *L. monocytogenes*. Πράγματι, μετά το στάδιο προσκόλλησης ο πληθυσμός στο βιουμένιο των κυττάρων οξυγαλακτικών βακτηρίων χωρίς την παρουσία *L.*

monocytogenes ήταν της τάξεως 1,7 log cfu/cm², σε αντίθεση με τα 1,5 log cfu/cm² παρουσία κυττάρων *L. monocytogenes* που είχαν προέλθει από βιουμένιο και με τα 1,3 log cfu/cm² πλακτονικών κυττάρων *L. monocytogenes* (p≤0.05). Στη συνέχεια παρατηρούμε αύξηση και στις τρεις περιπτώσεις, με μεγαλύτερη αύξηση στην περίπτωση απουσίας *L. monocytogenes* σε σχέση με την παρουσία πλακτονικών και κυττάρων βιουμενίου *L. monocytogenes*, (p≤0.05), δεικνύοντας ανταγωνισμό μεταξύ οξυγαλακτικών βακτηρίων και *L. monocytogenes*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα κύτταρα της *L. monocytogenes* προσκολλήθηκαν πολύ ικανοποιητικά έπειτα από δύο ώρες παραμονής τους σε εναιώρημα μαζί με την μεταλλική επιφάνεια. Τα κύτταρα της *L. monocytogenes* έχουν παρατηρηθεί ότι προσκολλούνται ακόμη και μέσα σε 3-5 δευτερόλεπτα σε τυχαίες περιοχές σε επιφάνειες αλουμινίου. Η προσκόλληση αρχικά είναι αραιή και ομοιόμορφη αλλά με το πέρασμα του χρόνου γίνεται πιο συμπαγής, δημιουργώντας τελικά μικροκοινωνίες (Hanna & Wang 2007). Η αρχική προσκόλληση εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ του κυτταρικού τοιχώματος και της υποκείμενης επιφάνειας. Τα κύτταρα που προσκολλώνται αρχικά δημιουργούν μια εξωκυττάρια πολυμερή ουσία στην οποία τα επόμενα κύτταρα αρχίζουν και προσκολλώνται και στη συνέχεια δημιουργούνται μικροκοινωνίες οι οποίες αυξάνονται προς τις περιοχές όπου τα θρεπτικά είναι άφθονα. Η αρχική προσκόλληση εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ του κυτταρικού τοιχώματος και της υποκείμενης επιφάνειας. Με το πέρασμα του χρόνου ολοένα το στρώμα πολυμερούς αρχίζει και μειώνεται εξαιτίας της χρήσης του ως πηγή ενέργειας από τους μικροοργανισμούς. Όσο το στρώμα μειώνεται ολόκληρο το βιοϋμένιο μπορεί να αποκολληθεί από την επιφάνεια (Hanna & Wang 2007).

Η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε θρεπτικό ζωμό ιχθύος στους 16°C σε μεταλλική επιφάνεια σε διάστημα έξι ημερών, έδειξε ότι σταδιακά ο πληθυσμός του μικροοργανισμού αυξήθηκε. Η γενική τάση είναι ότι υπάρχει αύξηση του πληθυσμού, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει μια αυξομείωση των τιμών. Από παρόμοια μελέτη των Jeong & Frank (1994) φαίνεται ότι η *L. monocytogenes* παρουσιάζει αυξομειώσεις στην ανάπτυξή της εντός διαστήματος δέκα ημερών σε βιουμένιο σε μεταλλική επιφάνεια με υλικό ανάπτυξης TSB. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζει μείωση του πληθυσμού της κατά την τέταρτη μέρα, ενώ τις υπόλοιπες μέρες ο πληθυσμός αυξάνεται και κυμαίνεται γύρω στο 3,5 logcfu/cm², παρόμοιο αποτέλεσμα με την παρούσα εργασία.

Όταν βιουμένιο *L. monocytogenes* αναπτύχθηκε από κύτταρα που είχαν ήδη αναπτύξει βιουμένιο, η προσκόλληση ήταν εντονότερη, πιθανών λόγω του ότι τα κύτταρα έχουν αναπτύξει είδη μηχανισμούς προσκόλλησης, σε σχέση με τα κύτταρα της *L. monocytogenes* που είχαν αναπτυχθεί πλανγκτονικά. Ο πληθυσμός μετά την προσκόλληση ήταν μεγαλύτερος κατά 0,5 log cfu/cm², αλλά όμως με μικρότερο ρυθμό

αύξησης όπου μετά το πέρας των 48 ωρών ο ρυθμός κυμαίνονταν στα ίδια περίπου επίπεδα, πιθανόν επειδή ο ρυθμός αύξησης να μην επηρεάζεται από το ιστορικό των κυττάρων. Αυτά είναι ζητήματα τα οποία θα μπορούσαν να μελετηθούν εκτενέστερα και σε μελλοντικές μελέτες.

Όταν η *L. monocytogenes* αναπτύχθηκε μόνη της, η προσκόλληση και ο τελικός πληθυσμός στο βιουμένιο ήταν μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό που βρέθηκε στη μικτή καλλιέργεια, που σημαίνει ότι η παρουσία άλλων μικροοργανισμών, επηρεάζει και την ικανότητα προσκόλλησης αλλά και τον ρυθμό αύξησης του πληθυσμού των κυττάρων του βιουμενίου. Η παρουσία και άλλων κυττάρων προφανώς ανταγωνίζονται τα κύτταρα *L. monocytogenes* για τις θέσεις προσκόλλησης, ενώ κατόπιν όλο και λιγότερος διαθέσιμος χώρος μένει στην επιφάνεια για την αύξηση των κυττάρων.

Σύμφωνα με την παρούσα έρευνα και τα κύτταρα των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών επηρεάστηκαν από την παρουσία της *L. monocytogenes*. Υπήρχε ανταγωνισμός στην ανάπτυξη βιουμενίου μεταξύ *Pseudomonas*, οξυγαλακτικών και υδροθειοπαραγωγικών βακτηρίων παρουσία *L. monocytogenes* που προέρχονταν είτε για πλανγκτονικά κύτταρα είτε για κύτταρα από είδη υπάρχον βιουμένιο. Το αντίθετο συνέβηκε στην περίπτωση των Enterobacteriaceae όπου ευνοήθηκαν παρουσία *L. monocytogenes*.

Έρευνες από μικτές καλλιέργειες της *L. monocytogenes* με διάφορους άλλους μικροοργανισμούς, έχουν δείξει ποικίλα αποτελέσματα για τη συμπεριφορά του οργανισμού, ορισμένα από τα οποία συμφωνούν με την παρούσα κατάσταση. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τους Renier *et al.* (2011) φάνηκε ότι η παρουσία κάποιων άλλων μικροοργανισμών όπως *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas fragi*, ήταν πολύ σημαντική για την ενίσχυση και τη δημιουργία του βιουμενίου της *L. monocytogenes*. Στην έρευνα των Ibusquiza *et al.* (2012) αναφέρεται ότι η παρουσία ορισμένων ειδών *Pseudomonas* και *Flavobacterium* αυξάνουν την προσκόλληση κυττάρων της *L. monocytogenes* σε επιφάνεια προκειμένου να σχηματιστεί βιοϋμένιο, σε άλλες περιπτώσεις η παρουσία των *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus xylosus* και *Enterococcus faecium* μειώνουν την προσκόλληση κυττάρων της *L. monocytogenes*, ενώ η παρουσία των *Pseudomonas putida* και *Staphylococcus aureus* δεν είχαν επίδραση στον αριθμό κυττάρων της *L. monocytogenes* που προσκολλήθηκαν.

Τα φαινόμενα ανταγωνισμού μικροοργανισμών σε βιουμένια θα πρέπει να μελετηθούν και σε μελλοντική εργασία, χρησιμοποιώντας και τεχνικές εκτίμησης

ιδιοτήτων των επιφανειών των κυττάρων όπως π.χ η υδροφοβικότητα κτλ., ενώ πρέπει να σημειωθεί ότι τέτοιες μελέτες αντιπροσωπεύουν περισσότερο τις πραγματικές συνθήκες όπου διαφορετικοί μικροοργανισμοί, είτε αλλοιωγόνοι, είτε παθογόνοι σχηματίζουν μικτά βιομείνια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοπτικά τα συμπεράσματα της διατριβής είναι τα εξής:

1. Τα πλακτονικά κύτταρα *L. monocytogenes* που είχαν προέλθει από ιχθυοζωμό προσκολλήθηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό, και αυξήθηκαν ταχύτερα στις μεταλλικές επιφάνειες σε σχέση με αυτά που προήλθαν από τον εργαστηριακό ζωμό TSB.
2. Τα κύτταρα *L. monocytogenes* που είχαν προέλθει από κύτταρα βιουμενίου προσκολλήθηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό, από τα πλακτονικά κύτταρα, ωστόσο η αύξησή τους δεν διέφερε.
3. Η παρουσία άλλων μικροοργανισμών επηρέασε αρνητικά ειδικά την προσκόλληση των κυττάρων *L. monocytogenes*.
4. Υπήρχαν μικροοργανισμοί όπου ευνοήθηκαν της απουσίας (*Pseudomonas*, οξυγαλακτικά) ενώ άλλοι (*Enterobacteriaceae*), της παρουσίας της *L. monocytogenes*.

Από τα 2 πρώτα συμπεράσματα συνάγεται ότι θα πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά τις μικροβιολογικές δοκιμές τα ενοφθαλμίσματα να παρασκευάζονται σε συνθήκες που να προσομοιάζουν όσο είναι δυνατό την πραγματικότητα.

Τα φαινόμενα ανταγωνισμού κατά την προσκόλληση και αύξηση των μικροοργανισμών στα βιουμένια υφίσταται και φαίνεται να είναι περίπλοκα. Αυτό σημαίνει ότι πειράματα με μεικτά βιουμένια είναι αναγκαία καθώς προσομοιάζουν περισσότερο τις πραγματικές συνθήκες στην βιομηχανία τροφίμων

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aarnisalo K., Lunde J., Korkeala H., Wirtanen G (2007), Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures, *Lebensmittel – Wissensch und -Technologie*, 40: 1041–1048
- Agle E. M. (2007), Biofilms in the food industry, In: *Biofilms in the food environment*, Blascheck P. H., Wang H., Agle E. M., Blackwell Publishing, Ames, USA, p 3-5
- Belessi A.C., Gounadaki S.A., Psomas N.A., Skadamis N.P. (2011), Efficiency of different sanitation methods of *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions, *International Journal of Food Microbiology*, 145: 46-52
- Chae M. and Schraft H. (2001), Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms, *Food Microbiology*, 18: 103-112
- Chae M. and Schraft H. (2000), Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains, *International Journal of Food Microbiology*, 62: 103–111
- Churchill R., Lee H., Hall C. (2006), Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food, *Journal of Microbiological Methods*, 64: 141–170
- Hanna E. S., Wang H. (2007), Biofilm development by *Listeria monocytogenes*, In: *Biofilms in the food environment*, Blascheck P. H., Wang H., Agle E. M., Blackwell Publishing, Ames, USA, p 47-50
- Hansen T. L. and Vogel F.B. (2011), Desiccation of adhering and biofilm *Listeria monocytogenes* on stainless steel: survival and transfer to salmon products, *International Journal of Food Microbiology*, 146: 88-93
- Harvey J., Keenan P.K., Gilmour A. (2007), Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains, *Food Microbiology*, 24: 380-392
- Hood K. S. and Zottola A. E. (1995), Biofilms in food processing, *Food Control*, 6: 9-18
- Huss H., Jørgensen L., Vogel B. (2000), Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods, *International Journal of Food Microbiology*, 62: 267–274
- Jeong D. and Frank J. (1994), Growth of *Listeria monocytogenes* at 21 C in biofilms with Micro-organisms Isolated from Meat and Dairy Processing Environments, *Lebensmittel – Wissensch und -Technologie*, 27: 415 – 424

- Kives J., Orgaz B., San Jose C. (2006), Polysaccharide differences between planktonic and biofilm associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52, *Colloides and surfaces B: Bionterfaces*, 52: 123 – 127
- Lorber B. (2007), Listeriosis, In: *Listeria monocytogenes* and host response, Goldfine H. and Shen H., Springer Science + Business Media LLC, USA, pp 13-15
- Lourenco A., Machado H., Brito L. (2011), Biofilms of *Listeria monocytogenes* Produced at 12°C either in Pure Culture or in Co-Culture *Pseudomonas aeruginosa* Showed Reduced Susceptibility to Sanitizers, *Journal of Food Science*, 76:M143–M148
- Low J. and Donachie W. (1997), A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis *The Veterinary Journal*, 153: 9-29
- Longhi C., Scoarughi G., Poggiali F., Cellini A., Carpentieri A., Seganti L., Pucci P., Amoresano A., Cocconcelli P., Artini M., Costerton J., Selan L. (2008), Protease treatment affects both invasion ability and biofilm formation in *Listeria monocytogenes*, *Microbial Pathogenesis*, 45: 45–52
- Norwood D. and Gilmour A. (1999), Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons, *Journal of Applied Microbiology*, 86: 576-582
- Orsi H. R., Bakker C. H., Wiedmann M. (2011), *Listeria monocytogenes* lineages : Genomics, evolution, ecology and phenotypic characteristics, *International Journal of Food Microbiology*, 306: 79-96
- Shi X. and Zhu X. (2009), Biofilm formation and food safety in food industries, *Trends in food Science & Technology*, 20: 407-413
- Simoes M., Simoes L., Vieira M. (2010), A review of current emergent biofilm control strategies, [LWT - Food Science and Technology](#), 43: 573–583
- Renier S., Hebraud M., Desvaux M. (2011), Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes* : an additional facet an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen, *Environmental Microbiology*, 13: 835-850
- Ibusquiza P., Herrera J., Vázquez-Sánchez D., Cabo M. (2012), Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida*, *Food Control*, 25: 202-210
- Jeong D. and Frank J. (1994), Growth of *Listeria monocytogenes* at 21 C in biofilms with Micro-organisms Isolated from Meat and Dairy Processing Environments, *Lebensmittel – Wissensch und -Technologie*, 27: 415 - 424

Χατζηδάκη.Μ (2015), Έλεγχος και διαχείριση της μόλυνσης των τροφίμων με *Listeria monocytogenes*. www.nestor.teipel.gr