

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΖΩΙΚΗΣ
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Συμπεριφορά του *Listeria monocytogenes* σε καταπονήσεις κατά την
επεξεργασία αλιευμάτων»**

ΤΣΑΡΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΒΟΛΟΣ, 2024

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF AGRICULTURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF ICHTHYOLOGY AND AQUATIC
ENVIRONMENT,
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION

INTERDEPARTMENTAL POSTGRADUATE PROGRAMME
“TECHNOLOGY, QUALITY AND SAFETY OF ANIMAL ORIGIN
FOODS”

POSTGRADUATE MASTER’S THESIS

“Behavior of *Listeria monocytogenes* under stresses imposed by seafood processing conditions.”

TSARA EVANGELIA

VOLOS, 2024

**«Συμπεριφορά της *Listeria monocytogenes* σε καταπονήσεις κατά την επεξεργασία
αλιευμάτων»**

**(Behavior of *Listeria monocytogenes* under stresses imposed by seafood processing
conditions)**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) Μποζιάρης Σ. Ιωάννης (M.Sc., Ph.D.),** Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων.**
- 2) Παρλαπάνη Φωτεινή (M.Sc., Ph.D.),** Επίκουρος Καθηγήτρια, Μοριακή Μικροβιολογία και Ποιότητα Αλιευτικών Προϊόντων - Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος.**
- 3) Κακαγιάννη Μυρσίνη (M.Sc., Ph.D.),** Επίκουρος Καθηγήτρια, Τεχνολογία, Ποιότητα και Ασφάλεια Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος.**

Στην οικογένεια μου...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς όλους εκείνους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, Καθηγητή Δρ Μποζιάρη Ιωάννη για την καθοδήγηση, την υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος και της συγγραφικής διαδικασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη συμβολή της κα. Κακαγιάννη Μυρσίνη και της κα. Παρλαπάνη Φωτεινής, των αξιότιμων μελών της εξεταστικής επιτροπής, των οποίων οι πολύτιμες γνώσεις συνέβαλαν καθοριστικά στη διαμόρφωση αυτής της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Δρ. Αναγνωστόπουλο Δημήτριο που μου προσέφερε απλόχερα τις γνώσεις και την εμπειρία του, καθώς επίσης και την υπόλοιπη επιστημονική ομάδα του εργαστηρίου αποτελούμενη από τους Τσιαρτσάφη Αθανάσιο και Καραμάνη Εβελίνα για την αμέριστη συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου, η οποία αποτέλεσε για μένα ανεκτίμητο στήριγμα και στην οποία οφείλω όλη την διαδρομή των σπουδών μου, μέχρι σήμερα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Listeria monocytogenes* είναι ένα τροφιμογενές παθογόνο βακτήριο το οποίο μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ασθένειες που αποτελούν απειλή για την δημόσια υγεία σε παγκόσμιο επίπεδο. Το παθογόνο αυτό μπορεί να απαντηθεί σε ένα μεγάλο εύρος τροφίμων κυρίως στα θαλασσινά προϊόντα και ειδικότερα στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (RTE), όντας ικανό να επιβιώσει στις διάφορες επεξεργασίες της βιομηχανίας τροφίμων, έχοντας μάλιστα την ικανότητα να σχηματίζει βιοϋμένια. Η λιστερίωση είναι μια επικίνδυνη τροφιμογενής ασθένεια που αποτελεί παγκόσμια απειλή για την δημόσια υγεία και προκαλείται από το *L. monocytogenes*. Τα τελευταία χρόνια, έχει αναφερθεί ένας σημαντικός αριθμός κρουσμάτων λιστερίωσης σε διάφορα τρόφιμα, και ιδιαίτερα στα αλιευτικά προϊόντα. Τα κρούσματα αυτά συνδέονται κυρίως με τη μη τήρηση των Ορθών Υγιεινών Πρακτικών (Good Hygiene Practices-GHP) των εργαζομένων, κατά τα διάφορα στάδια επεξεργασίας όπως αυτό του εκσπλαχνισμού και της φιλετοποίησης. Καθώς υπάρχουν πολλαπλές ενδείξεις ότι το *L. monocytogenes* είναι ικανό να προσαρμόζεται στην παρουσία διάφορων περιβαλλοντικών στρες, αυτό οδήγησε τους επιστήμονες να διερευνήσουν τους παράγοντες που μπορούν να ευνοήσουν την επιβίωση του παθογόνου κατά την επεξεργασία αλιευμάτων. Έτσι, η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία (ΜΔΕ) είχε ως στόχο την παρακολούθηση της τύχης του *L. monocytogenes* σε όξινες καταπονήσεις κατά την επεξεργασία αλιευμάτων. Αρχικά, έγινε διερεύνηση της πιθανής ανάπτυξης ανθεκτικότητας 6 στελεχών (κοκτέιλ) του είδους *L. monocytogenes* που είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε όξινο περιβάλλον (pH 3.7) σε θρεπτικό υλικό TSB με κιτρικό οξύ με στόχο την προσομοίωση των συνθήκων που επικρατούν κατά το μαρινάρισμα των ιχθύων σε βιομηχανική κλίμακα. Οι δύο πληθυσμοί, αυτός των καταπονημένων και αυτός των μη καταπονημένων κυττάρων,

συγκρίθηκαν και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα προσαρμοσμένα σε όξινο περιβάλλον κύτταρα του παθογόνου παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερους πληθυσμούς σε σύγκριση με τον πληθυσμό του μάρτυρα, πιθανώς επειδή ανέπτυξαν αμυντικούς μηχανισμούς στο όξινο περιβάλλον. Ειδικότερα, μετά από μία ελαφρά πτώση στις πρώτες 4 ώρες, οι πληθυσμοί έφτασαν σε ένα σταθερό επίπεδο της τάξης των $7,3 \log \text{ cfu/g}$ στις 24 ώρες, και στην συνέχεια με μικρό ρυθμό μείωσης έφτασαν περί τα $6,81 \log \text{ cfu/ml}$ στις 48 ώρες. Κατόπιν, ακολούθησε μελέτη της ανάπτυξης βιοϋμενίου του *L. monocytogenes* σε μεταλλικές πλάκες τύπου AISI-304, $3 * 1 * 0,1 \text{ cm}$ σε θρεπτικό μέσο (TSB) και σε $T=15^\circ\text{C}$, από μίγμα (cocktail) κυττάρων που προηγουμένως είχαν εκτεθεί σε ισχυρό χαμηλό pH (3,7). Τα προσαρμοσμένα σε οξύ κύτταρα κατάφεραν να δημιουργήσουν βιοϋμένιο στο TSB γρηγορότερα από τους μάρτυρες. Τέλος, για την καλύτερη προσομοίωση των συνθηκών σε βιομηχανική κλίμακα, πραγματοποιήθηκε το τρίτο πείραμα όπου εμβολιάστηκαν καταπονημένα σε οξύ (pH=3,7 για 24 ώρες) και μη καταπονημένα κύτταρα (κοκτέιλ 6 στελεχών) του *L. monocytogenes* σε πραγματικό φιλέτο μαριναρισμένης τσιπούρας με κιτρικό οξύ έχοντας τελικό pH 4,1 συσκευασμένο υπό συνθήκες κενού. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ in vitro μελέτης (υγρή καλλιέργεια) και πραγματικού δείγματος ιχθύος καθώς δεν υπήρχε η ίδια ανάπτυξη ανθεκτικότητας όπως στην υγρή καλλιέργεια. Πιθανώς η τύχη του *L. monocytogenes* επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση και συνύπαρξή του με πληθώρα άλλων μικροοργανισμών αποτελούν τη φυσική μικροχλωρίδα των ιχθύων. Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία παρέχει πληροφορίες για την καλύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε όξινες συνθήκες στην πλαγκτονική του μορφή αλλά και κατά την δημιουργία βιοϋμενίου. Ωστόσο, υπογραμμίζεται η ανάγκη για περεταίρω έρευνα α) στο ίδιο το τρόφιμο ώστε να

εξακριβωθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών και β) σε μοριακό επίπεδο για τον εντοπισμό των εκφραζόμενων γονιδίων που συνδέονται τόσο με την ανάπτυξη αυτών των μηχανισμών άμυνας όσο και με την δημιουργία του βιοϋμενίου.

Λέξεις κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, βιοϋμένια, όξινη καταπόνηση, ανθεκτικότητα σε όξινο περιβάλλον, παθογόνο βακτήριο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1	Χαρακτηριστικά του <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.2	Λιστερίωση.....	2
1.3	Απόκριση των μικροοργανισμών στα διάφορα περιβαλλοντικά στρες κατά την επεξεργασία και αποθήκευση τροφίμων.....	4
1.4	Απόκριση του <i>L. monocytogenes</i> σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (ATR).....	5
1.5	Χαρακτηριστικά Βιοϋμενίων.....	7
1.6	Σχηματισμός βιοϋμενίων.....	10
1.7	Ανθεκτικότητα βιοϋμενίων του <i>L. monocytogenes</i>	12
1.8	Έλεγχος των βιοϋμενίων του <i>L. monocytogenes</i>	13
1.9	Μαριναρισμένη τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>).....	15
1.10	Σκοπός.....	16
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
2.1	Πειραματική διαδικασία.....	18
2.2	Προετοιμασία στελεχών.....	18
2.3	Προετοιμασία θρεπτικών υλικών.....	19
2.3.1	Tryptic Soy Agar (TSA).....	20
2.3.2	Cetrimide-Fucidin-Cephaloridine Agar (CFC).....	20
2.3.3	Iron Agar (IA) κατά Lyngby.....	20
2.3.4	Mann Rogosa Sharpe Agar (MRS Agar) - Οξυγαλακτικά βακτήρια.....	20
2.3.5	Oxford Agar.....	20
2.3.6	Tryptic Soy Agar supplemented with Yeast Extract (0,6% w/v)-TSYE Agar.....	21
2.3.7	Tryptic Soy Agar supplemented with Yeast Extract (0,6% w/v) and NaCl (5% w/v)-TSYE Agar with NaCl.....	21
2.3.8	Tryptic Soy Broth με προσθήκη κιτρικού οξέος - TSB.....	22
2.3.9	MRD (Maximum Recovery Diluent 0.1 % w/v πεπτόνη και 0.85 % w/v NaCl) 22	
2.4	Απόκριση πλαγκτονικών κυττάρων του <i>L. monocytogenes</i> σε όξινες συνθήκες (1 ^ο πείραμα).....	22
2.4.1	Απαρίθμηση Μικροβιακού Πληθυσμού.....	23
2.5	Ανάπτυξη biofilm από κύτταρα του <i>L. monocytogenes</i> προσαρμοσμένα σε οξύ (2 ^ο πείραμα).....	24
2.5.1	Προετοιμασία για τον σχηματισμό βιοϋμενίων του <i>L. monocytogenes</i>	26
2.5.2	Διαδικασία προσκόλλησης κυττάρων.....	27
2.5.3	Απαρίθμηση πληθυσμού βιοϋμενίου.....	28

2.6	Απόκριση πλαγκτονικών κυττάρων του <i>L. monocytogenes</i> σε μαριναρισμένο φιλέτο τσιπούρας (3 ^ο πείραμα)	29
2.6.1	Προετοιμασία φιλέτων	29
2.6.2	Εμβολιασμός κυττάρων <i>L. monocytogenes</i> σε φιλέτα τσιπούρας	30
2.6.3	Απαρίθμηση των μικροβιακών πληθυσμών των δειγμάτων.....	30
2.7	Στατιστική ανάλυση.....	31
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
3.1	Απόκριση πλαγκτονικών κυττάρων του <i>L. monocytogenes</i> σε όξινες συνθήκες.....	32
3.2	Ανάπτυξη biofilm από κύτταρα του <i>L. monocytogenes</i> προσαρμοσμένα σε οξύ	35
3.3	Απόκριση πλαγκτονικών κυττάρων του <i>L. monocytogenes</i> σε μαριναρισμένο φιλέτο τσιπούρας (3 ^ο πείραμα)	37
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
4.1	Απόκριση πλαγκτονικών κυττάρων του <i>L. monocytogenes</i> σε όξινες συνθήκες.....	42
4.2	Ανάπτυξη biofilm από κύτταρα του <i>L. monocytogenes</i> προσαρμοσμένα σε οξύ	44
4.3	Απόκριση πλαγκτονικών κυττάρων του <i>L. monocytogenes</i> σε μαριναρισμένο φιλέτο τσιπούρας.....	46
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	50
	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	52
	ABSTRACT	62

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Χαρακτηριστικά του *Listeria monocytogenes*

Το *L. monocytogenes* είναι ένα θετικό κατά Gram προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, ραβδόμορφο (βάκιλος), κινητό (με τη βοήθεια μαστίγιων) και δεν έχει την ικανότητα να σχηματίζει σπόρια (Carpentier & Cerf, 2011; Seeliger, et al., 1984a). Το γένος *Listeria* αποτελείται από 20 αναγνωρισμένα είδη (*L. monocytogenes* (Pirie, 1940), *L. innocua* (Seeliger, et al., 1984a), *L. welshimer*, *L. seeligeri* (Rocourt & Grimont, 1983), *L. ivanovii* (Seeliger, et al., 1984b), *L. marthii* (Graves et al., 2010), *L. grayi* (Rocourt et al., 1992), *L. rocourtiae* (Leclercq et al., 2010), *L. fleischmannii* (den Bakker et al., 2013), *L. weihenstephanensis* (Lang Halter et al., 2013), *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis* (den Bakker et al., 2014), *L. booriae*, *L. newyorkensis* (Weller et al., 2015), *L. costaricensis* (Núñez-Montero et al., 2018), *L. goaensis* (Doijad et al., 2018), και το είδος *L. thailandensis* sp. nov. (Leclercq et al., 2019). Ωστόσο, μόνο τα είδη *L. monocytogenes* και *L. innocua* είναι παθογόνα, με το πρώτο να μπορεί να προκαλέσει τροφικές δηλητηριάσεις στον άνθρωπο (Schlech et al., 1983).

Το *L. monocytogenes* είναι ψυχρότροφος μικροοργανισμός, έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 1 έως 50°C με ιδανική θερμοκρασία τους 30 - 37°C (Farber & Peterkin, 1991). Θερμοκρασίες άνω των 77°C αδρανοποιούν τον μικροοργανισμό, επομένως είναι αρκετά σημαντικό να διατηρηθεί η ασφάλεια των τροφίμων από τυχόν επιμόλυνση του μικροοργανισμού μετά το στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας. Επιπλέον, μπορεί και αναπτύσσεται σε υψηλή αλατότητα ή/και χαμηλό pH, κάτι που το καθιστά επικίνδυνο για την ασφάλεια τροφίμων. Όσον αφορά τα όρια ανάπτυξης για το pH είναι μεταξύ 4,1-9,6, με ιδανικό το 6-7 και για την αλατότητα κάτω

από 12 %. Οι συνθήκες αυτές συνήθως αναστέλλουν την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων (Carpentier & Cerf, 2011).

Το *L. monocytogenes* είναι ευρύτατα διαδεδομένο στη φύση και απαντάται στα ζώα (αποίκιση εντέρου) στα φυτά, στο έδαφος, στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα, ωστόσο η κύρια αιτία κατάποσης του παθογόνου είναι από επιμολυσμένα τρόφιμα όπως στο γάλα, στα τυριά, ψάρια και κρεατικά, καθώς και σε έτοιμα φαγητά προς κατανάλωση (Chae & Schraft, 2000; Strawn et al., 2013). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο μικροοργανισμός αυτός έχει την δυνατότητα να αναπτύσσεται και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες όπως αυτές του ψυγείου, επομένως το συγκεκριμένο βακτήριο εντοπίζεται αρκετά συχνά στα θαλασσινά προϊόντα, ιδίως σε ψάρια (Harvey et al., 2007). Συγκεκριμένα, μπορεί να βρεθεί σε εργοστάσια επεξεργασίας ιχθυηρών, κυρίως κατά τη διαδικασία καπνίσματος των προϊόντων, όπως καπνιστός σολομός, αλλά και σε ωμά ψάρια και γαρίδες (Harvey et al., 2007). Επίσης, το εντοπίζεται σε τρόφιμα που προσφέρονται σε *delicatessen* και σε μπουφέ.

1.2 Λιστερίωση

Το *L. monocytogenes* προκαλεί την Λιστερίωση, μια σοβαρή ασθένεια που προκαλείται από την κατανάλωση επιμολυσμένων τροφίμων και διακρίνεται από υψηλά ποσοστά θνητότητας σε ορισμένες ευαίσθητες ομάδες πληθυσμού, όπως έγκυες γυναίκες, νεογνά, ηλικιωμένους και άτομα με ασθένειες του ανοσοποιητικού συστήματος (Carpentier & Cerf, 2011; Poimenidou et al., 2016). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό, αδυναμία, μυϊκούς πόνους και γαστρεντερίτιδα. Σε σοβαρές περιπτώσεις προκαλεί σοβαρές επιπλοκές, όπως βακτηριαιμία και μηνιγγοεγκεφαλίτιδα. Η ασθένεια αυτή συνήθως προκαλείται στους ανθρώπους από την κατανάλωση του *L. monocytogenes* μέσω των τροφίμων. Εντούτοις, υπάρχουν και άλλοι τρόποι μετάδοσης,

όπως η κατακόρυφη μετάδοση (από την μητέρα στο παιδί), η ζωνοσογόνος μετάδοση (από την επαφή των ζώων με τον άνθρωπο) και η νοσοκομειακή μετάδοση (Low & Donachie, 1997). Αν και η ύπαρξη του μικροοργανισμού είχε γίνει γνωστή από τις αρχές 1920, η επίδραση του στον άνθρωπο αναγνωρίστηκε την δεκαετία του '80 εξαιτίας διάφορων επεισοδίων λιστερίωσης στη Βόρεια Αμερική (Harvey et al., 2007). Η απομόνωση και η ερευνητική μελέτη του *L. monocytogenes* από κλινικές πηγές και τρόφιμα, έδειξε ότι αυτός ο μικροοργανισμός έχει τη δυνατότητα να προσκολλάται σε επιφάνειες στις μονάδες επεξεργασίας τροφίμων, έχοντας ως αποτέλεσμα στη μόλυνση των τροφίμων που υποβάλλονται σε επεξεργασία στις εν λόγω μονάδες (Harvey & Gilmour, 1992). Το 2008 υπήρξε μια σημαντική επιδημία της νόσου στον Καναδά που είχε ως αποτέλεσμα την ανάκληση σημαντικής ποσότητας τροφίμων ενώ πιο πρόσφατα, η συχνότητα των μεμονομένων κρουσμάτων αυξήθηκε για άλλη μια φορά στην Ευρώπη (Cairns & Payne, 2009; Conly & Johnston, 2008; Goulet et al., 2008). Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη έκθεση του EFSA για το έτος 2022 υπήρξαν 2.738 επιβεβαιωμένα κρούσματα της νόσου σε ανθρώπους, αύξηση έως και 15,9% σε σχέση με το 2021. Το *L. monocytogenes* αποδείχθηκε να είναι η αιτία σε 17 ισχυρά αποδεδειγμένες περιπτώσεις και σε 18 ασθενώς αποδεδειγμένες περιπτώσεις τροφογενούς μόλυνσης. Συνολικά, 296 άτομα σε όλη την Ευρωπαϊκή Ένωση προσβλήθηκαν, τα 242 περιστατικά από αυτά χρειάστηκαν νοσηλεία ενώ οι 28 πέθαναν. Από τις ισχυρά 17 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις λιστερίωσης οι 5 συνδέθηκαν με κρέας και προϊόντα κρέατος, οι 4 με αλιευτικά προϊόντα και οι 2 με γαλακτοκομικά προϊόντα (“The European Union One Health 2022 Zoonoses Report,” 2023). Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ) αριθμ. 2073/2005, τα μικροβιολογικά κριτήρια ασφάλειας για τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* στην κατηγορία τροφίμων έτοιμα για κατανάλωση ικανά να

υποστηρίζουν την ανάπτυξη του και είναι διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς πρέπει να είναι <100 CFU/g καθ' όλη τη διάρκεια του εμπορικού χρόνου ζωής του τροφίμου ή απουσία σε 25g του προϊόντος πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης τροφίμων που το παρήγαγε.

1.3 Απόκριση των μικροοργανισμών στα διάφορα περιβαλλοντικά στρες κατά την επεξεργασία και αποθήκευση τροφίμων

Το περιβάλλον των τροφίμων χαρακτηρίζεται ως μία μορφή σύνθετων υποστρωμάτων, τα οποία είναι σχετικά στρεσογόνα για τα βακτήρια, καθώς μπορεί να χαρακτηρίζονται από χαμηλή ενεργότητα νερού, χαμηλή θερμοκρασία, χαμηλό pH ή από παρουσία άλλων χημικών ουσιών (Ferreira et al., 2014; NicAogáin & O'Byrne, 2016). Στις μέρες μας, υπάρχουν πολλές μέθοδοι συντήρησης που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή σταθερών και ασφαλών τροφίμων όπως η θέρμανση, η ψύξη, η κατάψυξη, η οξύνιση (pH), η ξήρανση, η αφυδάτωση, ζύμωση το κάπνισμα ή η αφαίρεση οξυγόνου (συσκευασία τροποποιημένη ατμόσφαιρα, κενό), η προσθήκη διάφορων αντιμικροβιακών ουσιών αλλά και πιο καινοτόμες μεθόδους συντήρησης όπως η υπερυψηλή πίεση και η μέθοδος της ακτινοβολίας (Ashie et al., 1996), έτσι ώστε να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών είτε με την παράταση της φάσης προσαρμογής ή με την μείωση του ρυθμού αύξησης ή και τα δύο (Bozaris et al., 2013). Ωστόσο, η ποιότητα ενός τροφίμου μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά όταν ένα εμπόδιο προσαρμόζεται σε επίπεδο που μπορεί να εμποδίσει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών καθώς ο χαρακτήρας του εμποδίου του θα πρέπει να είναι αρκετά ισχυρός ώστε να αποτραπεί η αύξησή τους. Επομένως, η παραγωγή των τροφίμων πραγματοποιείται πλέον με την χρήση και τον συνδυασμό τουλάχιστον 2-3 εμποδίων (Leistner, 1992).

Παραδείγματος χάριν, στο σαλάμι εφαρμόζεται χαμηλή aw, ζύμωση και η προσθήκη νιτρικών/νιτρωδών. Η εφαρμογή πολλών συνδυαστικών εμποδίων είναι υψίστης σημασίας για την βιομηχανία τροφίμων, καθώς εφαρμόζεται η χρήση πιο ήπιων εμποδίων που ωστόσο έχουν επαρκή αντιμικροβιακή δράση, χωρίς να διακυβεύεται η ποιότητα του προϊόντος (Jay, 2005).

Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, η παρατεταμένη παραμονή των παθογόνων μικροοργανισμών στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων ενδέχεται να συνδέεται με την ικανότητα τους να δημιουργούν βιοϋμένια ή να αναπτύσσουν μηχανισμούς προσαρμογής οι οποίοι τους παρέχουν προσαρμοστικότητα ώστε να αντιμετωπίζουν τις περιβαλλοντικές πιέσεις (Brooks & Flint, 2008; Chmielewski & Frank, 2003; Shi & Zhu, 2009; Wirtanen & Salo, 2016). Σήμερα, είναι πλέον γνωστό ότι τα τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια όπως το *L. monocytogenes* μπορούν να τραυματιστούν μετά από έκθεση σε διάφορες καταπονήσεις στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων, όπως ξήρανση, θέρμανση, όξινση, κατάψυξη, αλάτιση. Τα κύτταρα που έχουν υποστεί κάποιου είδους τραυματισμό μπορεί να ανιχνευθούν εξαιτίας της ευαισθησίας τους σε διάφορους επιλεκτικούς παράγοντες και μπορούν επίσης να επιδιορθώσουν τις κυτταρικές τους βλάβες (repair) τους εάν τοποθετηθούν σε μη στρεσογόνο περιβάλλον και να ανακάμψουν πλήρως (recovery) (Miller & Zachary, 2017). Εναλλακτικά, εάν η καταπόνηση διατηρείται, υπάρχει η πιθανότητα να εισέλθουν σε μία κατάσταση όπου δεν μπορούν να αυξηθούν (viable-but-non culturable – VBNC) και τελικά να καταλήξουν σε θάνατο (cell death) (Miller & Zachary, 2017).

1.4 Απόκριση του *L. monocytogenes* σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (ATR)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα παθογόνα βακτήρια που μπορεί να επιμολύνουν τα τρόφιμα συνήθως υπόκεινται σε στρες/καταπόνηση κατά την

επεξεργασία των τροφίμων, όπως για παράδειγμα στην τυροκομία τα παθογόνα που υπάρχουν στο νωπό γάλα υφίστανται μια σειρά στρες όπως η θερμότητα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου που μπορεί να προστεθεί στο νωπό γάλα, και οξύ που παράγεται από τις καλλιέργειες εκκίνησης (ζύμωση) (Ferreira et al., 2014; NicAogáin & O'Byrne, 2016). Παρόλα αυτά ένα φαινόμενο που ονομάζεται stress hardening, αναφέρει την αυξημένη αντίσταση των βακτηρίων σε θανατηφόρες συνθήκες μετά από προσαρμογή σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις, εξουδετερώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα των εμποδίων συντήρησης τροφίμων και θέτοντας σε κίνδυνο την ασφάλεια των τροφίμων (Lou & Yousef, 1997).

Ειδικότερα, οι μικροοργανισμοί ως απάντηση στις διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις έχουν αναπτύξει συστήματα μεταγωγής σήματος (Quorum Sensing), τα οποία ρυθμίζουν την συντονισμένη έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στους αμυντικούς μηχανισμούς των κυττάρων και τα καθιστά ανθεκτικά τόσο στο στρες στο οποίο υποβάλλονται όσο και σε άλλες περιβαλλοντικές πιέσεις (Abee & Wouters, 1999; Koutsoumanis et al., 2003). Για παράδειγμα, οι Lou & Yousef (1997) έδειξαν ότι η προσαρμογή του *L. monocytogenes* σε αιθανόλη, υπεροξειδίο του υδρογόνου, και οξύ αύξησε σημαντικά την αντίσταση αυτού του παθογόνου στην θερμότητα. Χαμηλοί ρυθμοί θέρμανσης που μιμούνται συνθήκες θερμικού σοκ αύξησαν την θερμοαντοχή του *L. monocytogenes*. Πιο συγκεκριμένα, παρουσίασε υψηλότερη θερμοανθεκτικότητα όταν θερμαινόταν σε λιγότερο από 58°C/min από ό,τι όταν θερμαινόταν σε μεγαλύτερο ρυθμό (Stephens et al., 1994).

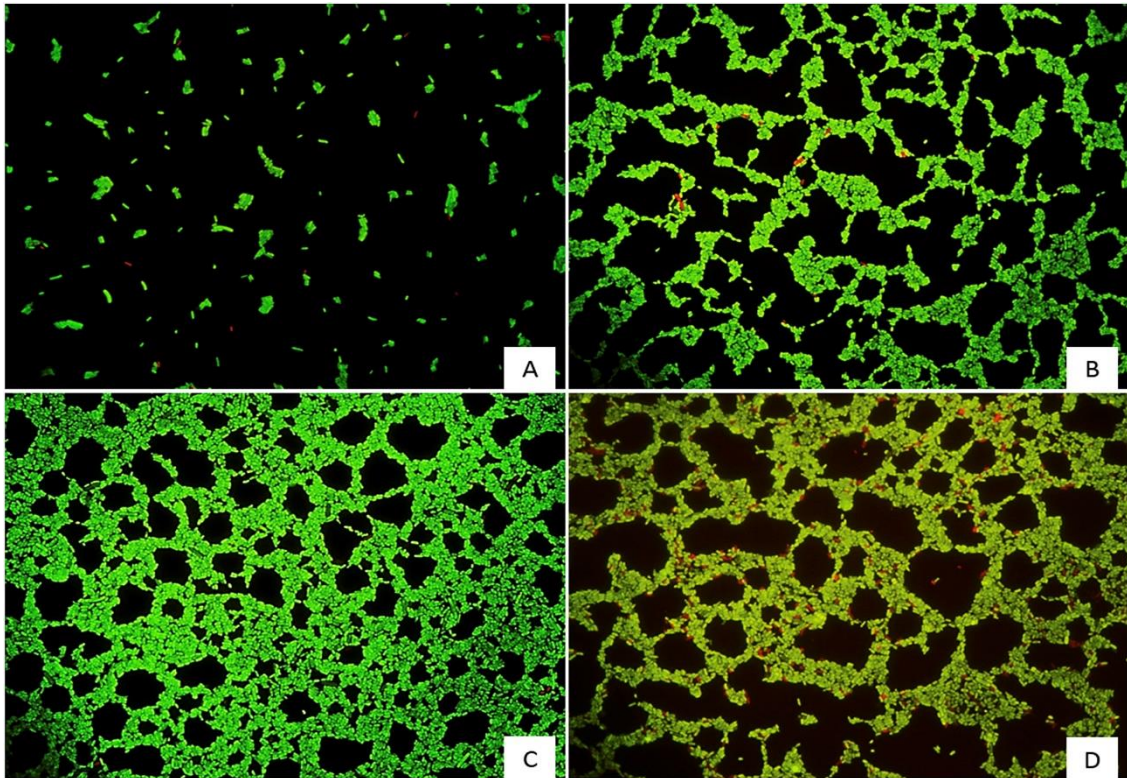
Κατά την οξύνιση των τροφίμων, οι μικροοργανισμοί έχουν την τάση να αυξάνουν το ενδοκυτταρικό τους pH μέσω της πρωτεϊνολύσεως, εξαιτίας του μηχανισμού της ομοιόστασης του pH (Hill et al., 2002). (Gahan & Hill, 1999; Hill et al., 2002).

Γενικότερα οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν ότι το *L. monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε pH έως και 4,4 (Parish & Higgins, 1989; Sorrells et al., 1989) ωστόσο, άλλες έρευνες επισημαίνουν ότι το παθογόνο επιβιώνει και σε πιο χαμηλές τιμές pH (Davis et al., 1996; O'driscoll et al., 1997). Επομένως, η βαθύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς του *L. monocytogenes* σε όξινο περιβάλλον αποτελεί την βάση για την αξιολόγηση και την τροποποίηση των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στην βιομηχανία τροφίμων αλλά και για την διασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων. Παρά την βελτίωση των πρακτικών υγιεινής στην παραγωγή τροφίμων, έχει διαπιστωθεί ότι παρόλο την αυστηρή τήρηση των μέτρων υγιεινής και της εφαρμογής ισχυρότερων τρόπων απολύμανσης για την μείωση της παρουσίας του *Listeria* στο ελάχιστο, ορισμένα στελέχη φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικά παραμένοντας για μεγάλο χρονικό διάστημα, στον εξοπλισμό και τους χώρους επεξεργασίας των τροφίμων (Chae & Schraft, 2000; Goulet, 2001). Πιθανώς ο σχηματισμός βιοϋμενίου από το *L. monocytogenes* στους χώρους επεξεργασίας και στις επιφάνειες μπορεί να αποτελεί σημαντικό παράγοντα επιβίωσης αυτών των στελεχών (Harvey et al., 2007).

1.5 Χαρακτηριστικά Βιοϋμενίων

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να υπάρξουν στο περιβάλλον είτε με την πλαγκτονική τους μορφή (ελεύθερα κύτταρα) είτε ως κοινότητες με την μορφή βιοϋμενίων (Gandhi & Chikindas, 2007). Ως βιοϋμένιο (ή biofilm) ορίζεται ως μια ομάδα βακτηρίων που έχουν αποικίσει μια επιφάνεια. Ωστόσο, δεν περιλαμβάνει μόνο τα βακτήρια αλλά και το εξωκυτταρικό υλικό που παράγεται στην επιφάνεια (Extracellular Polymeric Substance- EPS) από τα ίδια τα βακτήρια και μπορούν να παρουσιάσουν διαφορετικό φαινότυπο, όσον αφορά τον ρυθμό αύξησης και τη γονιδιακή τους έκφραση, σε σχέση με τις πλαγκτονικές μορφές τους (Hood & Zottola, 1995a).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα βιοϋμένια μπορούν να σχηματιστούν σε ένα μεγάλο εύρος επιφανειών όπως σε ιατρικό εξοπλισμό, σε σωλήνες συστήματος ύδρευσης, σε βιομηχανικό εξοπλισμό καθώς και σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων και συγκεκριμένα σε περιοχές αποθήκευσης ή σε επιφάνειες επεξεργασίας των τροφίμων αποτελούμενες από ανοξείδωτο ατσάλι (stainless steel) (Εικ. 1) (Donlan, 2002; Kumar & Anand, 1998). Τα βιοϋμένια παρουσιάζουν μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης, ποικιλία στα γονίδια που μεταγράφονται (Donlan, 2002), υψηλό ρυθμό μεταφοράς γονιδίων μέσω σύζευξης, αυξημένη παραγωγή εξωπολυσακχαρίτη και το πιο σημαντικό αυξημένη ανθεκτικότητα σε απολυμαντικά και αντιμικροβιακούς παράγοντες σε σχέση με τα πλαγκτονικά κύτταρα (Sutherland, 2001). Βέβαια, ο σχηματισμός τους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η ύπαρξη θρεπτικών συστατικών, η υγρασία, το είδος του μικροοργανισμού που δημιουργεί το βιοϋμένιο, η συνύπαρξή του με άλλους μικροοργανισμούς, αλλά και διάφορες άλλες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το pH, η θερμοκρασία, το διαλυμένο οξυγόνο και η αλατότητα (Meredith E. Agle, 2006).



Εικόνα 1. Αντιπροσωπευτικές εικόνες EFM βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* τα οποία αναπτύχθηκαν σε TSB στους 37°C σε αντικειμενοφόρο πλάκα και χρωματίστηκαν με CFDA (διοξείκη καρβοξυφθοροσκεΐνη, πράσινος φθορισμός και PI (ιώδιο προπίδιο, κόκκινος φθορισμός). Τα A, B, C και D είναι εικόνες 2D 24, 48, 72 και 96 ωρών αντίστοιχα που ελήφθησαν από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Kocot & Olszewska, 2017).

Στη βιομηχανία τροφίμων ο σχηματισμός βιοϋμενίου μπορεί να επηρεάσει τη μεταφορά θερμότητας στα τρόφιμα, την ροή τους εμφανίζοντας αυξημένη αντίσταση και επίσης να επιμολύνει τα τρόφιμα με ανεπιθύμητα μικρόβια και ουσίες επηρεάζοντας την ασφάλεια και την ποιότητά τους (Meredith E. Agle, 2006; Vanne et al., 1996). Η κύρια αιτία σχηματισμού τους και ανάπτυξης της ανθεκτικότητάς τους σε διάφορες συνθήκες στρες είναι η δημιουργία της εξωκυτταρικής πολυσακχαριτικής μεμβράνης (Bryers, 2008). Το 15% του όγκου αυτής της μήτρας (βιοϋμενίου) αποτελείται από τα κύτταρα

των βακτηρίων και το υπόλοιπο 85% αποτελείται από ένα στρώμα πολυμερούς στο οποίο ενσωματώνονται τα κύτταρα και δημιουργούν διάφορες δομές (Donlan & Costerton, 2002). Πιο συγκεκριμένα, μέσω των κενών που υπάρχουν ανάμεσα στις δομές εισέρχεται νερό, το οποίο μεταφέρει διάφορα χρήσιμα συστατικά, όπως θρεπτικές ουσίες και διαλυμένο οξυγόνο προσφέροντας στο βιοϋμένιο ιδιότητες όπως η ελαστικότητα και η πυκνότητα (Meredith E. Agle, 2006).

Όσο πιο ώριμο είναι ένα βιοϋμένιο τόσο πιο οργανωμένο και δομημένο είναι έχοντας κανάλια νερού παντού έτσι ώστε να ευνοούν την διαδικασία ανταλλαγής θρεπτικών και απέκκρισης άχρηστων ουσιών (Shi & Zhu, 2009). Οι κοινότητες αυτές των μικροοργανισμών πιθανώς να διασπαστούν κάποια στιγμή αποτελώντας την αρχή για τον σχηματισμό ενός νέου βιοϋμενίου.

1.6 Σχηματισμός βιοϋμενίων

Η δημιουργία των βιοϋμενίων αποτελεί μια δυναμική διαδικασία που περιλαμβάνει μια σειρά βημάτων. Το αρχικό βήμα για την δημιουργία των βιοϋμενίων είναι η μεταφορά και η προσκόλληση των μικροοργανισμών στην επιφάνεια. Αυτή η διαδικασία μπορεί να είναι ενεργητική ή παθητική και εξαρτάται από την κινητικότητα των βακτηρίων ή από την δυναμική των ρευστών του περιβάλλοντος (Gandhi & Chikindas, 2007). Εκτός από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της κυτταρικής επιφάνειας που παίζουν σημαντικό ρόλο για την προσκόλληση των κυττάρων, εξίσου σημαντική είναι και η διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών στο περιβάλλον για την προσκόλληση αλλά και για την ανάπτυξη των ίδιων των βακτηρίων (Donlan, 2002). Η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια γίνεται κυρίως σε δύο στάδια: ένα αναστρέψιμο ακολουθούμενο από ένα μη αναστρέψιμο. Στο πρώτο στάδιο, μεταξύ των κυττάρων και της επιφάνειας αναπτύσσονται ασθενείς δυνάμεις και γι' αυτόν τον λόγο το στάδιο αυτό είναι

αναστρέψιμο, δηλαδή τα βακτήρια μπορούν να μετακινηθούν με απλό πλύσιμο (Marshall et al., 1971). Μόλις τα βακτήρια πλησιάσουν σε απόσταση μεγαλύτερη των 50nm, λαμβάνουν χώρα μεγάλου εύρους δυνάμεις όπως οι δυνάμεις Van der Waals, ενώ σε αποστάσεις 2 – 10nm ασκούνται οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις και για αποστάσεις μεταξύ 0,5 – 2nm λαμβάνουν χώρα οι υδρόφοβες δυνάμεις (Lasa & Penadés, 2006). Το επόμενο κρίσιμο στάδιο είναι η μη αναστρέψιμη προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια για την ανάπτυξη του βιοϋμενίου. Σε αυτό το στάδιο τα βακτήρια αρχίζουν να προσκολλώνται μεταξύ τους παράγοντας εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS), πρωτεΐνες και λιποπολυσακχαρίτες που επιτρέπουν την μη αντιστρεπτή προσκόλληση τους στην επιφάνεια και η απομάκρυνση των βακτηρίων απαιτεί πολύ ισχυρές δυνάμεις όπως το ξύσιμο (Lappin-Scott & Costerton, 1989). Το εξωπολυσακχαρητικό στρώμα αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη δέσμευση θρεπτικών συστατικών αλλά και για την αντίσταση των κυττάρων στις διάφορες καταπονήσεις (στρες) (Kumar & Anand, 1998).

Στην συνέχεια, τα ισχυρά προσκολλημένα βακτήρια αναπτύσσονται και διαιρούνται χρησιμοποιώντας τα θρεπτικά συστατικά που υπάρχουν στο περιβάλλον, έχοντας ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μικροαποικιών, οι οποίες μεγεθύνονται και ενώνονται, παράγοντας ταυτόχρονα EPS, για να σχηματίσουν ένα στρώμα κυττάρων που καλύπτει την επιφάνεια (Kumar & Anand, 1998). Η συνεχής προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα και η επακόλουθη ανάπτυξή του μαζί με την παραγωγή EPS οδηγεί στον σχηματισμό ενός βιοϋμενίου. Οι μικροοργανισμοί μέσα στο βιοϋμένιο δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένοι και αναπτύσσονται στις μικροαποικίες που περικλείονται από την μήτρα, η οποία αποτελεί ένα δίκτυο με διαύλους επιτρέποντας την κυκλοφορία υγρών και εξασφαλίζοντας την διοχέτευση θρεπτικών ουσιών αλλά και την αποβολή των άχρηστων ουσιών (Kumar & Anand, 1998).

Η σύσταση των βιοϋμενίων μπορεί να είναι ετερογενής και να αποτελείται από όχι μόνο από ένα είδος μικροοργανισμού αλλά από περισσότερα. Σε αυτήν την περίπτωση, ο σχηματισμός των βιοϋμενίων εξαρτάται και από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών των μικροοργανισμών (Donlan, 2002). Ο σχηματισμός βιοϋμενίου είναι μία αρκετά αργή διαδικασία και φτάνει μερικά χιλιοστά σε πάχος σε λίγες μέρες ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας (Kumar & Anand, 1998). Ο πληθυσμός του *L. monocytogenes* που σχηματίζει βιοϋμένια δεν ξεπερνά τα 10^4 - 10^7 CFU/cm² (Gram et al., 2007).

1.7 Ανθεκτικότητα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*

Η οργάνωση των κυττάρων σε δομές όπως τα βιοϋμένια, τους προσδίδει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στα διάφορα περιβαλλοντικά στρες που υφίστανται κατά την επεξεργασία τροφίμων, αλλά και αντοχή στα διάφορα απολυμαντικά κατά την διάρκεια καθαρισμού και εξυγίανσης του εξοπλισμού (Meyer, 2003). Η παραγωγή των εξωπολυσακχαριτικών ουσιών έχει επιβεβαιωθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας και γι' αυτόν τον λόγο τα προσκολλημένα κύτταρα των βιοϋμενίων είναι ανθεκτικότερα σε σχέση με τα πλαγκτονικά (Norwood & Gilmour, 1999; Simões et al., 2010).

Η αντίσταση του βιοϋμενίου του *L. monocytogenes* στις διάφορες καταπονήσεις επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες της επιφάνειας, από την θερμοκρασία, από το μέσο ανάπτυξης, από τα χαρακτηριστικά των κυττάρων και από την παρουσία τροφής και ύπαρξης άλλων μικροοργανισμών (Gram et al., 2007). Αν και αρκετά τρόφιμα υφίστανται μια ήπια θερμική επεξεργασία, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν ο κίνδυνος επιμόλυνσης με κύτταρα βιοϋμενίων στο τελικό προϊόν. Τα κύτταρα του *L. monocytogenes* προερχόμενα από βιοϋμένια είναι ικανά να παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στον εξοπλισμό και στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων, παρουσιάζοντας υψηλότερη αντοχή σε αντιβιοτικές ουσίες και

στα εμπόδια που χρησιμοποιεί η βιομηχανία τροφίμων (Giaouris et al., 2015). Οι Ekonomou και Boziaris (2024) μελέτησαν την συμπεριφορά πλαγκτονικών και προσκολλημένων κυττάρων (βιοϋμενίου) του *L. monocytogenes* έπειτα από θερμική καταπόνηση αποδεικνύοντας ότι τα κύτταρα βιοϋμενίου παρουσίασαν υψηλότερη ανθεκτικότητα στην αντιμικροβιακή δράση του υγρού καπνού L9 (0,50%) σε σύγκριση με τα πλαγκτονικά κύτταρα. Οι Giaouris et al. (2014) μελέτησαν κύτταρα προσαρμοσμένα σε οξύ, τα οποία αφέθηκαν να προσκολληθούν σε μεταλλικές επιφάνειες και τελικά απολυμάνθηκαν με αντιμικροβιακές ουσίες όπως το γαλακτικό οξύ και αιθέριο έλαιο φρέσκων φυτικών *S. thymbra*. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι οι αντιμικροβιακές ουσίες έδειξαν επαρκή βακτηριοκτόνο δράση.

Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με την συμπεριφορά των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* μετά από έκθεση σε διάφορες καταπονήσεις, όπως η οξύνιση. Για αυτόν τον λόγο, η κατανόηση της συμπεριφοράς του *L. monocytogenes* μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη βελτιωμένων πρωτοκόλλων και πρακτικών για την ασφάλεια των μαριναρισμένων προϊόντων σε μεγαλύτερη κλίμακα. Επιπλέον οι κύριες φυσιολογικές διαφορές μεταξύ πλαγκτονικών κυττάρων και κυττάρων προερχόμενα από βιοϋμένια του *L. monocytogenes* θα πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη, για τον αποτελεσματικό έλεγχο του *L. monocytogenes* κατά την επεξεργασία μαριναρισμένων ψαριών.

1.8 Έλεγχος των βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*

Τα βιοϋμένια του *L. monocytogenes* που σχηματίζονται στους εξοπλισμούς της βιομηχανίας τροφίμων οδηγούν σε σοβαρά προβλήματα υγιεινής και σε οικονομικές απώλειες εξαιτίας της επιμόλυνσης των τροφίμων από αυτά (Meyer, 2003). Επιπλέον όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα τα βιοϋμένια φαίνεται να έχουν

μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε απολυμαντικά και σε αντιμικροβιακούς παράγοντες σε σύγκριση με τα πλαγκτονικά κύτταρα, καθιστώντας την εξάλειψή τους από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων μια μεγάλη πρόκληση (Norwood & Gilmour, 1999; Shi & Zhu, 2009). Συνεπώς, η πρόληψη και η αντιμετώπιση των βιοϋμενίων έχει μεγάλη σημασία για την βιομηχανία τροφίμων.

Οι κύριες στρατηγικές που ακολουθούνται είναι οι φυσικές, οι χημικές και οι βιολογικές μέθοδοι. Οι νεότερες φυσικές μέθοδοι που εφαρμόζονται για την εξάλειψη των βιοϋμενίων περιέχουν τα εξαιρετικά υψηλά μαγνητικά πεδία, υπερήχους, ηλεκτρικά πεδία υψηλών παλμών, χρήση ηλεκτρικό ρεύματος με αντιβιοτικά και ιονίζουσα ακτινοβολία (Hood & Zottola, 1995b; Van Houdt & Michiels, 2010). Οι χημικές μεθόδους περιλαμβάνουν τα χημικά απολυμαντικά όπως είναι το υπεροξικό οξύ, το υποχλωριώδες νάτριο, το τεταρτοταγές αμμώνιο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Hood & Zottola, 1995b; Simões et al., 2010). Τέλος, στις βιολογικές μεθόδους περιλαμβάνονται η χρήση απορρυπαντικών με ένζυμα, η χρήση άλλων μικροοργανισμών που αλληλοεπιδρούν ανταγωνιστικά με το παθογόνο (Simões et al., 2010), ή ακόμη και η χρήση βακτηριοφάγων για την λύση των κυττάρων (Viazis et al., 2011). Βέβαια, η αποδοτικότητα όλων των παραπάνω μέσων επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν όπως το pH, τη θερμοκρασία, τον χρόνο έκθεσης και την συγκέντρωση της κατάλληλης ουσίας, καθώς και από την «ηλικία» του βιοϋμενίου (Nadell et al., 2009; Van Houdt & Michiels, 2010). Επομένως, το πιο σημαντικό μέτρο για την αντιμετώπιση των βιοϋμενίων είναι η πρόληψη, δηλαδή η τήρηση των κανόνων υγιεινής και η συνεχής απολύμανση των επιφανειών επεξεργασίας τροφίμων ώστε να αποφευχθεί η προσκόλληση των παθογόνων.

1.9 Μαριναρισμένη τσιπούρα (*Sparus aurata*)

Τα ψάρια και γενικότερα τα θαλασσινά προϊόντα διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην ανθρώπινη διατροφή, κυρίως λόγω της υψηλής τους διατροφικής αξίας καθώς είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, βιταμίνες, μέταλλα και ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Lund, 2013). Τις τελευταίες δύο δεκαετίες παρατηρείται μια ευρύτερη τάση προς την υιοθέτηση υγιεινών διατροφικών προτύπων, η οποία έχει οδηγήσει στην αύξηση της κατανάλωσης και της ζήτησης τους, οδηγώντας τον τομέα της υδατοκαλλιέργειας να αυξηθεί απότομα για να καλύψει την ανάγκη αυτή (FAO, 2020). Η ευρωπαϊκή τσιπούρα (*Sparus aurata*) αποτελεί ένα από τα πιο δημοφιλή εκτρεφόμενα ψάρια παγκοσμίως καθώς είναι ένα πολύτιμο θαλασσινό προϊόν και αναπόσπαστο κομμάτι της μεσογειακής διατροφής (FAO, 2020).

Ωστόσο, τα αλιευτικά προϊόντα είναι από τα πιο ευπαθή προϊόντα, λόγω της έντονης μικροβιακής δραστηριότητας και πιο συγκεκριμένα εξαιτίας του μεταβολισμού των λεγόμενων Ειδικών Αλλοιογόνων Μικροοργανισμών (EAM) (Parlapani et al., 2013). Επομένως, τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά υποβαθμίζονται σχετικά γρήγορα κατά την διάρκεια αποθήκευσης τους σε σχέση με τα υπόλοιπα τρόφιμα (Ashie et al., 1996). Λαμβάνοντας υπόψιν την υψηλή ευαισθησία των αλιευτικών προϊόντων, έχουν αναπτυχθεί πιο στοχευμένες στρατηγικές για τον έλεγχο και την πορεία αλλοίωσης των ιχθύων με σκοπό την παράταση του εμπορικού χρόνου ζωής και την διασφάλιση της ποιότητάς τους. Αντίθετα, έντονες επεξεργασίες όπως η θέρμανση ή η κατάψυξη που χρησιμοποιούνται συνήθως αποκλείουν την διάθεση στην αγορά φρέσκων προϊόντων. Γι' αυτό, η βιομηχανία τροφίμων έχει κατευθυνθεί προς πιο ήπιες μεθόδους συντήρησης παράγοντας ελαφρώς επεξεργασμένα προϊόντα (minimally processed) και έτοιμα προς κατανάλωση (Ready To Eat), ώστε να ανταπεξέλθει στις απαιτήσεις του καταναλωτή. Τα

RTE προϊόντα παρασκευάζονται με την εφαρμογή κατάλληλων τεχνικών μεθόδων επεξεργασίας και συντήρησης και καταναλώνονται είτε απευθείας είτε με θέρμανση σε θερμοκρασία φαγητού (Huang & Hwang, 2012). Μεταξύ αυτών των προϊόντων που παρασκευάζονται με αυτόν τον τρόπο συγκαταλέγονται και τα μαριναρισμένα προϊόντα δηλαδή τα προϊόντα στα οποία έχει γίνει προσθήκη κάποιου οργανικού οξέος. Η μείωση του pH με την μέθοδο του μαριναρίσματος αποτελεί έναν άλλον τρόπο επιβράδυνσης της μικροβιακής ανάπτυξης αλλά και της ενζυμικής δραστηριότητας. Οι μαρινάδες είναι διαλύματα αλατιού λεμονιού ή ξυδιού και μπορούν επίσης να περιλαμβάνουν σάκχαρα, μπαχαρικά, λάδι και αρώματα (Kilinc & Cakli, 2005). Το κιτρικό οξύ είναι ένα ασθενές οργανικό οξύ που απαντάται σε φρούτα όπως τα λεμόνια, τα πορτοκάλια και τα γκρειπφρουτ. Αποτελεί φυσικό αντιοξειδωτικό και συντηρητικό. Ωστόσο, τα ελαφρώς επεξεργασμένα τρόφιμα στα οποία ανήκουν τα μαριναρισμένα είναι αρκετά επικίνδυνα για την πιθανή ανάπτυξη μηχανισμών αντοχής, προσδίδοντας ανθεκτικότητα στους μικροοργανισμούς.

1.10 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας ήταν να μελετήσει την πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε χαμηλό pH, προσομοιάζοντας όσον το δυνατόν καλύτερα τις συνθήκες που λαμβάνουν χώρα σε βιομηχανική κλίμακα κατά την επεξεργασία μαριναρισμένων αλιευτικών προϊόντων. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, πραγματοποιήθηκε η συστηματική ολοκλήρωση των επιμέρους στόχων που είναι:

A) Η μελέτη συμπεριφοράς και απόκρισης 6 στελεχών (cocktail) (πλαγκτονική μορφή) του *L. monocytogenes* σε όξινη καταπόνηση (ισχυρό χαμηλό pH) που είχαν προηγουμένως στρεσαριστεί στις ίδιες πειραματικές συνθήκες.

Β) Η παρακολούθηση της ανάπτυξης βιοϋμενίου του *L. monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες τύπου AISI-304, 3 * 1 * 0,1cm σε θρεπτικό μέσο (TSB), από κύτταρα που προηγουμένως είχαν στρεσαριστεί σε ισχυρό χαμηλό pH. Σε συνδυασμό με το α) επιτεύχθηκε και η μελέτη πιθανής διαφορετικής συμπεριφοράς κυττάρων σε διαφορετικό μέσο ανάπτυξης, όπως πλανγκτονική βακτηριακή ανάπτυξη και ανάπτυξη σε βιοϋμένιο.

Γ) Τέλος, μελετήθηκε επίσης η πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας κυττάρων του *L. monocytogenes* μίγματος 6 στελεχών (cocktail) που ενοφθαλμίστηκαν σε πραγματικό προϊόν (μαριναρισμένη τσιπούρα) αφού προηγουμένως είχαν στρεσαριστεί σε ισχυρό χαμηλό pH.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματική διαδικασία

Για την μελέτη της συμπεριφοράς του *L. monocytogenes* σε όξινη καταπόνηση, έχοντας ως στόχο την όσον δυνατόν καλύτερη προσομοίωση των συνθηκών που επικρατούν σε βιομηχανική κλίμακα, έλαβαν χώρα τρία ανεξάρτητα πειράματα.

A) Το πρώτο πείραμα αφορά την μελέτη πιθανής ανάπτυξης ανθεκτικότητας έξι διαφορετικών στελεχών του *L. monocytogenes* που χρησιμοποιήθηκαν σε μίγμα (cocktail) σε ισχυρό χαμηλό pH (3,7) και είχαν προηγουμένως εκτεθεί στις ίδιες πειραματικές συνθήκες.

B) Στο δεύτερο πείραμα μελετήθηκε η πιθανή ανάπτυξη βιοϋμενίου σε μεταλλικές επιφάνειες από κύτταρα έξι διαφορετικών στελεχών του *L. monocytogenes* τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε μίγμα (cocktail) και είχαν προέλθει από όξινη καταπόνηση. Πιο συγκεκριμένα κύτταρα του *L. monocytogenes* που είχαν εκτεθεί σε ισχυρό χαμηλό pH (3,7) και θεωρούνται στρεσαρισμένα, αναπτύχθηκαν σε εργαστηριακό θρεπτικό υγρό (Tryptone Soy Broth – TSB) που περιείχαν τις μεταλλικές πλάκες για την δημιουργία βιοϋμενίου.

Γ) Στο τελευταίο πείραμα μελετήθηκε η πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας έξι διαφορετικών στελεχών του *L. monocytogenes* (cocktail) σε μαριναρισμένη τσιπούρα (*Sparus aurata*) αφού είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε ισχυρό χαμηλό pH (3,7).

2.2 Προετοιμασία στελεχών

Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση έξι διαφορετικών στελεχών που ανήκουν στο είδος *L. monocytogenes*: L128, L129, L131, L133, L206 και L207, τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους -80°C σε μικροφιαλίδια τύπου “bead vials”. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι επιλέχθηκαν 6 διαφορετικά στελέχη *L. monocytogenes* για να

αντιπροσωπεύουν καλύτερα την γενετική παραλλαγή που είναι δυνητικά παρούσα στο συγκεκριμένο είδος παθογόνου χωρίς ωστόσο να υπάρχουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την επιμονή ή τον λοιμογόνο χαρακτήρα τους. Για την προετοιμασία των στελεχών, αρχικά τα στελέχη αναζωογονήθηκαν μεταφέροντας ένα bead ξεχωριστά για κάθε στέλεχος υπό ασηπτικές συνθήκες σε γυάλινους σωλήνες που περιλάμβαναν 10 ml αποστειρωμένου Tryptone Soy Broth (TSB) (Neogen Culture Media, Heywood, UK) και τοποθετούνταν στον επωαστικό θάλαμο για 24 ώρες στους 37 °C. Στην συνέχεια, τα βακτηριακά στελέχη συλλέγονταν με φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στις 1.879 g σε φυγόκεντρο (Nuve, Turkey) για 5 min. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 1 ml αλατούχου διαλύματος (0,85% w/v NaCl). Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε 2 φορές ώστε το ίζημα να επαναδιαλυτοποιηθεί με 1ml αποστειρωμένου διαλύματος αλατόνερου 0.85 % (w/v) NaCl. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται ώστε να απομακρυνθούν πιθανά υπολείμματα του θρεπτικού υλικού όπως σάκχαρα, πεπτίδια, αμινοξέα, άγαρ και να αποκτηθούν καθαρά βακτηριακά κύτταρα. Τέλος, γινόταν συλλογή όλων των στελεχών του *L. monocytogenes* σε ένα αποστειρωμένο γυάλινο φιαλίδιο το οποίο περιείχε διάλυμα 0.85 % (w/v) NaCl με σκοπό την δημιουργία του τελικού μίγματος (cocktail) με τελικό πληθυσμό 10^{7-8} CFU/mL. Με την διαδικασία της αραιώσης, το τελικό cocktail περιείχε όλα τα στελέχη στον ίδιο βακτηριακό πληθυσμό.

2.3 Προετοιμασία θρεπτικών υλικών

Τα θρεπτικά υλικά για την διεξαγωγή του πειράματος πάρθηκαν όλα από την εταιρία Neogen Culture Media, Heywood, UK.

2.3.1 Tryptic Soy Agar (TSA)

Το TSA (Tryptic Soy Agar) αποτελεί ένα στερεό θρεπτικό μέσο γενικής χρήσης και συστήνεται για χρήση σε ποιοτικές διαδικασίες και για την καλλιέργεια μικροοργανισμών. Η επώαση των μικροοργανισμών αυτού του θρεπτικού υλικού πραγματοποιείται στους 25°C για 48 ώρες.

2.3.2 Cetrimide-Fucidin-Cephaloridine Agar (CFC)

Το θρεπτικό μέσο (LAB108) *Pseudomonas Agar Base* περιέχει αντιβιοτικό το οποίο το καθιστά εκλεκτικό για *Pseudomonas* spp. Η επώαση των μικροοργανισμών αυτού του θρεπτικού υλικού πραγματοποιείται στους 25°C για 48 ώρες.

2.3.3 Iron Agar (IA) κατά Lyngby

Το Iron Agar Lyngby (IAL), συστήνεται για την εξακρίβωση των Gram εντερικών βακίλων που με την ζύμωσή τους παράγουν υδρόθειο (H₂S). Το συγκεκριμένο μέσο καλλιέργειας επιλέχθηκε όπως συνιστάται σε αρκετές μελέτες που έδειξαν αυξημένη ανάκτηση και ανάπτυξη βακτηρίων που σχετίζονται με θαλασσινά στο IAL σε σύγκριση με άλλα κοινά μέσα καλλιέργειας (Gram et al., 1987; Parlapani et al., 2013) Η επώαση των μικροοργανισμών αυτού του θρεπτικού υλικού πραγματοποιείται στους 25°C για 48 ώρες.

2.3.4 Mann Rogosa Sharpe Agar (MRS Agar) - Οξυγαλακτικά βακτήρια

Το MRS (*Lactobacillus MRS Agar*) συνιστάται για την ανάπτυξη όλων των *Lactobacillus* spp. Η επώαση των μικροοργανισμών αυτού του θρεπτικού υλικού πραγματοποιείται στους 25°C για 72 ώρες.

2.3.5 Oxford Agar

Το Oxford Agar είναι ένα εκλεκτικό μέσο καλλιέργειας που χρησιμοποιείται συνήθως για την ανίχνευση και την απομόνωση των ειδών *Listeria*, συμπεριλαμβανομένου του

παθογόνου *L. monocytogenes*. Η επώαση των μικροοργανισμών αυτού του θρεπτικού υλικού πραγματοποιείται στους 37°C για 24 ώρες.

2.3.6 Tryptic Soy Agar supplemented with Yeast Extract (0,6% w/v)-TSYE

Agar

Το θρεπτικό υλικό TSAYE (Tryptic Soy Agar supplemented with Yeast Extract (0,6% w/v) αποτελείται από το θρεπτικό υλικό TSA που περιεγράφηκε προηγουμένως (2.3.1) και το YE (Yeast Extract), το οποίο αποτελεί θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη ευκαρυωτικών (ζύμες) ενώ όταν χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια των προκαρυωτικών (βακτήρια) μικροοργανισμών. Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία έγινε συνδυαστική χρήση των δύο θρεπτικών μέσων ώστε να απαριθμηθούν τα ζωντανά κύτταρα του *Listeria*, δηλαδή και τα τραυματισμένα και τα intact. Η επώαση των μικροοργανισμών αυτού του θρεπτικού υλικού πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 24 ώρες.

2.3.7 Tryptic Soy Agar supplemented with Yeast Extract (0,6% w/v) and NaCl (5% w/v)-TSYE Agar with NaCl

Το TSAYE 5% NaCl αποτελείται από το θρεπτικό υλικό TSAYE 0,6% που περιγράφηκε προηγουμένως και από το αλάτι (προσθήκη 5% w/v), ώστε να απαριθμηθούν τα κύτταρα τα οποία δεν υπέστησαν καμία κυτταρική βλάβη (intact) (Dallmier & Martin, 1990). Για να υπολογιστεί το τελικό ποσοστό των υποθανάτιων τραυματισμένων κυττάρων έπειτα από διάφορες καταπονήσεις χρησιμοποιείται η παρακάτω εξίσωση (Busch & Donnelly, 1992) η οποία βασίζεται στη διαφορά μεταξύ των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο μη επιλεκτικό και στο επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα: Τραυματισμένα κύτταρα % = $(N_{\text{non-selective}} - N_{\text{selective}} / N_{\text{non-selective}})$

* 100. Η επώαση των μικροοργανισμών αυτού του θρεπτικού υλικού πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 24 ώρες.

2.3.8 Tryptic Soy Broth με προσθήκη κιτρικού οξέος - TSB

Το TSB (Tryptic Soy Broth) αποτελεί πλούσιο θρεπτικό ζωμό (υγρό) γενικής χρήσης που χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάπτυξη βακτηρίων. Με σκοπό την ρύθμιση του τελικού pH να φτάσει έως 3,7 έγινε αρχικά προσθήκη κιτρικού οξέος (0,64% w/v) ωστόσο το τελικό pH δεν έφτασε στην τιμή 3,7 και στην συνέχεια έγινε προσθήκη HCL (υδροχλωρικό οξύ) συγκέντρωσης 1N. Η μέτρηση έγινε με την βοήθεια ψηφιακού πεχάμετρου εμβαπτίζοντας το ηλεκτρόδιο στο TSB.

2.3.9 MRD (Maximum Recovery Diluent 0.1 % w/v πεπτόνη και 0.85 % w/v NaCl)

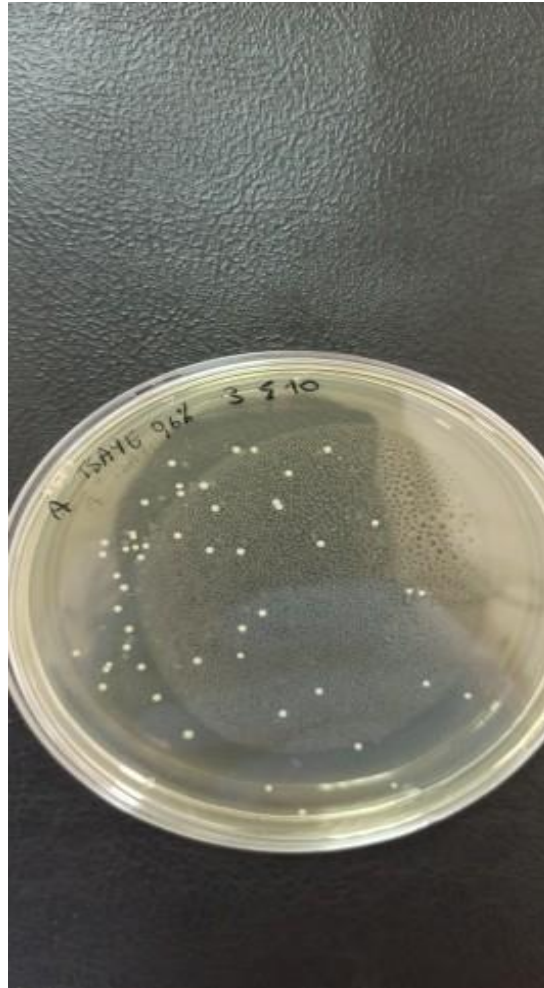
Το MRD είναι ένα ισοτονικός διαλύτης και χρησιμοποιείται για την μέγιστη επαναφορά των μικροοργανισμών.

2.4 Απόκριση πλαγκτονικών κυττάρων του *L. monocytogenes* σε όξινες συνθήκες (1^ο πείραμα)

Με σκοπό την αξιολόγηση της τυχόν προσαρμογής των κυττάρων *Listeria*, συλλέχθηκαν κύτταρα του μίγματος (cocktail) που είχαν εκτεθεί για 24 ώρες στο TSB με pH 3,7 και T=12°C και στην συνέχεια συγκρίθηκαν με κύτταρα τα οποία δεν είχαν υποστεί προηγουμένως καμία καταπόνηση. Ο πληθυσμός των φρέσκων καλλιεργειών ο οποίος στις 24 ώρες εκτιμάται να είναι περίπου 9 log cfu/ml αραιώθηκε ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση με αυτόν των στρεσαρισμένων καλλιεργειών (~7,6 log cfu/g) μετά από 24 ώρες. Όλα τα δείγματα (σύνολο 2) αποθηκεύτηκαν στους 12°C.

2.4.1 Απαρίθμηση Μικροβιακού Πληθυσμού

Για να παρακολουθήσουμε την πορεία των πληθυσμών του *L. monocytogenes* πραγματοποιούνταν δειγματοληψία κάθε 4 ώρες για συνολική διάρκεια 48 ωρών. Πιο συγκεκριμένα, γινόταν λήψη υπό ασηπτικές συνθήκες 1 ml από κάθε δείγμα, και στην συνέχεια πραγματοποιούνταν δεκαδικές διαδοχικές αραιώσεις σε 9ml MRD. Τέλος, με την μέθοδο της επίστρωσης όπου όγκος 0,1ml από το δείγμα, μεταφερόταν, σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE με 0,6%YE αλλά και σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 5% NaCl.

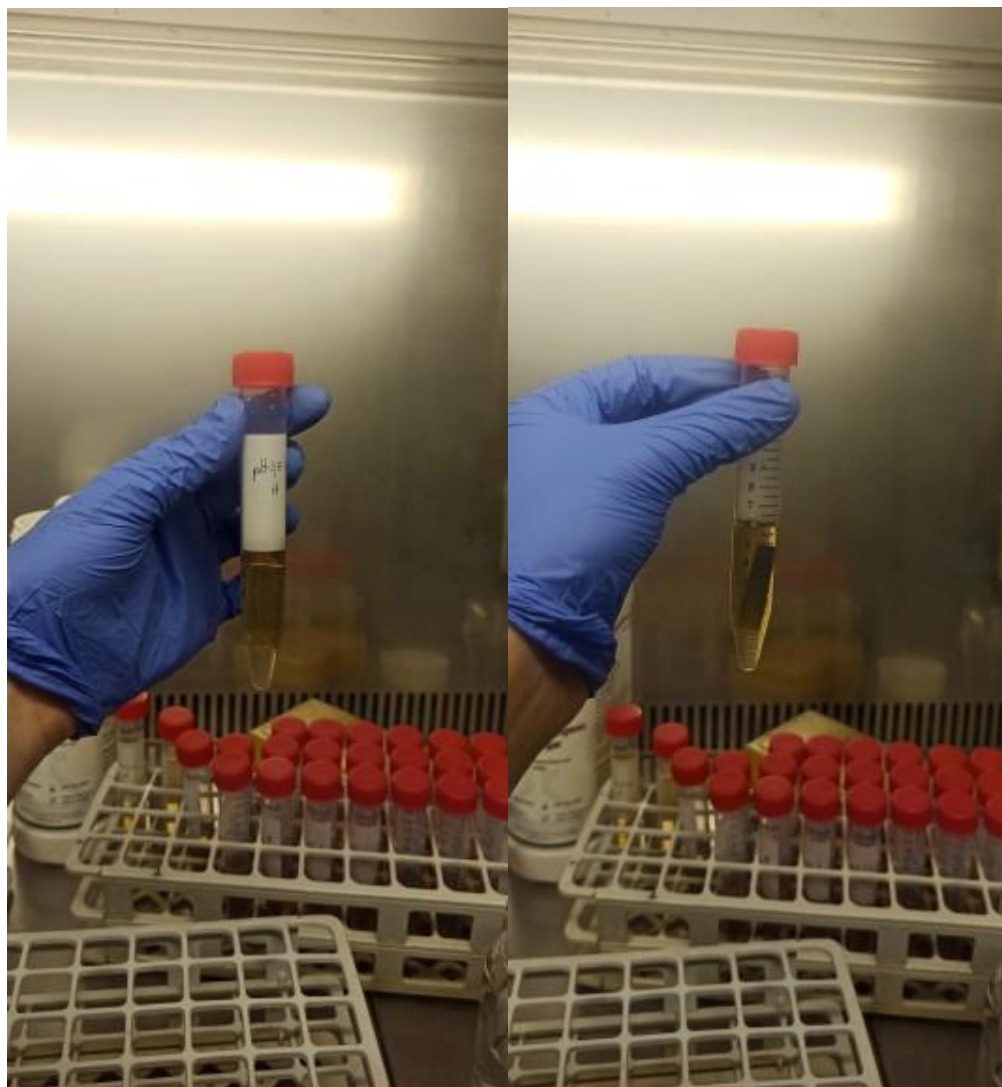


Εικόνα 2. Κύτταρα *L. monocytogenes* αριθμημένα σε θρεπτικό υλικό TSAYE 0,6%.

2.5 Ανάπτυξη biofilm από κύτταρα του *L. monocytogenes* προσαρμοσμένα σε οξύ (2^ο πείραμα)

Στο δεύτερο πείραμα πραγματοποιήθηκε η μελέτη ανάπτυξης βιοϋμενίων του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες τύπου AISI - 304, 3 x 1 x 0.1 cm, από κύτταρα τα οποία είχαν εκτεθεί προηγουμένως σε χαμηλό pH (3,7) έχοντας ως στόχο την προσομοίωση συνθηκών πραγματικού περιβάλλοντος, όπως οι

επιφάνειες μιας μονάδας επεξεργασίας αλιευμάτων. Συγκεκριμένα, cocktail κυττάρων του *L. monocytogenes* προερχόμενο από όξινη καταπόνηση σε pH 3.7 για 24 ώρες ενοφθαλμίστηκε σε 6 ml TSB το οποίο περιείχε μεταλλικές πλάκες ώστε να πραγματοποιηθεί η προσκόλληση των κυττάρων. Η άλλη περίπτωση που μελετήθηκε αφορούσε μίγμα (cocktail) κυττάρων του *L. monocytogenes* το οποίο ενοφθαλμίστηκε σε 6 ml TSB περιέχοντας τις μεταλλικές πλάκες και αποτελούσε τον μάρτυρα. (σύνολο 2 δείγματα) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Οι μεταλλικές επιφάνειες τύπου AISI - 304, 3 x 1 x 0.1 cm σε 6ml TSB. Στις πλάκες βρίσκονται τα προσκολλημένα κύτταρα του *L. monocytogenes*.

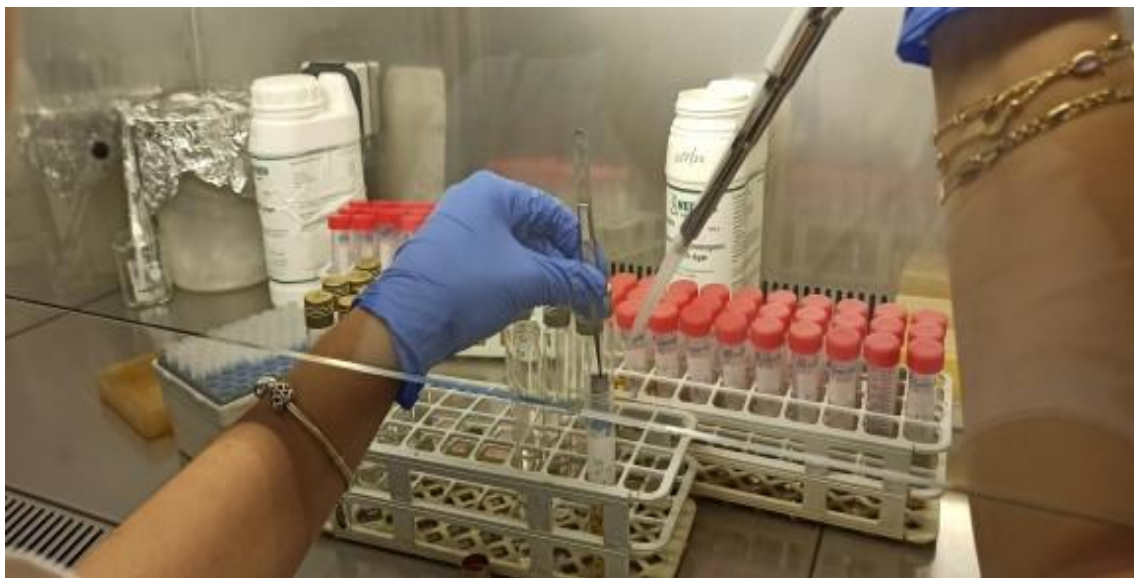
2.5.1 Προετοιμασία για τον σχηματισμό βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*

Για να προσκολληθούν τα κύτταρα του *L. monocytogenes* και να σχηματίσουν βιοϋμένια έγινε χρήση μεταλλικών επιφανειών (πλάκες) από ανοξείδωτο χάλυβα κομμένες σε διαστάσεις 3 × 1 × 0.1 εκ., (type AISI-304; Χαλυβουργική Α.Ε.; Αθήνα, Ελλάδα). Αυτός ο τύπος ανοξείδωτου χάλυβα χρησιμοποιείται συνήθως ως κύριο υλικό του εξοπλισμού στην βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων εξαιτίας της φυσικοχημικής

του σταθερότητας και της υψηλής αντοχής του στην διάβρωση (Papaioannou et al., 2018). Πριν από τη χρήση όλων των πλακών, πραγματοποιήθηκε μεθοδικός καθαρισμός και αποστείρωση τους σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε από τους Kostaki et al. (2012).

2.5.2 Διαδικασία προσκόλλησης κυττάρων

Όπως περιεγράφηκε στο 2.2 αφού προετοιμάστηκε το cocktail με τα 6 στελέχη του *L. monocytogenes*, έγινε λήψη εμβολίου 10 μ L από κάθε δείγμα και προστέθηκε ξεχωριστά σε 6 ml αποστειρωμένου διαλύματος 0.85 % w/v NaCl, ώστε ο τελικός πληθυσμός του παθογόνου στο κάθε δείγμα να είναι 10^5 CFU/mL. Στο falcon που περιείχε τα 6 ml διαλύματος 0.85 % w/v NaCl είχαν ήδη τοποθετηθεί οι αποστειρωμένες πλάκες, και τα 4 δείγματα αφέθηκαν για 3 ώρες, χωρίς να αναταραχθούν στους 15°C ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα. Μετά από τις 3 ώρες, όλες οι μεταλλικές πλάκες ξεπλύθηκαν μία προς μία με τη χρήση πιπέτας, ρίχνοντας 3 mL διαλύματος 0.85 % w/v NaCl σε κάθε πλευρά (σύνολο 6 ml) για να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα ή τα ελαφρώς προσκολλημένα κύτταρα (Εικόνα 4). Αμέσως, οι μεταλλικές πλάκες τοποθετούνταν σε νέους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 6 ml TSB και επωάζονταν στους 15°C.



Εικόνα 4. Διαδικασία ξεπλύματος των μεταλλικών πλακών ώστε να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα κύτταρα. Με μία αποστειρωμένη τσιμπίδα κρατάμε την μεταλλική επιφάνεια ρίχνοντας 3 ml διαλύματος 0.85 % w/v NaCl στην κάθε πλευρά. Στην συνέχεια η πλάκα τοποθετούνταν σε νέο TSB.

2.5.3 Απαρίθμηση πληθυσμού βιοϋμενίου

Για να απαριθμήσουμε τον πληθυσμό των βιοϋμενίων από τα αποστειρωμένα falcon που περιείχαν τις μεταλλικές πλάκες ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται από τους Papaioannou et al. (2018). Την αρχική ημέρα (ημέρα 0) και κάθε δύο ημέρες, λαμβάνονταν υπό ασηπτικές συνθήκες με αποστειρωμένη λαβίδα μία μεταλλική επιφάνεια και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο σωλήνα. Ο σωλήνας περιείχε 9 mL MRD (LABM, Lancashire UK) και περίπου 30 γυάλινα σφαιρίδια βάρους 1g και διαμετρήματος 0.1 mm. Στην συνέχεια ακολούθησε ανατάραξη για 1 λεπτό, σε ανακινητή Vortex (F20, Velp Scientifica, Italy) ώστε τα σφαιρίδια να αποξέσουν τα προσκολλημένα κύτταρα, των σχηματιζόμενων βιοϋμενίων από τις μεταλλικές πλάκες. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις λαμβάνοντας 1 mL από το εναιώρημα το οποίο μεταφέρονταν σε 9 mL MRD και κατόπιν όγκος 0.1 ml, από την κατάλληλη

αραίωση χρησιμοποιήθηκε για την επίστρωσή του σε τριβλία με θρεπτικά υποστρώματα TSAYE (Tryptone Soy Agar- 0,6% Yeast Extract), TSAYE 5% NaCl και Oxford Agar. Τέλος, οι υπόλοιπες μεταλλικές πλάκες, σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας, επανατοποθετούνταν σε νέα αποστειρωμένα falcon με φρέσκο θρεπτικό υλικό TSB (6 mL) και επωάζονταν στους 15°C. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν για 10 ημέρες.

2.6 Απόκριση πλαγκτονικών κυττάρων του *L. monocytogenes* σε μαριναρισμένο φιλέτο τσιπούρας (3^ο πείραμα)

Στο τρίτο πείραμα έγινε σύγκριση μεταξύ στρεσαρισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* και πλαγκτονικών κυττάρων σε πραγματικό προϊόν μαριναρισμένο με κιτρικό οξύ φιλέτο τσιπούρας.

2.6.1 Προετοιμασία φιλέτων

Φιλέτα νωπής τσιπούρας (*Sparus aurata*) βάρους 350g περίπου της εταιρίας «ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΕΙΑ ΚΕΦΑΛΛΟΝΙΑΣ ΑΒΕΕ» μεταφέρθηκαν σε κουτιά με λιωμένο πάγο στο εργαστήριο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος εντός 24 ωρών. Μετά την πλύση, την απολέπιση, την αποκεφάλιση και τον ευσπλαχνισμό των ιχθύων, πραγματοποιήθηκε εκ νέου πλύση αυτών ώστε να μειωθούν τα επίπεδα ακαθαρσιών και του εξωγενούς υλικού τα οποία πιθανώς να επηρεάσουν αρνητικά τη δυναμικότητα του χρώματος του τελικού προϊόντος και επίσης να ελαττωθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης με μικροοργανισμούς.

Τα φιλέτα αρχικά υπέστησαν θερμική επεξεργασία. Πιο συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν σε προ-θερμασμένο στους 180°C φούρνο για 20 λεπτά. Και στην συνέχεια αφέθηκαν να κρυώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 ώρα πριν μαριναριστούν.

Τα φιλέτα μαριναρίστηκαν με χρήση κιτρικού οξέος. Ειδικότερα, φυσικός χυμός λεμονιού (μετά από στύψιμο λεμονιών) αραιωμένος με νερό 1 προς 1 και προσθήκη 3% NaCl, χρησιμοποιήθηκε για μαρινάρισμα. Η αναλογία προϊόντος προς μαρινάδας ήταν 1:2 (100 g προϊόντος εμβαπτίσθηκε σε 200 ml μαρινάδας). Το μαρινάρισμα πραγματοποιήθηκε στους 4°C για 24 ώρες. Μετά από αυτό τα φιλέτα αφέθηκαν να στραγγίσουν και να στεγνώσουν για 1 ώρα στους 4°C.

Μετά το στράγγισμα τα φιλέτα συσκευάστηκαν σε πλαστική συσκευασία σε ατμόσφαιρα κενού χρησιμοποιώντας συσκευαστικό τύπου Kingstar Vacuum sealer. Το πλαστικό φιλμ (Intrama Protek Ltd., 9300 Dobrich, Bulgaria) ήταν μέτριας διαπερατότητας σε οξυγόνο (OTR 39.2 cm³/m², 24 h, atm at 23 °C, and 0% relative humidity). Τέλος αποθηκεύτηκαν στην συντήρηση σε θερμοκρασία 4°C.

2.6.2 Εμβολιασμός κυττάρων *L. monocytogenes* σε φιλέτα τσιπούρας

Για να πραγματοποιηθεί η μελέτη της πιθανής ανάπτυξης ανθεκτικότητας των κυττάρων *L. monocytogenes* σε ιχθύ, πραγματοποιήθηκαν πρώτα τα βήματα που περιγράφονται στις ενότητες 2.2 και 2.4 έτσι ώστε να δημιουργηθεί ένα cocktail κυττάρων το οποίο έχει εκτεθεί προηγουμένως σε όξινες συνθήκες και συγκεκριμένα σε χαμηλό pH 3,7 και ένα μίγμα (cocktail) το οποίο δεν έχει υποστεί όξινη καταπόνηση (control). Αφού είχαμε τα δύο cocktail με τελικό πληθυσμό 10⁸ CFU/ml τα εμβολιάσαμε στο φιλέτο τσιπούρας (~100g) ώστε να υπάρχει τελικός πληθυσμός 10⁵/100g σάρκας. Τέλος, αποθηκεύσαμε τα φιλέτα στους 4°C.

2.6.3 Απαρίθμηση των μικροβιακών πληθυσμών των δειγμάτων

Για να γίνει απαρίθμηση των μικροβιακών πληθυσμών των φιλέτων χρειαζόνταν 10 g σάρκας τα οποία τοποθετούνταν σε ειδική σακούλα αποστειρωμένη σακούλα Stomacher. Στην συνέχεια στην σακούλα προστίθονταν 90 mL MRD και η σακούλα

τοποθετούνταν σε ειδικό μηχάνημα τύπου Bag Mixer για 120 δευτερόλεπτα για την καλύτερη ομογενοποίηση του δείγματος. Αφού πραγματοποιήθηκε η ομογενοποίηση, ακολούθησε η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων και στην συνέχεια επίστρωση ή ενσωμάτωση του δείγματος στα τριβλία με θρεπτικά υλικά TSA, IAL, CFC, MRS και OXFORD. Όσον αφορά το θρεπτικό υπόστρωμα OXFORD πραγματοποιήθηκαν 8 δειγματοληψίες ($t_0=0h$, $t_1=1days$, $t_2=3days$, $t_3=6days$, $t_4=9days$, $t_5=15days$, $t_6=20days$, $t_7=30days$). Ενώ για τα υπόλοιπα θρεπτικά υποστρώματα πραγματοποιήθηκαν 10 δειγματοληψίες ($t_0=0h$, $t_1=5days$, $t_2=10days$, $t_3=13days$, $t_4=16days$, $t_5=20days$, $t_6=25days$, $t_7=30days$, $t_8=35days$).

2.7 Στατιστική ανάλυση

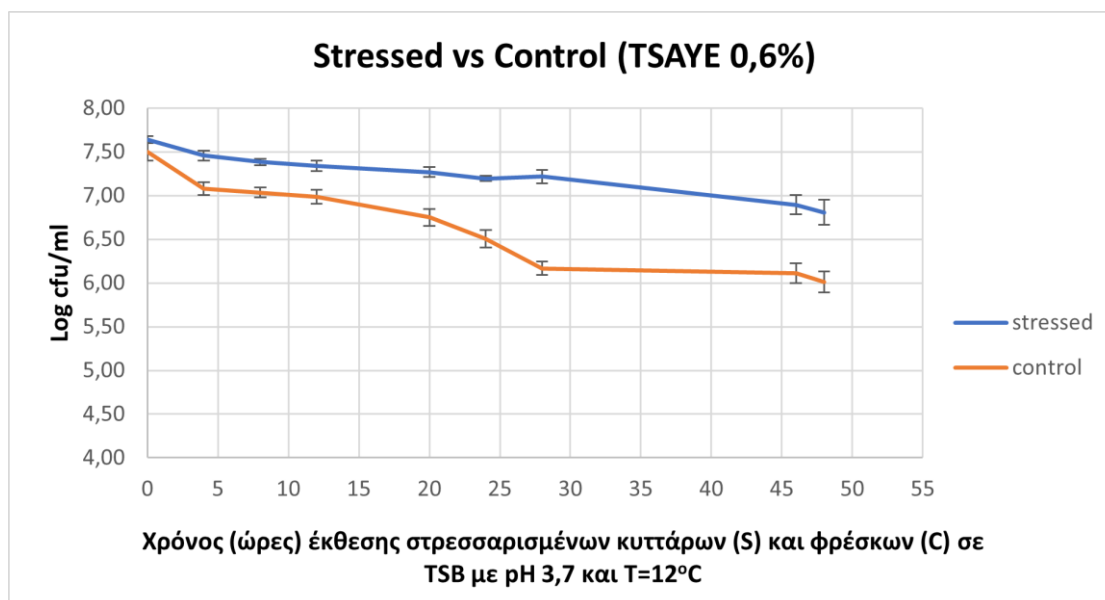
Σε κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις και τα δεδομένα εκφράζονταν σε μέσους όρους οι οποίοι υπολογίστηκαν με τη χρήση του Excel Microsoft® Office 365. Η σύγκριση των μέσων πραγματοποιήθηκε με Ανάλυση μονής Διακύμανσης (one-way ANOVA) χρησιμοποιώντας το Tukey post hoc test σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$. Το λογισμικό το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση ήταν το IBM® SPSS® statistics 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απόκριση πλαγκτονικών κυττάρων του *L. monocytogenes* σε όξινες συνθήκες

Για να αξιολογηθεί η πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας κυττάρων *L. monocytogenes* σε όξινες συνθήκες προηγήθηκε η διαδικασία της όξινης καταπόνησης (στρες). Στην προκειμένη περίπτωση το όξινο στρες που εκτέθηκαν τα κύτταρα ήταν σε θρεπτικό μέσο TSB το οποίο χαρακτηριζόταν από πολύ χαμηλό pH (3,7) με προσθήκη κιτρικού (0,64% w/v) και θερμοκρασία 12°C, για 24 ώρες. Μετέπειτα, τα κύτταρα αυτά τοποθετήθηκαν στις ίδιες ακριβώς συνθήκες για 48 ώρες, διάστημα στο οποίο έλαβαν χώρα 9 δειγματοληψίες, $t_0=0h$, $t_1=4h$, $t_2=8h$, $t_3=12h$, $t_4=20h$, $t_5=24h$, $t_6=28h$, $t_7=46h$, $t_8=48h$. Τα κύτταρα τα οποία υπέστησαν όξινη καταπόνηση παρακάτω κωδικοποιούνται ως S (stressed), ενώ τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, δηλαδή δεν υπέστησαν καμία καταπόνηση αναφέρονται ως C (control). Οι δύο πληθυσμοί των παραπάνω κατηγοριών υπολογίστηκαν έτσι ώστε να έχουν παρόμοιο αρχικό πληθυσμό για την καλύτερη σύγκριση τους $\sim 7,5 \log \text{ cfu/ml}$.

Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται ο ρυθμός μείωσης των πληθυσμών των καταπονημένων κυττάρων (cocktail) καθώς και των μη καταπονημένων σε θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 0,6%.

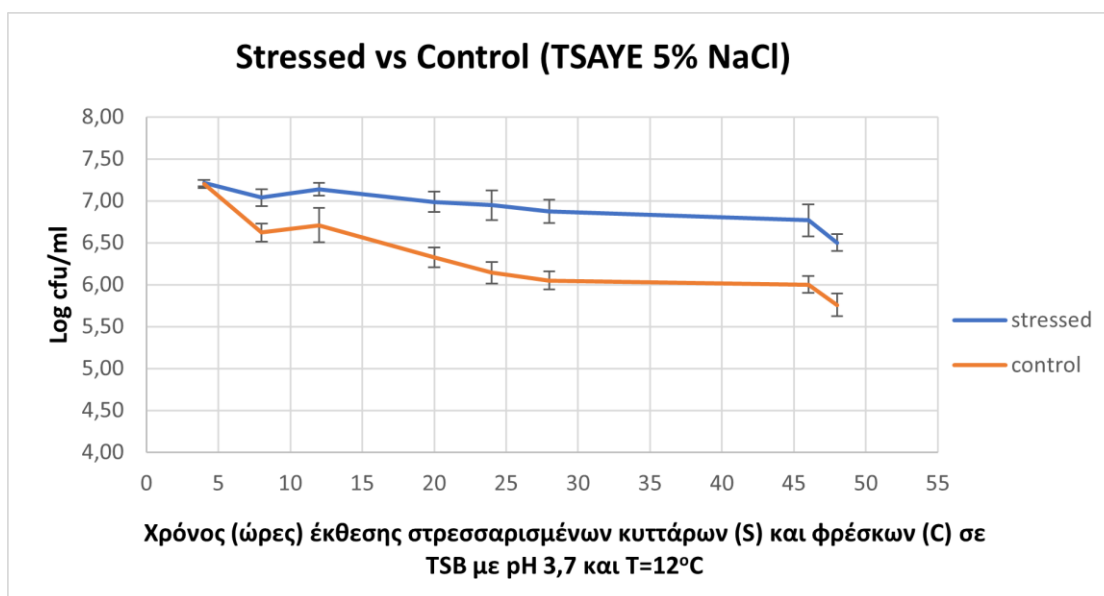


Σχήμα 1. Επιβίωση στρεσαρισμένων κυττάρων (S) *L. monocytogenes* (cocktail 6 στελεχών) σε TSB με pH 3,7 (κιτρικό οξύ) και T=12°C αφού έχουν εκτεθεί για 24 ώρες στις ίδιες συνθήκες και επιβίωση μη καταπονημένων κυττάρων (C). Αριθμημένα σε θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 0,6%. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).

Στην χρονική στιγμή t=0h τα δείγματα είχαν παρόμοιο πληθυσμό ~ 7,5 log cfu/ml. Στην συνέχεια, το cocktail στελεχών του *L. monocytogenes* που είχε στρεσαριστεί προηγουμένως παρουσίασε αμυντικούς μηχανισμούς στις όξινες συνθήκες, όπως φαίνεται και στο σχήμα 1, καθώς ο πληθυσμός τους ήταν αρκετά υψηλότερος σε σύγκριση με αυτόν των φρέσκων καλλιεργειών. Αναλυτικότερα, ο πληθυσμός των S κυττάρων μειώθηκε πολύ λίγο στις πρώτες 4 ώρες (7,46 log cfu/ml) και στην συνέχεια μειωνόταν με πολύ μικρό ρυθμό μέχρι τις 28 ώρες (7,3 log cfu/ml) και στην συνέχεια μειώθηκε έως και 6,81 log cfu/ml στις 48h. Αντίθετα, τα μη καταπονημένα κύτταρα, από την πρώτη στιγμή μειώθηκαν απότομα έως και 0,5 log cfu/ml τις πρώτες 4 ώρες, ενώ έως το τέλος των δειγματοληψιών ο πληθυσμός τους είχε φτάσει στους 6 log cfu/ml.

Αξιοσημείωτη είναι η διαφορά των δύο δειγμάτων στις 28 ώρες, όπου τα στρεσαρισμένα κύτταρα ελαφρώς αυξήθηκαν ενώ τα φρέσκα μειώθηκαν απότομα.

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα (2.3.7), για να απαριθμήσουμε τα άθικτα κύτταρα (intact) δηλαδή αυτά που δεν υπέστησαν κάποια κυτταρική βλάβη εκτός από το θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 0,6% χρησιμοποιήθηκε επίσης και το θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE + 5% NaCl. Υπολογίζοντας την διαφορά των πληθυσμών που είναι απαριθμημένα σε αυτά τα δύο υποστρώματα μας βοηθάει να γνωρίζουμε τα τραυματισμένα κύτταρα. Στο σχήμα 2 παρουσιάζεται ο ρυθμός μείωσης των πληθυσμών των καταπονημένων και των μη καταπονημένων κυττάρων S καθώς και των C σε θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 5%NaCl.



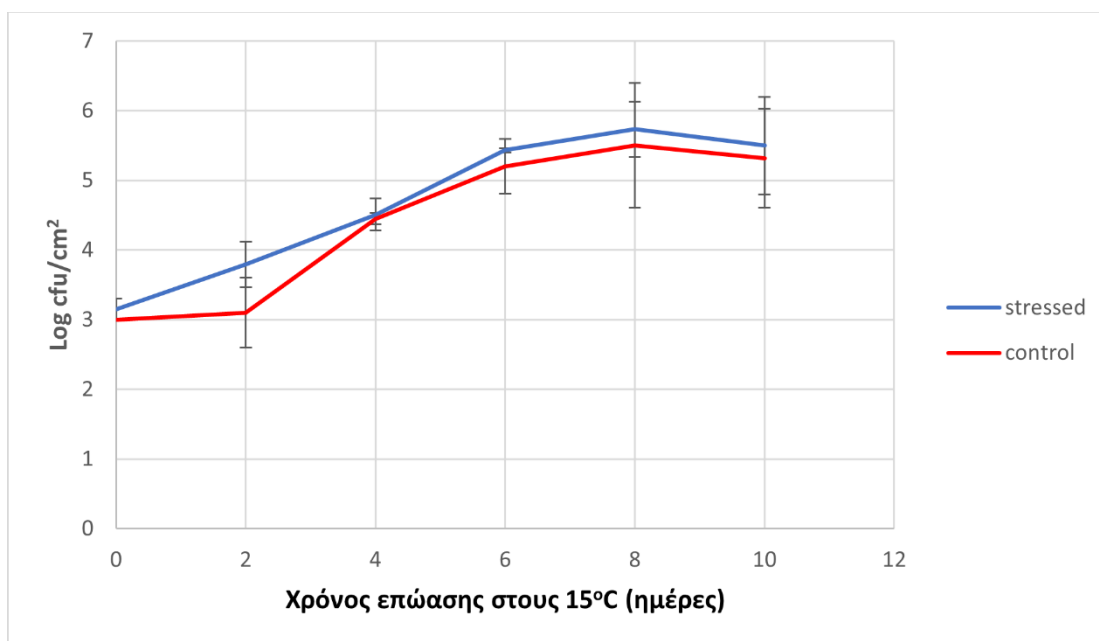
Σχήμα 2. Επιβίωση στρεσαρισμένων κυττάρων (S) *L. monocytogenes* (cocktail 6 στελεχών) σε TSB με pH 3,7 (κιτρικό οξύ) και T=12°C αφού έχουν εκτεθεί για 24 ώρες στις ίδιες συνθήκες και επιβίωση μη καταπονημένων κυττάρων (C). Αριθμημένα σε θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 5%NaCl. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).

Αρχικά, να σημειωθεί ότι για το θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 5%NaCl δεν πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία την χρονική στιγμή t_0 διότι δεν υπήρχε υποθανάτιος τραυματισμός και γι' αυτό οι δειγματοληψίες ξεκίνησαν την χρονική στιγμή $t_1=4h$. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 2, όσον αφορά τα στρεσαρισμένα κύτταρα ο πληθυσμός τους τις πρώτες 4 ώρες είναι $7,21 \log \text{cfu/ml}$ δηλαδή $0,2 \log$ λιγότερο από το θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE που σημαίνει ότι το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων ήταν αρκετά μικρό. Τα στρεσαρισμένα κύτταρα συνέχισαν να έχουν καθ' όλη την διάρκεια της δειγματοληψίας σταθερά επίπεδα τραυματισμού τα οποία ήταν αρκετά χαμηλά. Παρομοίως, τα φρέσκα κύτταρα, παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα τραυματισμού σε σχέση με τα στρεσαρισμένα έχοντας καθ' όλη την διάρκεια της δειγματοληψίας $\sim 0,3 \log \text{cfu/ml}$ διαφορά μεταξύ του θρεπτικού υποστρώματος TSAYE και TSAYE 5%NaCl.

3.2 Ανάπτυξη biofilm από κύτταρα του *L. monocytogenes* προσαρμοσμένα σε οξύ

Το δεύτερο πείραμα αφορούσε την μελέτη ανάπτυξης βιοϋμενίου (biofilm) από κύτταρα του *L. monocytogenes* τα οποία είχαν προσαρμοστεί προηγουμένως σε χαμηλό pH για να εξετάσουμε τυχόν διαφορές σε σύγκριση με τους μάρτυρες στον σχηματισμό biofilm.

Στο παρακάτω διάγραμμα (Σχ. 3) παρουσιάζεται η αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων βιοϋμενίου (cocktail) του *L. monocytogenes* σε μεταλλικές πλάκες στους 15°C με θρεπτικό υλικό TSB από κύτταρα που προήλθαν μετά από έκθεση σε χαμηλό pH (3,7) με προσθήκη κιτρικού οξέος (0,64% w/v) και θεωρούνται στρεσαρισμένα. Τοποθετήθηκαν επίσης φρέσκα κύτταρα ως μάρτυρες (control) και ο πληθυσμός ενοφθαλμισμού τους υπολογίστηκε ώστε να είναι παρόμοιος με αυτόν των στρεσαρισμένων ($\sim 3 \log \text{cfu/cm}^2$), με σκοπό την καλύτερη σύγκριση τους.



Σχήμα 3. Ανάπτυξη βιοϋμενίου *L. monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό TSB στους 15°C από κύτταρα που προήλθαν μετά από έκθεση σε χαμηλό pH (3,7) σε σύγκριση με φρέσκα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (control). Αριθμημένα σε θρεπτικό υπόστρωμα Oxford. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ($n = 3$).

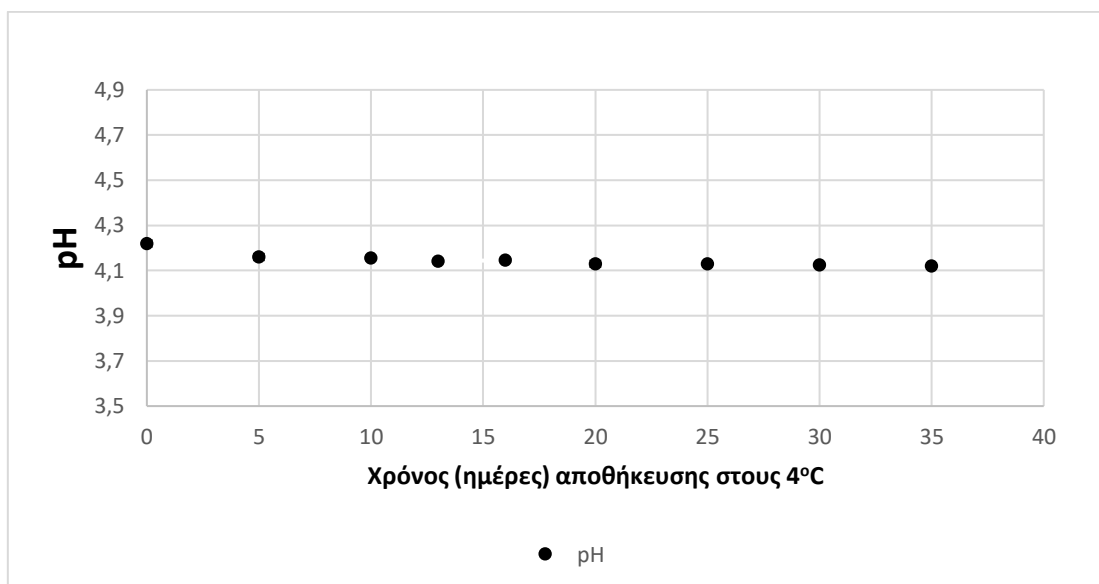
Στο σχήμα 3, παρατηρούμε ότι κατά το στάδιο της προσκόλλησης ημέρα 0 (2h μετά τον εμβολιασμό) τα κύτταρα που είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε χαμηλό pH και θεωρούνται στρεσαρισμένα αυξήθηκαν σχηματίζοντας βιοϋμένια φτάνοντας στους 3,79 log cfu/cm² την δεύτερη μέρα από τον αρχικό πληθυσμό που ήταν ~3 log cfu/cm². Στην συνέχεια, τα στρεσαρισμένα κύτταρα συνέχισαν να παρουσιάζουν μία συνεχώς ανοδική τάση και έπειτα από 10 ημέρες επώασης στους 15°C ο πληθυσμός τους έφτασε στους 5,5 log cfu/cm². Όσον αφορά τα κύτταρα ελέγχου (χωρίς προηγούμενη καταπόνηση) τις

πρώτες δύο ημέρες ο πληθυσμός τους παρέμεινε σταθερός $3,1 \log \text{ cfu/cm}^2$, ενώ στην συνέχεια μετά από 10 ημέρες ο πληθυσμός των φρέσκων κυττάρων αυξανόταν σταδιακά φτάνοντας σε τελικό πληθυσμό $5,31 \log \text{ cfu/cm}^2$.

3.3 Απόκριση πλαγκτονικών κυττάρων του *L. monocytogenes* σε μαριναρισμένο φιλέτο τσιπούρας (3^ο πείραμα)

Το τρίτο πείραμα αφορούσε την μελέτη ανάπτυξης ανθεκτικότητας πλαγκτονικών κυττάρων (cocktail) του *L. monocytogenes* τα οποία είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε χαμηλό pH (3,7) με προσθήκη κιτρικού οξέος (0,64% w/v) για 24 ώρες και στην συνέχεια ενοφθαλμίστηκαν στην επιφάνεια πραγματικών φιλέτων μαριναρισμένης τσιπούρας (*Sparus aurata*). Τα φιλέτα στην συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους 4°C (θερμοκρασία αποθήκευσης στο λιανικό εμπόριο) σε συσκευασία vacuum και συντηρήθηκαν για 35 ημέρες. Ο αρχικός πληθυσμός των στρεσαρισμένων κυττάρων υπολογίστηκε έτσι ώστε να έχει παρόμοιο πληθυσμό με τα φρέσκα κύτταρα $\sim 3 \log \text{ cfu/g}$.

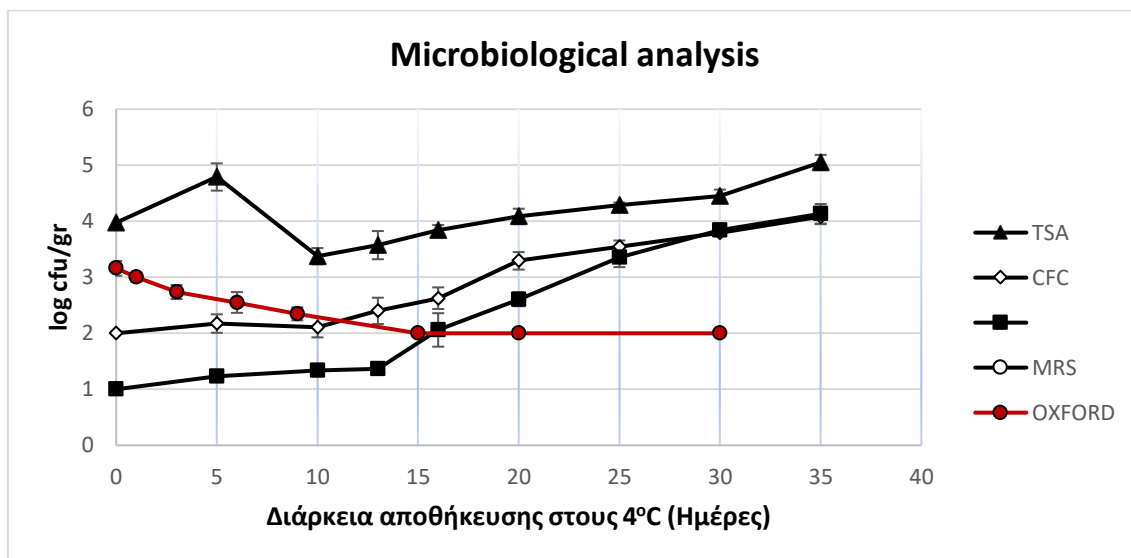
Επίσης στο Σχήμα 4 παρουσιάζεται η μεταβολή του pH καθ' όλη την διάρκεια αποθήκευσης των φιλέτων.



Σχήμα 4. Μεταβολή pH φιλέτων μαριναρισμένων τσιπουρών (*Sparus aurata*) με κιτρικό οξύ αποθηκευμένα σε vacuum συσκευασία στους 4°C.

Οι τιμές του pH παρακολούθηθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης για τα μαριναρισμένα φιλέτα τσιπούρας και δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές που πρέπει να εξεταστούν από την άποψη μικροβιολογικής σταθερότητας. Η τιμή του pH του προϊόντος μαριναρισμένο με κιτρικό οξύ ήταν αρκετά σταθερή, αφού δεν παρουσίαζε διακυμάνσεις αλλά έπεσε ελαφρά στο 4,1 από την αρχική τιμή 4,2 (Σχημ. 4) σε συνθήκες κενού.

Στο Σχήμα 5 παρουσιάζεται ο πληθυσμός των στρεσαρισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* και η μεταβολή μικροβιακού πληθυσμού σε φιλέτα μαριναρισμένης τσιπούρας.

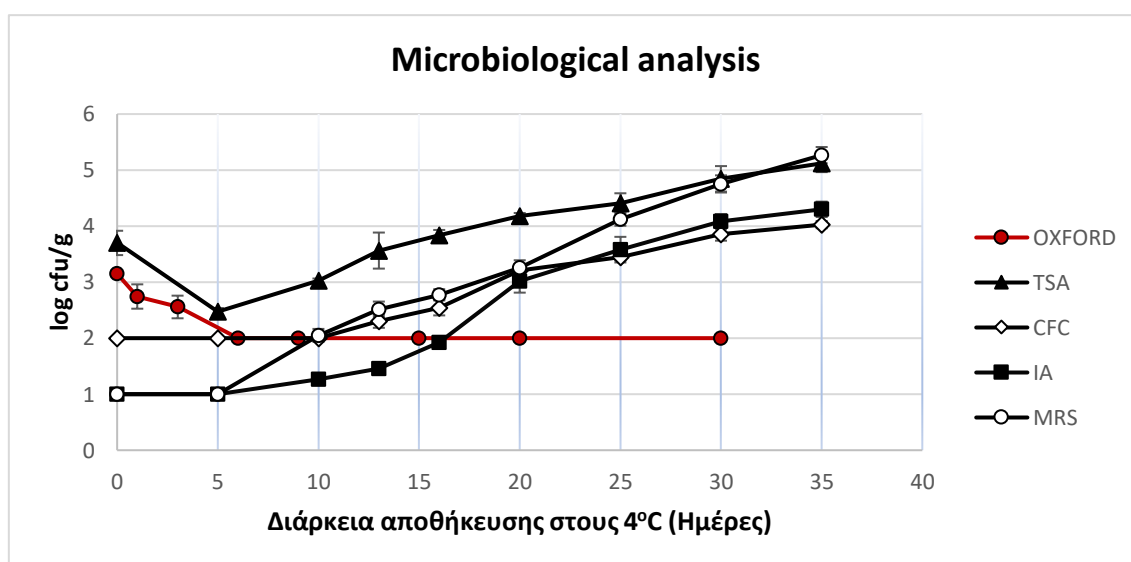


Σχήμα 5. Επιβίωση στρεσαρισμένων κυττάρων (cocktail 6 στελεχών) του *L. monocytogenes* σε φιλέτο μαριναρισμένης τσιπούρας με κιτρικό οξύ, αποθηκευμένα υπό συνθήκες κενού στους 4°C, αφού είχαν εκτεθεί προηγουμένως για 24 ώρες σε TSB με pH 3,7 (κιτρικό οξύ) και T=12°C και μεταβολή μικροβιακού πληθυσμού. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).

Αρχικά, τις πρώτες 24 ώρες και ο πληθυσμός των στρεσαρισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* παρέμεινε σταθερός στους 3 log cfu/g από τους 3,16 log cfu/g που είχε αρχικά. Τα στρεσαρισμένα κύτταρα στην συνέχεια (3^η ημέρα) μειώθηκαν σταδιακά στους 2,7 log cfu/g φτάνοντας τελικά στην 15η ημέρα κάτω από το όριο ανίχνευσης (2 log cfu/g) και παρέμειναν έτσι καθ' όλη την διάρκεια της δειγματοληψίας. Γενικότερα, η χρήση κιτρικού οξέος μειώνει όχι μόνο τον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό αλλά και την μικροβιακή ανάπτυξη. Πιο συγκεκριμένα, ο αρχικός πληθυσμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (0) ήταν 3,97 log cfu/g, κατά την διάρκεια της αποθήκευσης και συγκεκριμένα μετά από 5 μέρες ο πληθυσμός της OMX είχε αυξηθεί (4,79) και στην συνέχεια, η OMX

συνέχισε να αυξάνεται με μειωμένο ρυθμό φτάνοντας εν τέλει στους 5,05 log cfu/g την 35^η ημέρα όπου και ορίστηκε το τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής του προϊόντος. Παρομοίως η ανάπτυξη των *Pseudomonas* spp. ήταν περιορισμένη εξαιτίας της συσκευασίας vacuum φτάνοντας σε τελικό επίπεδο 4,08 log cfu/g την 35^η μέρα. Αντίθετα τα βακτήρια που παράγουν υδρόθειο (H₂S) έφτασαν στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής τους 4,13 log cfu/g. Όσον αφορά τα οξυγαλακτικά βακτήρια, εμφάνισαν αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και κατέληξαν να είναι οι κύριοι αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί στο τέλος της συντήρησης φτάνοντας σε πληθυσμό 4,86 log cfu/g.

Στο Σχήμα 6 παρουσιάζεται ο πληθυσμός των κυττάρων του *L. monocytogenes* (control) και η μεταβολή μικροβιακού πληθυσμού σε φιλέτα μαριναρισμένης τσιπούρας.



Σχήμα 6. Επιβίωση φρέσκων κυττάρων (cocktail 6 στελεχών) του *L. monocytogenes* σε φιλέτο μαριναρισμένης τσιπούρας, που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου (Control) και μεταβολή μικροβιακού πληθυσμού σε φιλέτα μαριναρισμένης τσιπούρας με κιτρικό οξύ, αποθηκευμένα υπό συνθήκες κενού στους 4°C. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3)

Τα μη καταπονημένα κύτταρα (μάρτυρες) από την 1^η ημέρα άρχισαν να μειώνονται σταδιακά φτάνοντας στους 2,7 cfu/g. Την 3^η μέρα έφτασαν στους 2,5 cfu/g την 6^η ημέρα τα κύτταρα του *L. monocytogenes* παρέμειναν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 log cfu/g και καθ' όλη την διάρκεια της δειγματοληψίας. Προφανώς δεν κατάφεραν να αντέξουν στο χαμηλό pH της τάξεως του 4,1. Όσον αφορά, τους υπόλοιπους μικροβιακούς πληθυσμούς παρατηρήθηκαν στα ίδια επίπεδα όπως και στο Σχήμα 5.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Απόκριση πλαγκτονικών κυττάρων του *L. monocytogenes* σε όξινες συνθήκες

Έχει διαπιστωθεί ότι η έκθεση του *L. monocytogenes* σε διάφορες καταπονήσεις, μπορεί να οδηγήσει τελικά σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας και να προστατεύσει τον μικροοργανισμό από την ίδια ή άλλου τύπου θανατηφόρα καταπόνηση (Lou & Yousef, 1997). Το 1^ο πείραμα της παρούσας μελέτης είχε σκοπό να εξετάσει την τυχόν ανάπτυξη ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (cocktail 6 στελεχών) σε ισχυρό χαμηλό pH (3,7) με προσθήκη κιτρικού οξέος (0,64% w/v) (TSB) προσομοιάζοντας συνθήκες μαριναρίσματος ιχθύων σε βιομηχανική κλίμακα.

Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα μάρτυρες του *L. monocytogenes* (cocktail 6 στελεχών) έδειξαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην έκθεση ισχυρού χαμηλού pH (3,7) σε σύγκριση με τα κύτταρα (cocktail 6 στελεχών) τα οποία είχαν ήδη προηγουμένως εκτεθεί στις ίδιες συνθήκες. Από τα αποτελέσματα επίσης προέκυψε, ο πληθυσμός των επιζώντων στρεσοαρισμένων σε κιτρικό οξύ κυττάρων του *L. monocytogenes* στο τέλος της δειγματοληψίας ήταν αρκετά υψηλός (6,81 log cfu/ml) συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου (6,0 log cfu/ml). Γενικότερα, δεν υπάρχουν πολλές μελέτες που σχετίζονται με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αρκετό χαμηλό pH ύστερα από προσαρμογή σε εξίσου χαμηλό pH. Ωστόσο, έχουν διεξαχθεί παρόμοιες μελέτες όπως των Koutsoumanis et al (2003) έδειξαν ότι η προσαρμογή του *L. monocytogenes* σε ήπιο pH μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας του παθογόνου. Πιο συγκεκριμένα, έκθεση σε ένα ήπιο όξινο (pH 5,0 έως 6,0) περιβάλλον παρείχε προστασία του παθογόνου έναντι του οξέος κατά την επακόλουθη έκθεση σε pH 3,5. Γενικότερα, έχει βρεθεί και σε άλλες μελέτες ότι τα κύτταρα του *L. monocytogenes* δείχνουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε όξινο στρες παρά σε ωσμωτικό (Poimenidou et al., 2016; Tiganitas et al., 2009).

Για να εκτιμηθεί καλύτερα η επίδραση του χαμηλού pH που εφαρμόστηκε στα κύτταρα του *L. monocytogenes*, ήταν απαραίτητο να υπολογιστεί ο πληθυσμός των τραυματισμένων κυττάρων (TSAYE 5% NaCl). Μετά από την έκθεση των ήδη στρεσαρισμένων κυττάρων στο χαμηλό pH (3,7) παρουσιάστηκε μικρό ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων. Ίσως τα στρεσαρισμένα κύτταρα είχαν την δυνατότητα να αναπτύξουν τους κατάλληλους αμυντικούς μηχανισμούς σε όξινες συνθήκες εντός 24 ωρών, ώστε να αντέξουν στις όξινες συνθήκες. Ωστόσο, ακόμη και τα κύτταρα ελέγχου δεν παρουσίασαν μεγάλα ποσοστά τραυματισμού. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να συμφωνήσουν με την μελέτη των Arvaniti et al. (2021), οι οποίοι διερεύννησαν την επίδραση χαμηλού pH (3,0) ασθενούς οξέος (οξικό οξύ), σε θερμοκρασίες 4°C και 20°C. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι δεν υπήρχε μεγάλο ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* και ο τραυματισμός τους από οξύ επηρεάζεται σημαντικά από την θερμοκρασία. Για παράδειγμα, τα επίπεδα τραυματισμού στους 4°C ήταν αρκετά υψηλότερα απ' ό τι στους 20°C.

Από τα παραπάνω ευρήματα προκύπτει ότι κατά την διάρκεια παραμονής των κυττάρων του *L. monocytogenes* σε ισχυρό χαμηλό pH είναι πιθανό τα κύτταρα να αναπτύξουν μηχανισμούς προσαρμογής, οι οποίοι μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε επιπρόσθετα εμπόδια (ίδιας ή χαμηλότερης έντασης) κατά την επεξεργασία τροφίμων. Όσον αφορά το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes*, έχει αναπτύξει διάφορους κυτταρικούς μηχανισμούς για να προσαρμόζεται και να επιβιώνει σε όξινες συνθήκες έτσι ώστε να διατηρηθεί η ομοιόσταση του pH. Πιο συγκεκριμένα γίνεται μεταφορά πρωτονίων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης με την βοήθεια των μορίων H⁺ - ATPασης. Ένας εξίσου σημαντικός μηχανισμός για την αντίσταση στα οξέα είναι το σύστημα της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού (GAD), στο οποίο

συμμετέχουν από 3 γονίδια *GadA*, *GadB*, *GadC*. Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί δυο γονίδια το *lisR* και *lisK* τα οποία κωδικοποιούν έναν ρυθμιστικό παράγοντα τον σ^B και την ιστιδίνη – κινάση αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, όταν υπάρχουν μεταβολές στο περιβάλλον του κυττάρου όπως η μείωση του pH το σύστημα αυτό ενισχύει την έκφραση του γονιδιώματος με την βοήθεια του ρυθμιστικού παράγοντα (Gahan & Hill, 1999; Hill et al., 2002).

Ωστόσο, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας είναι μία πολύπλοκη διαδικασία και σχετίζεται από τις διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως το pH του στρες, η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια του στρες, η παρουσία πρόσθετων παραγόντων στρες και το ιστορικό ανάπτυξης του παθογόνου. Αυτά τα ευρήματα μπορεί να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην βιομηχανία τροφίμων, καθώς μπορούν να οδηγήσουν σε πιο ρεαλιστικές εκτιμήσεις των κινδύνων και να βοηθήσουν στην ανάπτυξη αποτελεσματικών κρίσιμων σημείων ελέγχου για την ενίσχυση της ασφάλειας των επεξεργασμένων προϊόντων διατροφής.

4.2 Ανάπτυξη biofilm από κύτταρα του *L. monocytogenes* προσαρμοσμένα σε οξύ

Το *L. monocytogenes* είναι ένα σημαντικό τροφιμογενές παθογόνο βακτήριο το οποίο έχει την ικανότητα να σχηματίζει βιοϋμένια σε πολλές επιφάνειες που συναντώνται στην βιομηχανία τροφίμων, επιβιώνοντας από διάφορα είδη ισχυρών στρες καθώς και από απολυμαντικά και καθαριστικά (Blackman & Frank, 1996). Γι' αυτό ήταν απαραίτητη η μελέτη ανάπτυξης βιοϋμενίου από κύτταρα στρεσαρισμένα σε οξύ του *L. monocytogenes* (cocktail 6 στελεχών).

Από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης προκύπτει ότι τα κύτταρα τα οποία είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε χαμηλό pH και τοποθετήθηκαν σε TSB στους 12°C με μεταλλικές πλάκες ώστε να δημιουργήσουν βιοϋμένιο αυξήθηκαν ελάχιστα περισσότερο, δημιουργώντας βιοϋμένιο γρηγορότερα σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Πιθανώς,

αυτό να οφείλεται στην ύπαρξη γονιδίων που έχουν εκφραστεί από τα κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε χαμηλό pH κατά την διάρκεια του στρες και τα οποία συνέβαλαν στην παραγωγή υψηλότερης ποσότητας εξωπολυσακχαριτικής ουσίας και κατά συνέπεια στην γρήγορη ανάπτυξη του βιοϋμένιου. Οι (Hefford et al., 2005) ανακάλυψαν ότι οι πρωτεΐνες που εκφράζονται περισσότερο σε κύτταρα του *L. monocytogenes* (στέλεχος 568) που αναπτύσσονται σε βιοϋμένιο εμπλέκονται στην απόκριση στο στρες, στη σύνθεση πρωτεϊνών και στην παραγωγή ενέργειας. Συμπερασματικά, κατέληξαν ότι το στρες σε οξύ μπορεί να επιταχύνει την δημιουργία βιοϋμένιου. Επιπλέον, σε έρευνα των Horlbog et al. (2019) παρατηρήθηκε ότι η έκθεση σε χαμηλό pH μπορεί να προκαλέσει τη συσσώρευση κυττάρων σε μικροαποικίες βιοϋμένων για να δημιουργήσουν ένα πιο ευνοϊκό μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη του *L. monocytogenes*. Παρόμοιες έρευνες έχουν διεξαχθεί και σε άλλα είδη παθογόνων μικροοργανισμών που δημιουργούν βιοϋμένια. Πράγματι, οι Zarei et al. (2023) αξιολόγησαν την επίδραση υποθανάτιας ποσότητας χλωρίου (στρες) σε πλαγκτονικά κύτταρα του *Salmonella enteritidis* στον σχηματισμό βιοϋμένων, δείχνοντας ότι το υποθανάτιο στρες χλωρίου ενεργοποιεί την σχηματισμό βιοϋμένιου και τα γονίδια που σχετίζονται με το quorum sensing (*sdiA* and *luxS*) στα πλαγκτονικά κύτταρα του *S. enteritidis*. Ωστόσο, υπάρχουν και έρευνες που υποστηρίζουν ότι το στρες σε οξύ σε πλαγκτονικά κύτταρα μπορεί να εμποδίσει τον αρχικό σχηματισμό των βιοϋμένων του *L. monocytogenes*, όπως είναι αυτή των Pilchová et al. (2014), κατά την οποία στελέχη *L. monocytogenes* (πλαγκτονικά) αυξήθηκαν σε TSBYE με χαμηλό pH (5) ρυθμισμένο με γαλακτικό οξύ και pH (7) και στην συνέχεια αφέθηκαν να σχηματίσουν βιοϋμένια. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι η πρωτογενής δομή (πρώτο στάδιο) σχηματισμού βιοϋμένιου ήταν εμφανώς εξασθενημένη σε όλα τα

στελέχη που είχαν εκτεθεί προηγουμένως στο χαμηλό pH, μην επιτρέποντας στην συνέχεια την ανάπτυξη ώριμων βιοϋμενίων.

4.3 Απόκριση πλαγκτονικών κυττάρων του *L. monocytogenes* σε μαριναρισμένο φιλέτο τσιπούρας

Γενικότερα, το βακτήριο *L. monocytogenes* αυτό έχει απομονωθεί από θαλασσινά και επιφάνειες επεξεργασίας ιχθύων (Rodríguez-López et al., 2015) και είναι ικανό όχι μόνο να επιμολύνει τα θαλασσινά προϊόντα όπως RTE (Ready-To-Eat) τρόφιμα (μαριναρισμένα, καπνιστά ψάρια) αλλά και να αναπτυχθεί σε αυτά αποκτώντας αυξημένη ανθεκτικότητα στα διάφορα απολυμαντικά. Σύμφωνα με την έρευνα των (Jemmi et al., 2002), ο υψηλότερος κίνδυνος απομόνωσης του παθογόνου ήταν για τα μαριναρισμένα ψάρια με ποσοστό 38% σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα που αποτελούνταν από αλλαντικά (15%) και καπνιστά αλιευτικά προϊόντα (14%). Επομένως, ήταν απαραίτητη η μελέτη συμπεριφοράς του παθογόνου *L. monocytogenes* σε μαριναρισμένο φιλέτο τσιπούρας από κύτταρα που προηγουμένως είχαν στρεσσαριστεί σε χαμηλό pH και επομένως θεωρούνται προσαρμοσμένα αλλά και από φρέσκα κύτταρα, χωρίς δηλαδή να έχουν υποστεί κάποιου είδους καταπόνηση. Στο συγκεκριμένο πείραμα μπορούν επίσης να αξιολογηθούν τυχόν διαφορές στην συμπεριφορά του βακτηρίου κατά την ανάπτυξη του σε υγρή καλλιέργεια εργαστηρίου αλλά και κατά την ανάπτυξη του σε πραγματικό φιλέτο ψαριού (στερεό υπόστρωμα).

Ο πληθυσμός των προσαρμοσμένων κυττάρων (cocktail 6 στελεχών) του *L. monocytogenes* την 1^η ημέρα παρέμεινε στους 3 log cfu/g από τους 3,16 log cfu/g που ήταν την ώρα 0 και έπειτα άρχισε να μειώνεται σταδιακά φτάνοντας τελικά την 15^η ημέρα στους 2 log cfu/g, δηλαδή κάτω από το όριο ανίχνευσης. Αντίθετα, ο πληθυσμός των κυττάρων ελέγχου άρχισε να μειώνεται από την 1^η κιόλας ημέρα φτάνοντας στους 2,7

log cfu/g ενώ την 6η ημέρα έφτασε κάτω από το όριο ανίχνευσης. Προφανώς τα μη προσαρμοσμένα αλλά και τα προσαρμοσμένα κύτταρα δεν κατάφεραν να επιβιώσουν στο χαμηλό pH της μαριναρισμένης τσιπούρας (4,1), ωστόσο, τα προσαρμοσμένα κύτταρα έδειξαν μια ελαφρά ανθεκτικότητα την πρώτη ημέρα παραμένοντας σταθερά σε σύγκριση με τους μάρτυρες που άρχισαν να μειώνονται απευθείας. Επιπλέον ο πληθυσμός και των δύο περιπτώσεων ήταν χαμηλότερος δείχνοντας λιγότερη ανθεκτικότητα σε σχέση με την ανάπτυξή τους σε υγρή καλλιέργεια. Οι Verdos et al. (2019) μελέτησαν την επιβίωση του *L. monocytogenes* σε μαριναρισμένο γαύρο αποδεικνύοντας ότι το *L. monocytogenes* έδειξε την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε οξύ σε σύγκριση με του υπόλοιπους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, το *L. monocytogenes* κατά την διάρκεια του μαριναρίσματος έδειξε μια διαφανή αδρανοποίηση υπονοώντας προσαρμογή και αντοχή σε χαμηλό pH. Όσον αφορά την επιβίωση του παθογόνου στα μαριναρισμένα φιλέτα γαύρου, ο πληθυσμός του έφτασε κάτω από το όριο ανίχνευσης μετά από 3 εβδομάδες.

Ο εμπορικός χρόνος ζωής του προϊόντος ήταν 35 ημέρες με τα οξυγαλακτικά βακτήρια να αποτελούν τον επικρατέστερο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό. Αυτό είναι προφανές διότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν υπό συνθήκες κενού καθώς και σε χαμηλό pH σε σύγκριση με τα υπόλοιπους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (Leisner et al., 1994). Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν και με την έρευνα των Anagnostopoulos et al. (2023) σχετικά με τον εμπορικό χρόνο ζωής μαριναρισμένων φιλέτων λαβρακιού και τον επικρατέστερο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό.

Γενικότερα, η επιβίωση των πλαγκτονικών κυττάρων του *L. monocytogenes* είναι πολύ πιθανό να έχει επηρεαστεί και από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του παθογόνου και

των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών του φιλέτου. Όταν το *L. monocytogenes* αλληλεπιδρά με τους υπόλοιπη μικροβιακή χλωρίδα του προϊόντος, μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξή του, την μείωση ή ακόμα και την αύξηση του πληθυσμού του. (Zilelidou & Skandamis, 2018). Έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες σε τρόφιμα όπως ο καπνιστός σολομός (Gimenez & Dalgaard, 2004), τα πουλερικά και τα κρεατοπαρασκευάσματα (Ross et al., 2009) αλλά ποτέ σε μαριναρισμένα φιλέτα τσιπούρας, παρά μόνο σε μαριναρισμένη σαλάτα θαλασσινών (Andrighetto et al., 2009), όπου υποστηρίχθηκε ότι η παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων εμπόδισε την ανάπτυξη του *L. monocytogenes*. Στην έρευνα του (Οικονομου, 2020), χρησιμοποιήθηκαν συγκαλλιέργειες αλλοιωγόνων μικροοργανισμών LAB οι οποίοι περιόρισαν την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε φιλέτα καπνιστής πέστροφας. Όπως περιγράφεται και στην έρευνα των (Delignette-Muller et al., 2006) ο περιορισμός της αύξησης του *L. monocytogenes* αποδόθηκε στον ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά με άλλους μικροοργανισμούς.

Τα αποτελέσματα του 3^{ου} πειράματος έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του 1^{ου} πειράματος καθώς στο πρώτο υπήρχε σημαντική διαφορά στην ανθεκτικότητα προσαρμοσμένων σε οξύ με μη προσαρμοσμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* σε ανάπτυξη τους σε υγρή καλλιέργεια ενώ στο 3^ο πείραμα δεν παρατηρήθηκαν τα ίδια αποτελέσματα καθώς τα προσαρμοσμένα κύτταρα σε οξύ αλλά και τα μη προσαρμοσμένα παρέμεναν σε χαμηλά επίπεδα μη αναπτύσσοντας την ίδια ανθεκτικότητα. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην διαφορά των δύο τύπων καλλιέργειας (υγρής και στερεής). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω στην στερεή επιφάνεια του τροφίμου υπάρχουν και άλλοι μικροοργανισμοί με τους οποίους το παθογόνο ανταγωνίζεται για τα θρεπτικά συστατικά, ενώ στην υγρή καλλιέργεια (TSB) δεν

υπήρχαν καθώς ήταν αποστειρωμένο. Ωστόσο, η ανάπτυξη και η επιβίωση του παθογόνου μπορεί να επηρεαστούν και από άλλους παράγοντες όπως είναι οι περιβαλλοντικές συνθήκες. Υπάρχουν αρκετές μελέτες οι οποίες έχουν δείξει ότι τα βακτήρια που αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα παρουσιάζουν διαφορετική μεταβολική δραστηριότητα και χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με αυτά που αναπτύσσονται στην υγρή καλλιέργεια (Skandamis et al., 2000; Wilson et al., 2002). Επιπλέον υπάρχουν ενδείξεις ότι η μη κινητοποίηση των κυττάρων (αποικίες) μπορεί να οδηγήσει σε στενότερα όρια ανάπτυξης (Meldrum et al., 2003). Η διαφορά μεταξύ των ορίων ανάπτυξης ακινητοποιημένων και πλαγκτονικών κυττάρων αποδίδεται σε παράγοντες όπως η κυτταρική φυσιολογία, η διάθεση θρεπτικών ουσιών η διαθεσιμότητα οξυγόνου αλλά και η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων (Fuqua et al., 1994; Walker, 1998). Τα ευρήματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη επιβεβαιώνονται και από την έρευνα των Koutsoumanis et al. (2004), οι οποίοι απέδειξαν ότι οι ελάχιστες τιμές pH ανάπτυξης του *L. monocytogenes* σε υγρή καλλιέργεια βρέθηκαν να είναι 4,45 ενώ στο άγαρ ήταν 5,10. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η επίδραση των δομικών ιδιοτήτων των τροφίμων στην φυσιολογία των παθογόνων αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την αξιολόγηση του φαινομένου stress hardening και τον προσδιορισμό κινδύνου επιμόλυνσης του *L. monocytogenes* στα υγρά και στα στερεά τρόφιμα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, η παρούσα διπλωματική εργασία συνεισφέρει πολύτιμες πληροφορίες που σχετίζονται με την τύχη του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes* σε όξινες συνθήκες προσομοιάζοντας όσον το δυνατόν καλύτερα τις συνθήκες που επικρατούν σε βιομηχανική κλίμακα κατά την επεξεργασία μαριναρισμένων ιχθύων. Πιο συγκεκριμένα, πλαγκτονικά κύτταρα εκτέθηκαν σε χαμηλό όξινο pH αφού πρώτα είχαν στρεσοαριστεί στις ίδιες συνθήκες για 24 ώρες. Τα καταπονημένα κύτταρα παρουσίασαν αυξημένη ανθεκτικότητα σε σύγκριση με τα μη καταπονημένα κύτταρα (μάρτυρες) παρουσιάζοντας επίσης χαμηλότερα ποσοστά τραυματισμού. Για την καλύτερη προσομοίωση των συνθηκών σε βιομηχανική κλίμακα, επαναλήφθηκε το ίδιο πείραμα προχωρώντας ένα βήμα παρακάτω, ενοφθαλμίζοντας το cocktail στελεχών του *L. monocytogenes* σε πραγματικά μαριναρισμένα (με κιτρικό οξύ) φιλέτα τσιπούρας. Τα προσαρμοσμένα κύτταρα δεν έδειξαν σε αυτήν την περίπτωση ανθεκτικότητα στο χαμηλό pH της τσιπούρας. Τέλος, έγινε μελέτη της απόκρισης των πλαγκτονικών κυττάρων του *L. monocytogenes*, που είχαν προηγουμένως προσαρμοστεί σε οξύ, σε TSB με μεταλλικές πλάκες για τον σχηματισμό βιοϋμενίου. Τα προσαρμοσμένα κύτταρα αναπτύχθηκαν ελαφρώς περισσότερο από τα κύτταρα μάρτυρες στο TSB με ουδέτερο pH, ίσως επειδή τα πρώτα ανέπτυξαν ισχυρούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας εκφράζοντας γονίδια που ευνοούν την γρηγορότερη ανάπτυξη του βιοϋμενίου. Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes* είναι πολύ πιθανόν να αναπτύξει ανθεκτικότητα σε όξινη καταπόνηση κατά την επεξεργασία των αλιευτικών προϊόντων και συγκεκριμένα κατά την διαδικασία του μαριναρίσματος και η μη τήρηση των κανόνων υγιεινής πρακτικής θα έχει ως αποτέλεσμα την τελική επιμόλυνση του προϊόντος. Συνολικά, τα παραπάνω ευρήματα μπορεί να συμβάλλουν

στην αναθεώρηση των κρίσιμων ορίων σε προϊόντα χαμηλού pH (με κιτρικό οξύ), λαμβάνοντας υπόψιν την ικανότητα του *L. monocytogenes* να επιβιώνει και να προσαρμόζεται στις συνθήκες αυτές. Ωστόσο, περισσότερες έρευνες μελλοντικά θα πρέπει να εμβαθύνουν στην μελέτη του ίδιου του τροφίμου, αλλά και στην μελέτη των γονιδίων που εκφράζονται κατά το φαινόμενο ATR ώστε να κατανοήσουμε καλύτερα τους αμυντικούς μηχανισμούς που αναπτύσσει το *L. monocytogenes*. Επιπλέον, αρκετά χρήσιμη θα ήταν η περαιτέρω μελέτη των παραγόντων που μπορεί να επηρεάσουν την δημιουργία βιοϋμενίων καθώς και των γονιδίων που εκφράζονται κατά την διάρκεια σχηματισμού. Τα παραπάνω θα συνεισφέρουν όχι μόνο στην επιστημονική κοινότητα μία ολοκληρωμένη προσέγγιση της ασφάλειας των αλιευτικών προϊόντων αλλά θα παρέχουν επίσης και στην βιομηχανία την δυνατότητα τροποποίησης των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά την επεξεργασία τροφίμων για την μείωση του ανεπιθύμητου παθογόνου *L. monocytogenes* ώστε να παράγονται ελαφρώς μεταποιημένα τρόφιμα τα οποία θα είναι ασφαλή με αυξημένο εμπορικό χρόνο ζωής.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abee, T., & Wouters, J. A. (1999). Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1–2), 65–91. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00078-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00078-1)
- Anagnostopoulos, D., Parlapani, F., Tsara, E., Eirinaki, M., Kokioumi, D., Ampatzidou, E., & Boziaris, I. (2023). Effect of Physicochemical Characteristics and Storage Atmosphere on Microbiological Stability and Shelf-Life of Minimally Processed European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Fillets. *Foods*, 12(6), 1145. <https://doi.org/10.3390/foods12061145>
- Andrighetto, C., Lombardi, A., Ferrati, M., Guidi, A., Corrain, C., & Arcangeli, G. (2009). Lactic acid bacteria biodiversity in Italian marinated seafood salad and their interactions on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 20(5), 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.07.016>
- Arvaniti, M., Tsakanikas, P., Papadopoulou, V., Giannakopoulou, A., & Skandamis, P. (2021). *Listeria monocytogenes* Sublethal Injury and Viable-but-Nonculturable State Induced by Acidic Conditions and Disinfectants. *Microbiology Spectrum*, 9(3). <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01377-21>
- Ashie, I. N. A., Smith, J. P., Simpson, B. K., & Haard, N. F. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(2), 87–121. <https://doi.org/10.1080/10408399609527720>
- Blackman, I. C., & Frank, J. F. (1996). Growth of *Listeria monocytogenes* as a Biofilm on Various Food-Processing Surfaces. *Journal of Food Protection*, 59(8), 827–831. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.8.827>
- Boziaris, I. S., Stamatiou, A. P., & Nychas, G. J. E. (2013). Microbiological aspects and shelf life of processed seafood products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(5), 1184–1190. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5873>
- Brooks, J. D., & Flint, S. H. (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(12), 2163–2176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01839.x>
- Bryers, J. D. (2008). Medical biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(1), 1–18. <https://doi.org/10.1002/bit.21838>
- Busch, S. V., & Donnelly, C. W. (1992). Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1), 14–20. <https://doi.org/10.1128/aem.58.1.14-20.1992>
- Cairns, B. J., & Payne, R. J. H. (2009). Sudden increases in listeriosis rates in England and Wales, 2001 and 2003. *Emerging Infectious Diseases*, 15(3), 465–468. <https://doi.org/10.3201/eid1503.071432>

- Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2011.01.005>
- Chae, M. S., & Schraft, H. (2000). Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1–2), 103–111. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00406-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00406-2)
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22–32. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x>
- Conly, J., & Johnston, B. (2008). *Listeria*: A Persistent Food-Borne Pathogen. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 19(5), 327–328. <https://doi.org/10.1155/2008/702565>
- Dallmeyer, A. W., & Martin, S. E. (1990). Catalase, superoxide dismutase, and hemolysin activities and heat susceptibility of *Listeria monocytogenes* after growth in media containing sodium chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), 2807–2810. <https://doi.org/10.1128/aem.56.9.2807-2810.1990>
- Davis, M. J., Coote, P. J., & O’Byrne, C. P. (1996). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology*, 142(10), 2975–2982. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-10-2975>
- Delignette-Muller, M. L., Cornu, M., Pouillot, R., & Denis, J.-B. (2006). Use of Bayesian modelling in risk assessment: Application to growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 195–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.021>
- den Bakker, H. C., Manuel, C. S., Fortes, E. D., Wiedmann, M., & Nightingale, K. K. (2013). Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii* subsp. *coloradonensis* subsp. nov., isolated from a ranch. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt_9), 3257–3268. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.048587-0>
- den Bakker, H. C., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S., Stasiewicz, M. J., Burrell, A., Roof, S., Strawn, L. K., Fortes, E., Nightingale, K. K., Kephart, D., & Wiedmann, M. (2014). *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_6), 1882–1889. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052720-0>
- Doijad, S. P., Poharkar, K. V., Kale, S. B., Kerkar, S., Kalorey, D. R., Kurkure, N. V., Rawool, D. B., Malik, S. V. S., Ahmad, R. Y., Hudel, M., Chaudhari, S. P., Abt, B.,

- Overmann, J., Weigel, M., Hain, T., Barbuddhe, S. B., & Chakraborty, T. (2018). *Listeria goaensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(10), 3285–3291. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002980>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Ekonomou, S. I., & Boziaris, I. S. (2024). Fate of osmotically adapted and biofilm *Listeria monocytogenes* cells after exposure to salt, heat, and liquid smoke, mimicking the stresses induced during the processing of hot smoked fish. *Food Microbiology*, 117, 104392. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104392>
- FAO. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*. FAO. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55(3), 476–511. <https://doi.org/10.1128/mmbr.55.3.476-511.1991>
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health. *Journal of Food Protection*, 77(1), 150–170. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269–275. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>
- Gahan, C. G. M., & Hill, C. (1999). The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 50).
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008>
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., & Nychas, G.-J. (2014). Acquired acid adaptation of *Listeria monocytogenes* during its planktonic growth enhances subsequent survival of its sessile population to disinfection with natural organic compounds. *Food Research International*, 64, 896–900. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.044>
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J., Kačániová, M., Czaczyk, K., Ölmez, H., & Simões, M. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>

- Gimenez, B., & Dalgaard, P. (2004). Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1), 96–109. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02137.x>
- Goulet, V. (2001). Effect of Prevention Measures on Incidence of Human Listeriosis, France, 1987-1997. *Emerging Infectious Diseases*, 7(6), 983–989. <https://doi.org/10.3201/eid0706.010610>
- Goulet, V., Hedberg, C., le Monnier, A., & de Valk, H. (2008). Increasing Incidence of Listeriosis in France and Other European Countries. *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), 734–740. <https://doi.org/10.3201/eid1405.071395>
- Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y. Y., Gymoese, P., & Vogel, B. F. (2007). Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(10), 1165–1171. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.06.014>
- Gram, L., Trolle, G., & Huss, H. H. (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 4(1), 65–72. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(87\)90060-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90060-2)
- Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Milillo, S. R., den Bakker, H. C., Wiedmann, M., Swaminathan, B., & Sauders, B. D. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(6), 1280–1288. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.014118-0>
- Harvey, J., & Gilmour, A. (1992). Occurrence of *Listeria* species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland. *Journal of Applied Bacteriology*, 72(2), 119–125. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01812.x>
- Harvey, J., Keenan, K. P., & Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24(4), 380–392. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2006.06.006>
- Hefford, M. A., D'Aoust, S., Cyr, T. D., Austin, J. W., Sanders, G., Kheradpir, E., & Kalmokoff, M. L. (2005). Proteomic and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* 568. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(3), 197–208. <https://doi.org/10.1139/w04-129>
- Hill, C., Cotter, P. D., Sleator, R. D., & Gahan, G. M. (2002). Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. In *International Dairy Journal* (Vol. 12).
- Hood, S. K., & Zottola, E. A. (1995a). Biofilms in food processing. *Food Control*, 6(1), 9–18. [https://doi.org/10.1016/0956-7135\(95\)91449-U](https://doi.org/10.1016/0956-7135(95)91449-U)

- Hood, S. K., & Zottola, E. A. (1995b). Biofilms in food processing. *Food Control*, 6(1), 9–18. [https://doi.org/10.1016/0956-7135\(95\)91449-U](https://doi.org/10.1016/0956-7135(95)91449-U)
- Horlbog, J. A., Stevens, M. J. A., Stephan, R., & Guldimann, C. (2019). Global Transcriptional Response of Three Highly Acid-Tolerant Field Strains of *Listeria monocytogenes* to HCl Stress. *Microorganisms*, 7(10), 455. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100455>
- Huang, L., & Hwang, C.-A. (2012). In-package pasteurization of ready-to-eat meat and poultry products. In *Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging* (pp. 437–450). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857095718.3.437>
- Jay. (2005). Modern Food Microbiology. In *Modern Food Microbiology* (7th ed.). Springer US. <https://doi.org/10.1007/b100840>
- Jemmi, T., Pak, S.-I., & Salman, M. D. (2002). Prevalence and risk factors for contamination with *Listeria monocytogenes* of imported and exported meat and fish products in Switzerland, 1992–2000. *Preventive Veterinary Medicine*, 54(1), 25–36. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(02\)00017-X](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(02)00017-X)
- Kilinc, B., & Cakli, S. (2005). The determination of the shelf-life of pasteurized and non-pasteurized sardine (*Sardina pilchardus*) marinades stored at 4 °C. *International Journal of Food Science & Technology*, 40(3), 265–271. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00883.x>
- Kocot, A. M., & Olszewska, M. A. (2017). Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. *LWT*, 84, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.042>
- Kostaki, M., Chorianopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G.-J., & Giaouris, E. (2012). Differential Biofilm Formation and Chemical Disinfection Resistance of Sessile Cells of *Listeria monocytogenes* Strains under Monospecies and Dual-Species (with *Salmonella enterica*) Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2586–2595. <https://doi.org/10.1128/AEM.07099-11>
- Koutsoumanis, K. P., Kendall, P. A., & Sofos, J. N. (2003). Effect of Food Processing-Related Stresses on Acid Tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7514–7516. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7514-7516.2003>
- Koutsoumanis, K. P., Kendall, P. A., & Sofos, J. N. (2004). A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology*, 21(4), 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.11.003>
- Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1–2), 9–27. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00060-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00060-9)

- Lang Halter, E., Neuhaus, K., & Scherer, S. (2013). *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt_2), 641–647. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.036830-0>
- Lappin-Scott, H. M., & Costerton, J. W. (1989). Bacterial biofilms and surface fouling. *Biofouling*, 1(4), 323–342. <https://doi.org/10.1080/08927018909378120>
- Lasa, I., & Penadés, J. R. (2006). Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*, 157(2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.11.003>
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A. D., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S. M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M., & Allerberger, F. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(9), 2210–2214. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.017376-0>
- Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Tessaud-Rita, N., Aguilhon, C., & Lecuit, M. (2019). *Listeria thailandensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(1), 74–81. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003097>
- Leisner, J. J., Millan, J. C., Huss, H. H., & Larsen, L. M. (1994). Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed sugar-salted fish. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(5), 417–423. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01097.x>
- Leistner, L. (1992). APPLIED TECHNOLOGY Food preservation by combined methods. In *Food Research International* (Vol. 25).
- Lou, Y., & Yousef, A. E. (1997). Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4), 1252–1255. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.4.1252-1255.1997>
- Low, J. C., & Donachie, W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary Journal*, 153(1), 9–29. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(97\)80005-6](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(97)80005-6)
- Lund, E. K. (2013). Health benefits of seafood; Is it just the fatty acids? *Food Chemistry*, 140(3), 413–420. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.01.034>
- MARSHALL, K. C., STOUT, R., & MITCHELL, R. (1971). Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces. *Journal of General Microbiology*, 68(3), 337–348. <https://doi.org/10.1099/00221287-68-3-337>
- Meldrum, R. J., Brocklehurst, T. F., Wilson, D. R., & Wilson, P. D. G. (2003). The effects of cell immobilization, pH and sucrose on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at 10°C. *Food Microbiology*, 20(1), 97–103. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00083-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00083-7)

- Meredith E. Agle. (2006). *Biofilms in the Food Environment* (H. P. Blaschek, H. H. Wang, & M. E. Agle, Eds.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470277782>
- Meyer, B. (2003). Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 249–253. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00047-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00047-7)
- Miller, M. A., & Zachary, J. F. (2017). Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. In *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (pp. 2-43.e19). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00001-1>
- Nadell, C. D., Xavier, J. B., & Foster, K. R. (2009). The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(1), 206–224. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00150.x>
- NicAogáin, K., & O’Byrne, C. P. (2016). The Role of Stress and Stress Adaptations in Determining the Fate of the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* in the Food Chain. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01865>
- Norwood, D. E., & Gilmour, A. (1999). Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *Journal of Applied Microbiology*, 86(4), 576–582. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00694.x>
- Núñez-Montero, K., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Peraza, J., Pizarro-Cerdá, J., & Lecuit, M. (2018). *Listeria costaricensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(3), 844–850. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002596>
- O’driscoll, B., Gahan, C., & Hill, C. (1997). Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis Analysis of the Acid Tolerance Response in *Listeria monocytogenes* LO28. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2679–2685. <https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2679-2685.1997>
- Oikonomou, S. I. (2020). *Behavior and inhibition of Listeria monocytogenes during the processing and preservation of smoked trout fillets*. University of Thessaly.
- Papaioannou, E., Giaouris, E. D., Berillis, P., & Boziaris, I. S. (2018). Dynamics of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species and mixed-culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection challenges. *International Journal of Food Microbiology*, 267, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.020>
- PARISH, M. E., & HIGGINS, D. P. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in Low pH Model Broth Systems1. *Journal of Food Protection*, 52(3), 144–147. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.3.144>
- Parlapani, F. F., Meziti, A., Kormas, K. Ar., & Boziaris, I. S. (2013). Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and

- 16S rRNA gene analysis. *Food Microbiology*, 33(1), 85–89.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.001>
- Pilchová, T., Hernould, M., Prévost, H., Demnerová, K., Pazlarová, J., & Tresse, O. (2014). Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 35(1), 366–372.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.021>
- PIRIE, J. H. H. (1940). *Listeria*: Change of Name for a Genus Bacteria. *Nature*, 145(3668), 264–264. <https://doi.org/10.1038/145264a0>
- Poimenidou, S. V., Chatzithoma, D.-N., Nychas, G.-J., & Skandamis, P. N. (2016). *Adaptive Response of Listeria monocytogenes to Heat, Salinity and Low pH, after Habituation on Cherry Tomatoes and Lettuce Leaves*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165746>
- Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacquet, C., & Piffaretti, J.-C. (1992). Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a Single Species, *Listeria grayi*, with a Revised Description of *Listeria grayi*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(1), 171–174. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-1-171>
- ROCOURT, J., & GRIMONT, P. A. D. (1983). Notes: *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(4), 866–869. <https://doi.org/10.1099/00207713-33-4-866>
- Rodríguez-López, P., Saá-Ibusquiza, P., Mosquera-Fernández, M., & López-Cabo, M. (2015). *Listeria monocytogenes*-carrying consortia in food industry. Composition, subtyping and numerical characterisation of mono-species biofilm dynamics on stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 84–95.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.003>
- Ross, T., Rasmussen, S., Fazil, A., Paoli, G., & Sumner, J. (2009). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meats in Australia. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2–3), 128–137.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.007>
- Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S., & Broome, C. V. (1983). Epidemic Listeriosis — Evidence for Transmission by Food. *New England Journal of Medicine*, 308(4), 203–206.
<https://doi.org/10.1056/NEJM198301273080407>
- Seeliger, H. P. R., Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Grimont, P. A. D., & Jones, D. (1984a). NOTES *Listeria ivanovii* sp. nov. In *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*.
- Seeliger, H. P. R., Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Grimont, P. A. D., & Jones, D. (1984b). NOTES *Listeria ivanovii* sp. nov. In *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*.

- Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 407–413.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.054>
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573–583.
<https://doi.org/10.1016/J.LWT.2009.12.008>
- Skandamis, P., Tsigarida, E., & Nychas, G.-J. E. (2000). Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within a gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(1), 31–35. <https://doi.org/10.1023/A:1008934020409>
- SORRELLS, K. M., ENIGL, D. C., & HATFIELD, J. R. (1989). Effect of pH, Acidulant, Time, and Temperature on the Growth and Survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52(8), 571–573.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.8.571>
- Stephens, P. J., Cole, M. B., & Jones, M. V. (1994). Effect of heating rate on the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(6), 702–708. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb02822.x>
- Strawn, L. K., Fortes, E. D., Bihn, E. A., Nightingale, K. K., Gröhn, Y. T., Worobo, R. W., Wiedmann, M., & Bergholz, P. W. (2013). Landscape and Meteorological Factors Affecting Prevalence of Three Food-Borne Pathogens in Fruit and Vegetable Farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(2), 588–600.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02491-12>
- Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3–9. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3>
- The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. (2023). *EFSA Journal*, 21(12).
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>
- Tiganitas, A., Zeaki, N., Gounadaki, A. S., Drosinos, E. H., & Skandamis, P. N. (2009). Study of the effect of lethal and sublethal pH and aw stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 134(1–2), 104–112.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.016>
- Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1117–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x>
- Vanne, L., Karwoski, M., Karppinen, S., & Sjöberg, A. M. (1996). HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control*, 7(6), 263–276. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(96\)00064-3](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(96)00064-3)

- Verdos, G. I., Makrigiannis, A., Tsigaras, E., & Boziaris, I. S. (2019). Survival of food-borne bacterial pathogens in traditional Mediterranean anchovy products. *Journal of Food Safety*, 39(1). <https://doi.org/10.1111/jfs.12576>
- Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., & Diez-Gonzalez, F. (2011). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.021>
- Walker, S. (1998). Adenylates and adenylate-energy charge in submerged and planktonic cultures of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1–2), 107–113. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00126-3)
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., & den Bakker, H. C. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt_1), 286–292. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.070839-0>
- Wilson, P. D. G., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J. W. T., & Van Impe, J. F. (2002). Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2–3), 275–289. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00660-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00660-2)
- Wirtanen, G., & Salo, S. (2016). Biofilm Risks. In *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry* (pp. 55–79). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100155-4.00005-4>
- Zarei, M., Paknejad, M., & Eskandari, M. H. (2023). Sublethal chlorine stress promotes the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* serovars enteritidis and expression of the related genes. *Food Microbiology*, 112, 104232. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104232>
- Zilelidou, E. A., & Skandamis, P. N. (2018). Growth, detection and virulence of *Listeria monocytogenes* in the presence of other microorganisms: microbial interactions from species to strain level. *International Journal of Food Microbiology*, 277, 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.011>

ABSTRACT

The bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* is responsible for serious foodborne diseases that threaten public health globally. In fishery products, the possible presence of this microorganism originates either from human contamination or processing equipment or from the food itself, being able to adhere and produce biofilm on many food processing surfaces. *L. monocytogenes* provokes listeriosis, a serious foodborne disease that threatens the global public. In recent years, several outbreaks of listeriosis have been recorded in various foods, including seafood, mainly attributed to the non-rational Good Hygiene Practices (GHP) by the industry during processing (gutting, filleting, etc.). This has prompted the scientific community to determine the factors that potentially favor the survival of *L. monocytogenes* during fish processing since there are several indications that these bacteria exhibit the ability to respond to the presence of various environmental stresses. Thus, this master's Thesis aimed to study the fate of *L. monocytogenes* under acidic stresses during fish processing. Initially, the potential response of 6 strains (mixture) of *L. monocytogenes* previously stressed in TSB broth supplemented with citric acid to create an acidic environment (pH 3.7) in an acidic environment that mimics the conditions taking place in marinated fish fillets. The population of stressed cells was compared with that of non-stressed cells (controls) of the same strains. Results indicated that acid-adapted pathogen cells exhibited defense mechanisms to acidic stress conditions in the TSB medium since their populations were significantly higher than those of the control. More specifically, after a slight decrease at the first 4 h, the populations reached a plateau at 7.3 log cfu/g at 24 h, and then with a slight decrease to 6.81 log cfu/ml at 48 h. Then, *L. monocytogenes* biofilm growth was monitored in AISI-304 metal plates, 3*1*0.1cm in TSB broth and at T=15°C, from a mixture of cells previously exposed to

low pH (3.7). Acid-adapted cells could produce biofilm in TSB slightly faster than controls. Finally, to better simulate the conditions on an industrial scale, the first experiment was carried out inoculating acid-stressed (pH = 3.7 for 24 hours) and non-stressed *L. monocytogenes* cells (mixture of 6 strains) in a real fillet of marinated sea bream fillet with citric acid having a final pH of 4.1 packed under vacuum conditions. Our results showed that there is a significant difference between the in vitro study (liquid culture) and the real fish sample as there was not the same development of resistance as in the first experiment. The pathogen *L. monocytogenes* is likely influenced by its interaction and coexistence with other microorganisms that make up the natural microflora of fish. Overall, the present work shed light on *Listeria* survival in acidic environments in its planktonic form and during biofilm formation. At the same time, the findings trigger the need for further studies of (a) the food itself to determine the interactions between the other microorganisms and (b) at the molecular level to elucidate the expressed genes responsible for the development of these mechanisms and the expressed genes associated with the formation of the biofilm.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, biofilm, acid stress, acid tolerance response, foodborne pathogen.