

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Απόκριση του *Listeria monocytogenes* σε όξινη καταπόνηση προσομοιάζοντας
συνθήκες μαριναρίσματος ιχθύων»**

(Acid stress response of *Listeria monocytogenes* simulating fish marination process)

Τσάρα Ευαγγελία

ΒΟΛΟΣ 2022

**«Απόκριση του *Listeria monocytogenes* σε όξινη καταπόνηση προσομοιάζοντας
συνθήκες μαριναρίσματος ιχθύων»**

(Acid stress response of *Listeria monocytogenes* simulating fish marination process)

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) **Κορμάς Κωνσταντίνος (Δρ)**, Καθηγητής, Μικροβιακή Οικολογία Υδάτινου Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
- 3) **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**.

Στην οικογένεια μου...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, Καθηγητή Δρ Μποζιάρη Ιωάννη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, αποτελούμενη από τους κ. Κορμά Κωνσταντίνο και κα. Παρλαπάνη Φωτεινή, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ Αναγνωστόπουλο Δημήτριο που μου προσέφερε απλόχερα τις γνώσεις και την εμπειρία του και την Υποψήφια Διδάκτορα Συροπούλου Φαίδρα για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθεια της, καθώς επίσης και την υπόλοιπη επιστημονική ομάδα του εργαστηρίου για την αμέριστη συμπαράστασή της κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την οικογένειά μου, η οποία υπήρξε πάντα ένα ανεκτίμητο στήριγμα για μένα και στην οποία οφείλω όλη την διαδρομή των σπουδών μου, μέχρι σήμερα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* είναι υπεύθυνο για σοβαρές τροφιμογενείς ασθένειες, που αποτελούν παγκόσμια απειλή για τη δημόσια υγεία. Στα αλιευτικά προϊόντα, η πιθανή παρουσία του μικροοργανισμού αυτού προέρχεται είτε από επιμόλυνση από τον άνθρωπο από τον εξοπλισμό επεξεργασίας. Το *Listeria monocytogenes* είναι υπεύθυνο για μια σοβαρή τροφική ασθένεια, την λιστερίωση, που αποτελεί παγκόσμια απειλή για την δημόσια υγεία. Τα τελευταία χρόνια, έχουν καταγραφεί αρκετά κρούσματα λιστερίωσης σε μια ποικιλία τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων και των θαλασσινών, που αποδίδεται κυρίως στην μη τήρηση των Ορθών Υγιεινών Πρακτικών (Good Hygiene Practices-GHP) των εργαζομένων, κατά τα στάδια επεξεργασίας (εκσπλαχνισμός, φιλετοποίηση κ.λπ.). Τα παραπάνω ώθησαν την επιστημονική κοινότητα να προσδιορίσει τους παράγοντες που πιθανών ευνοούν την επιβίωση του *L. monocytogenes* κατά την επεξεργασία των αλιευμάτων, καθώς υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι το συγκεκριμένο βακτήριο παρουσιάζει την ικανότητα να ανταποκρίνεται σε διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις (στρες). Έτσι, η παρούσα εργασία είχε ως στόχο την μελέτη της πιθανής ανάπτυξης ανθεκτικότητας δύο στελεχών του *L. monocytogenes* που είχαν προηγουμένως στρεσαριστεί σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB με προσθήκη κιτρικού οξέος με στόχο την δημιουργία όξινου περιβάλλοντος (pH 3,7), προσομοιάζοντας τις συνθήκες που επικρατούν σε μαριναρισμένα φιλέτα ψαριών, σε βιομηχανική κλίμακα. Ο πληθυσμός των στρεσαρισμένων κυττάρων συγκρίθηκε με αυτόν μη καταπονημένων κυττάρων (μάρτυρες) των ίδιων στελεχών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα δύο στελέχη παρουσίασαν αμυντικούς μηχανισμούς/ανταπόκριση σε όξινες συνθήκες καταπόνησης στο θρεπτικό μέσο TSB, καθώς οι πληθυσμοί τους ήταν σημαντικά υψηλότεροι σε σχέση με τον μάρτυρα. Πιο συγκεκριμένα, μετά από μία ελαφρά

μείωση στις πρώτες 3 ώρες, οι πληθυσμοί έφτασαν σε ένα σταθερό επίπεδο στους 7 log cfu/g, χωρίς να μειώνονται στη συνέχεια. Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι το στέλεχος B165 έδειξε υψηλότερη ανθεκτικότητα σε αυτό το περιβάλλον σε σύγκριση με το στέλεχος B128. Γενικά, η παρούσα εργασία συνεισφέρει στην προσπάθεια κατανόησης της συμπεριφοράς του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε όξινα περιβάλλοντα, καθιστώντας παράλληλα αναγκαία την περαιτέρω μελέτη α) στο ίδιο το τρόφιμο και β) σε μοριακό επίπεδο για να διαλευκανθούν τα εκφραζόμενα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη αυτών των μηχανισμών.

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.1 Γενικά στοιχεία υδατοκαλλιεργειών	1
1.2 Διατροφική αξία ιχθύων	2
1.3 Αλλοίωση ιχθύων.....	2
1.3.1 Ειδικοί Αλλοιωγόνιοι Μικροοργανισμοί (EAM)	3
1.3.2 Παράγοντες που επιδρούν στην αύξηση και επιβίωση των EAM	4
1.4 Τεχνολογία εμποδίων	4
1.5 Μέθοδοι συντήρησης αλιευμάτων.....	5
1.5.1 Ψύξη	6
1.5.2 Όξυνση με κιτρικό οξύ	6
1.5.3 Συσκευασία vacuum	7
1.6 Απώλειες ιχθύων.....	7
1.7 Παθογόνα βακτήρια	7
1.7.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	8
1.8 Απόκριση σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (ATR).....	10
1.9 Σκοπός εργασίας.....	12
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	14
2.1 Στελέχη μικροοργανισμών	14
2.2 Προετοιμασία θρεπτικών υλικών	14
2.2.1 Tryptic Soy Agar supplemented with Yeast Extract (0,6% w/v)-TSYE Agar	15
2.2.2 Tryptic Soy Agar supplemented with Yeast Extract (0,6% w/v) and NaCl (5% w/v)-TSYE Agar with NaCl.....	15
2.2.3. Tryptic Soy Broth με προσθήκη κιτρικού οξέος - TSB.....	16
2.2.4 Αλατούχο διάλυμα (0,85% w/v)	16
2.3 Έκθεση σε συνθήκες όξινης καταπόνησης	16
2.4 Παρακολούθηση της πορείας του πληθυσμού του <i>Listeria monocytogenes</i> υπό συνθήκες στρες.....	17

2.5 Στατιστική ανάλυση.....	17
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	18
3.1 Ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε όξινο περιβάλλον σε κύτταρα που εκτέθηκαν για 8 ώρες.....	18
3.2 Ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε όξινο περιβάλλον σε κύτταρα που εκτέθηκαν 24 ώρες.....	21
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	26
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	28
6. ABSTRACT	31

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά στοιχεία υδατοκαλλιέργειών

Με τον όρο υδατοκαλλιέργεια εννοούμε την καλλιέργεια ζωικών ή φυτικών οργανισμών σε αλμυρά, υφάλμυρα ή γλυκά νερά, οι οποίοι αναπτύσσονται και αυξάνονται κάτω από καθορισμένες συνθήκες, ώστε να επιτυγχάνεται μια οικονομικά συμφέρουσα παραγωγή. Πιο αναλυτικά, οι υδατοκαλλιέργειες περιλαμβάνουν την εκτροφή ψαριών καρκινοειδών, μαλακίων και άλλων υδρόβιων ζωικών οργανισμών καθώς και την καλλιέργεια υδρόβιων φυτών (FAO, 2020).

Σύμφωνα με τον FAO (2020) οι υδατοκαλλιέργειες είναι ο ταχύτερα αναπτυσσόμενος παραγωγικός τομέας τροφίμων στον κόσμο. Πιο συγκεκριμένα, από τους 4 εκατομμύρια τόνους ετήσιας παραγωγής το 1980, έφτασε στους 114,5 εκατομμύρια τόνους το 2018, αξίας 263 δισεκατομμυρίων δολαρίων. Ο τομέας αυτός αποτελεί ήδη την κύρια πηγή των υδρόβιων τροφίμων και αναμένεται να συνεχίσει, καθώς ο παγκόσμιος πληθυσμός συνεχίζει να αυξάνεται, ενώ η παγκόσμια αλιεία έχει σταθεροποιηθεί στους περίπου 90 εκατομμύρια τόνους από την δεκαετία του '90 (FAO, 2020). Η συνεισφορά των υδατοκαλλιέργειών στην κατά κεφαλήν κατανάλωση υδρόβιων ζωικών τροφίμων αυξήθηκε από τα 9kg (ισοδύναμο ζωντανού βάρους) το 1961 σε 20,5kg το 2018, με μέσο ρυθμό περίπου 1,5% ετησίως (FAO, 2020). Η Κίνα αποτελεί την κύρια χώρα παραγωγής, με ποσοστό 35% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής το 2018, ενώ ακολουθεί η Ασία (34%), η Αμερική (14%) και η Ευρώπη (10%) (FAO, 2020).

Η Ελλάδα ξεκίνησε από νωρίς την προσπάθεια ανάπτυξης των υδατοκαλλιέργειών από το 1951, με την εισαγωγή γόνων ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) στον ιχθυογεννητικό σταθμό του ποταμού Λούρου. Ωστόσο, σήμερα η ελληνική παραγωγή ιχθύων χαρακτηρίζεται κυρίως από δύο σαρκοφάγα

είδη, την τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) των οποίων η συνολική παραγωγή είναι της τάξεως των περίπου 120.500 τόνων το 2019, εκπροσωπώντας το 49% της συνολικής παραγωγής των ιχθύων αυτών σε όλη τη Μεσόγειο (ΣΕΘ, 2020).

1.2 Διατροφική αξία ιχθύων

Τα ψάρια, παγκοσμίως, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη διατροφή. Η κατανάλωσή τους παρουσιάζει σημαντική αύξηση τα τελευταία χρόνια λόγω της ευρείας αναγνώρισης της υψηλής θρεπτικής τους αξίας, ενώ επικρατεί μια γενικότερη τάση προς την υγιεινή διατροφή (Alasalvar et al., 2002). Ο μυϊκός ιστός των ιχθύων χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας και ειδικότερα απαραίτητα αμινοξέα για τον ανθρώπινο οργανισμό, εξαιρετικά ποικίλλουσα περιεκτικότητα σε ω-3 και ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και πολύ μικρή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, κορεσμένα λίπη και χοληστερόλη (Lund, 2013) γεγονός που τα καθιστά μια εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ειδικά για τις νέες τάσεις διατροφής. Επίσης, αποτελούν πλούσια πηγή βιταμινών, κυρίως D και ανόργανων στοιχείων όπως το σελήνιο το οποίο έχει αντιοξειδωτική και αντιτοξική δράση (Lund, 2013).

1.3 Αλλοίωση ιχθύων

Παρά την υψηλή διατροφική τους αξία, τα θαλασσινά αποτελούν ένα από τα πιο ευπαθή προϊόντα, καθώς τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά υποβαθμίζονται με ταχείς ρυθμούς κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους, καθιστώντας τα μη αποδεκτά προς κατανάλωση σε συντομότερο χρονικό διάστημα σε σχέση με άλλα προϊόντα ζωικής προέλευσης (Ashie et al., 1996). Στην ουσία, η αλλοίωση των ιχθύων θεωρείται το φαινόμενο εκείνο που οδηγεί στην υποβάθμιση μίας γκάμας αισθητήριων χαρακτηριστικών όπως η γεύση, η οσμή, η εμφάνιση και η υφή και

συνεπώς στην απόρριψη του προϊόντος (Huis In't Veld, 1996). Η υποβάθμιση αυτήν είναι πολύ-παραγοντική και οφείλεται είτε σε ενδογενή ένζυμα (αυτόλυση) και σε χημικές αντιδράσεις οξειδωσης (τάγγιση), είτε σε δράση μικροοργανισμών (Ashie et al., 1996; Gram & Huss, 1996).

Το τελευταίο, αποτελεί την συχνότερη αιτία αλλοίωσης των αλιευμάτων (Gram & Huss, 1996). Εξαιτίας της χημικής τους σύστασης, όπως η υψηλή ενεργότητα νερού (a_w), η ποσότητα του μη πρωτεϊνικού αζώτου και το σχετικά υψηλό pH των νωπών ιχθύων, τα αλιευτικά προϊόντα χαρακτηρίζονται ως ένα ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Gram & Dalgaard, 2002; Gram & Huss, 1996). Οι μικροοργανισμοί αυτοί που λαμβάνουν μέρος στην αλλοίωση προέρχονται είτε από την αρχική μικροβιακή σύνθεση του ιχθύος, η οποία είναι αλληλένδετη με το φυσικό τους περιβάλλον, είτε από επιμόλυνση η οποία πραγματοποιείται συνήθως από τον άνθρωπο, τους χώρους και τον εξοπλισμό επεξεργασίας (Παρλαπάνη, 2013).

1.3.1 Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM)

Κατά τη συντήρηση και αποθήκευση, μόνο ένα μικρό ποσοστό του αρχικού μικροβιακού προφίλ του ιχθύος φθάνει σε υψηλά επίπεδα πληθυσμού που χαρακτηρίζει την μικροβιολογική αλλοίωση (~7-8 log cfu/g). Οι μικροοργανισμοί αυτοί ονομάζονται Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM) και παράγουν πληθώρα μεταβολιτών οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (π.χ. χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές) του προϊόντος και επομένως την απόρριψή του (Boziaris & Parlapani, 2017; Gram & Dalgaard, 2002; Gram & Huss, 1996). Η επικράτηση των μικροοργανισμών αυτών, άρα και των αντίστοιχων μεταβολιτών, εξαρτάται κυρίως από τις επικρατούσες συνθήκες της αποθήκευσης όπως είναι η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα αλλά και

από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών (Boziaris & Parlapani, 2017; Gram & Dalgaard, 2002; Gram & Huss, 1996).

1.3.2 Παράγοντες που επιδρούν στην αύξηση και επιβίωση των EAM

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αύξηση ή και την επιβίωση των EAM τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς. Στους πρώτους περιλαμβάνονται η δομή και η σύσταση των τροφίμων καθώς και οι φυσικοχημικές του ιδιότητες όπως το pH / οξύτητα και η ρυθμιστική του ικανότητα, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του (Eh), η ενεργότητα νερού (a_w) και οι αντιμικροβιακές ουσίες που πιθανόν περιέχει (Huis In't Veld, 1996; Μποζιάρης, 2019a). Στους εξωγενείς παράγοντες περιλαμβάνονται οι εξωτερικές συνθήκες συντήρησης και αποθήκευσης, όπως η σχετική υγρασία του χώρου αποθήκευσης, η θερμοκρασία και η περιβάλλουσα ατμόσφαιρα (αερόβιες συνθήκες, τροποποιημένη ατμόσφαιρα, κενό). Φυσικά, υπάρχουν και απροσδιόριστοι παράγοντες όπως η αλληλεπίδραση μεταξύ των μικροοργανισμών και παράγοντες που αφορούν την πιθανή κατεργασία των προϊόντων όπως η συσκευασία, ο τεμαχισμός, η παστερίωση κ.α. (Huis In't Veld, 1996; Μποζιάρης, 2019a).

1.4 Τεχνολογία εμποδίων

Η γνώση των παραπάνω παραγόντων που επηρεάζουν την αύξηση των μικροοργανισμών αποτελεί το πρώτο βήμα στην πρόβλεψη της πιθανότητας αλλοίωσης και της ασφάλειας ενός προϊόντος και κατά συνέπεια την διάρκεια ζωής τους. Το 1992 διατυπώθηκε η θεωρία των εμποδίων από τον Leistner (Leistner, 1992) κατά την οποία κάθε παρεμποδιστικός παράγοντας μπορεί να θεωρηθεί ως ένα εμπόδιο που μπορεί να επιβραδύνει την μικροβιακή αύξηση. Δεδομένου της υψηλής ευαισθησίας των αλιευτικών προϊόντων, διάφορες τεχνικές – μέθοδοι συντήρησης έχουν εφευρεθεί με σκοπό την αύξηση του εμπορικού χρόνου ζωής των ιχθύων. Στις

μέρες μας η βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιεί μία σειρά από παράγοντες όπως την θερμοκρασία (ψύξη, κατάψυξη), το pH (προσθήκη οξέων,), την aw (αφυδάτωση, προσθήκη άλατος ή ζάχαρης) την συσκευασία (τροποποιημένη ατμόσφαιρα, κενό) τα συντηρητικά κ.α. για να περιορίσει την αύξηση των μικροοργανισμών είτε παρατείνοντας τη φάση προσαρμογής ή μειώνοντας τον ρυθμό αύξησης ή και τα δύο. Ωστόσο, η ρύθμιση ενός παράγοντα σε μία τιμή ικανή να παρεμποδίσει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην ποιότητα του τροφίμου και αυτό γιατί αν χρησιμοποιηθεί ένα εμπόδιο η ιδιοσυγκρασία του θα πρέπει να είναι πολύ ισχυρή για να αποτρέψει/περιορίσει τη μικροβιακή ανάπτυξη. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιείται πλέον η πολύ-παραγοντική συντήρηση των τροφίμων κατά την οποία λαμβάνει χώρα ένας συνδυασμός 2-3 εμποδίων σε ένα τρόφιμο (Leistner, 1992). Για παράδειγμα, στο παστεριωμένο γάλα εφαρμόζεται η ψύξη και η συσκευασία. Η συνδυασμένη δράση πολλών εμποδίων έχει μεγάλη βιοτεχνολογική σημασία, καθώς επιτρέπει την εφαρμογή ηπιότερων εμποδίων με επαρκή αντιμικροβιακή δράση, χωρίς δυσάρεστες επιπτώσεις στην ποιότητα του προϊόντος (Jay, 2005).

1.5 Μέθοδοι συντήρησης αλιευμάτων

Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, η εφαρμογή των απαιτούμενων εμποδίων καθορίζει και τις μεθόδους συντήρησης οι οποίες πρέπει να εφαρμοσθούν. Κάποιες από τις παραδοσιακές μεθόδους συντήρησης αποτελούν η χαμηλή θερμοκρασία (ψύξη/κατάψυξη), η θέρμανση, η αφυδάτωση, η κάπνιση, η προσθήκη ουσιών όπως αλάτι, οργανικά οξέα (μαρινάρισμα) και διάφορες αντιμικροβιακές ουσίες, καθώς και συσκευασία vacuum, τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) (Boziaris et al., 2013). Άλλες καινοτόμες μέθοδοι συντήρησης είναι η εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης και η ακτινοβολία (Ashie et al., 1996).

1.5.1 Ψύξη

Με την εφαρμογή της ψύξης πραγματοποιείται επιβράδυνση της μικροβιακής ανάπτυξης των μικροοργανισμών και επιπλέον επιβράδυνση της χημικής και ενζυμικής δραστηριότητας. Το εμπόδιο για τους μικροοργανισμούς σε αυτήν την περίπτωση είναι η χαμηλή θερμοκρασία και συγκεκριμένα στην συντήρηση με ψύξη έχουμε τοποθετήσει τους ιχθύς σε θερμοκρασίες 0 – 17°C, με συνηθέστερη να είναι αυτήν στους 4 °C (Μποζιάρης, 2019b)

1.5.2 Όξυνση με κιτρικό οξύ

Η συντήρηση με όξυνση ή μαρινάρισμα πραγματοποιείται με προσθήκη οργανικών οξέων. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο χαμηλό pH που αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα ανάπτυξης μη οξύφιλων μικροοργανισμών, αλλά και στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των οργανικών οξέων (τροποποιούν τις συγκεντρώσεις πρωτονίων και των σχετικών ανιόντων στο κυτταρόπλασμα, μειώνουν το ενδοκυτταρικό pH, έχοντας την ικανότητα να διασχίζουν την κυτταρική μεμβράνη), τα οποία συνήθως είναι το οξικό οξύ (ξύδι), το κιτρικό οξύ (λεμόνι), το προπιονικό και γαλακτικό οξύ (Μποζιάρης, 2019b). Το κιτρικό οξύ είναι ένα ασθενές οργανικό οξύ που βρίσκεται στο εσπεριδοειδή. Είναι ένα φυσικό συντηρητικό και χρησιμοποιείται για να προσθέσει όξινη (ξινή) γεύση στα τρόφιμα και τα μη αλκοολούχα ποτά. Ενεργεί ως αντιοξειδωτικό. Το κιτρικό οξύ υπάρχει σε ποικίλα φρούτα και λαχανικά, αλλά συγκεντρώνεται κατά κόρον στα λεμόνια, όπου μπορεί να περιλάβει τουλάχιστον 8% του ξηρού βάρους των φρούτων. Σε θερμοκρασία δωματίου, το κιτρικό οξύ είναι μια άσπρη κρυστάλλινη σκόνη. Σαν πρόσθετο τροφίμων, χρησιμοποιείται ως συντηρητικό αλλά και αρωματική ουσία στο τρόφιμα και τα ποτά, ειδικά στα μη αλκοολούχα.

1.5.3 Συσκευασία vacuum

Το Vacuum Packaging είναι η διαδικασία κατά την οποία μειώνεται η μερική πίεση των ατμοσφαιρικών αερίων όπως το οξυγόνο O₂. Το εμπόδιο σε αυτή τη μέθοδο είναι η απουσία οξυγόνου που εμποδίζει την ανάπτυξη των αερόβιων μικροοργανισμών.

1.6 Απώλειες ιχθύων

Παρά τις μεθόδους συντήρησης που εφαρμόζονται στα αλιευτικά προϊόντα, η αλλοίωση των ιχθύων είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα βιωσιμότητας, αφού αποτελεί την πιο σημαντική αιτία απόρριψης των ιχθύων (Anagnostopoulos et al., 2022). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), περίπου το 35% της συνολικής αλιευτικής παραγωγής χάνεται κάθε χρόνο στην αλυσίδα εφοδιασμού τροφίμων εξαιτίας αυτών των προβλημάτων (FAO, 2020). Οι ιχθύες μπορούν να απορριφθούν συνήθως κατά την συλλογή, τον χειρισμό, την επεξεργασία, την συσκευασία, την διανομή εξαιτίας κακής υγιεινής, ακατάλληλης θερμοκρασίας και γενικότερα κακής διαχείρισης του προϊόντος, έχοντας ως αποτέλεσμα και οικονομικές απώλειες στην αγορά και στους λιανοπωλητές (Parlapani, 2021), ειδικότερα όταν αυτές αφορούν ανάκληση προϊόντων εξαιτίας ύπαρξης παθογόνου μικροοργανισμού. Οι περισσότεροι κίνδυνοι στην αλυσίδα θαλασσινών σχετίζονται με παθογόνα βακτήρια (Huss, 1997) και αποτελεί πλέον επιτακτική ανάγκη η σωστή εφαρμογή του συστήματος HACCP αλλά και η βαθύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς των παθογόνων.

1.7 Παθογόνα βακτήρια

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα αλιεύματα και τα προϊόντα τους είναι δυνατόν να επιμολυνθούν και με παθογόνους μικροοργανισμούς στα διάφορα στάδια

της παραγωγικής αλυσίδας εξαιτίας κακής διαχείρισης του τροφίμου, με αποτέλεσμα να είναι επικίνδυνα για την δημόσια υγεία. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και κυρίως η θερμοκρασία καθώς και οι αλληλεπιδράσεις με άλλους μικροοργανισμούς της φυσικής μικροβιακής σύνθεσης του ιχθύος επηρεάζουν αρκετά την ποσοτική και ποιοτική σύσταση των παθογόνων μικροοργανισμών (Huss et al., 2000; Skandamis & Nychas, 2002; Παρλαπάνη, 2013). Επομένως, τα ψυχρότροφα παθογόνα βακτήρια όπως είναι τα *C. botulinum* και *L. monocytogenes* σπάνια απομονώνονται από ψάρια ζεστού νερού. Γενικότερα, παθογόνα στελέχη *Vibrio spp.*, *Aeromonas spp.* και *C. botulinum type E* απαντώνται ελεύθερα στο περιβάλλον και μπορούν να βρεθούν στους ιχθύες συνήθως σε χαμηλούς πληθυσμούς. Υπάρχουν και άλλα παθογόνα βακτήρια όπως είναι το *Salmonella spp.* και στελέχη του *Escherichia coli* καθώς και άλλα τα οποία έχουν βρεθεί και σε ιχθύες. Κύριες αιτίες της παρουσίας τέτοιων παθογόνων στο ψάρι είναι η μόλυνση του περιβάλλοντος (αστικά απόβλητα) και η μη τήρηση των ορθών υγιεινών πρακτικών των εργατών στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας (Huss et al., 2000).

1.7.1 *Listeria monocytogenes*

Το *L. monocytogenes* είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο (Carpentier & Cerf, 2011; Μποζιάρης, 2019b). Αναπτύσσεται στους 1 - 45°C με ιδανική θερμοκρασία τους 30 - 35°C. Είναι ψυχρότροφος μικροοργανισμός, ο οποίος μπορεί να επιβιώσει σε διάφορες άλλες ακραίες καταστάσεις, όπως σε υψηλή αλατότητα ή/και χαμηλό pH. Αναπτύσσεται σε pH 4,1-9,6, με άριστο το 6-7, και αλάτι έως και 12 % (Carpentier & Cerf, 2011; Μποζιάρης, 2019b). Το *L. monocytogenes* είναι πολύ διαδεδομένο στη φύση και απαντάται στα φυτά, στο έδαφος, στο νερό και στον εντερικό σωλήνα πολλών ζώων αλλά και στα αλιευτικά προϊόντα κατά την επεξεργασία τους (Carpentier & Cerf, 2011; Μποζιάρης,

2019b), σχηματίζοντας στις επιφάνειες τροφίμων και στον εξοπλισμό που έρχεται σε επαφή με τα τρόφιμα βιοϋμένια (biofilm), τα οποία είναι συσσωρεύσεις κυττάρων σε σύνθετες δομές σε στερεές επιφάνειες.

Το βακτήριο αυτό σχετίζεται με την Λιστερίωση, μια σοβαρή τροφική ασθένεια με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας σε ανοσοκατασταλμένα άτομα, εγκύους, νεογνά και ηλικιωμένους (Carpentier & Cerf, 2011; Poimenidou et al., 2016). Έχει καταγραφεί ένας αξιοσημείωτος αριθμός κρουσμάτων αναγκάζοντας τις κυβερνήσεις και την βιομηχανία τροφίμων να λάβουν μέτρα με σκοπό την μείωση της συχνότητας της λιστερίωσης (Goulet, 2001). Σχετικά πρόσφατα, η συχνότητα των σποραδικών περιπτώσεων αυξήθηκε και πάλι στην Ευρώπη, ενώ στον Καναδά εμφανίστηκε ένα μεγάλο ξέσπασμα της ασθένειας το 2008, οδηγώντας στην ανάκληση μεγάλων ποσοτήτων τροφίμων (Cairns & Payne, 2009; Conly & Johnston, 2008; Goulet et al., 2008). Η πιο πρόσφατη αναφορά, για τα ετήσια κρούσματα λιστερίωσης δίνεται από τον EFSA για το έτος 2020 και αναφέρει 1.876 επιβεβαιωμένα κρούσματα ανθρώπινης λιστερίωσης. Το στέλεχος του *L. monocytogenes* ταυτοποιήθηκε ως ο υπαίτιος παράγοντας σε εννέα ισχυρά αποδεδειγμένες περιπτώσεις τροφογενούς μόλυνσης και σε επτά ασθενώς αποδεδειγμένες περιπτώσεις τροφογενούς μόλυνσης για το 2020, οι οποίες συνολικά επηρέασαν 120 άτομα στην Ευρωπαϊκή Ένωση με 83 περιστατικά τα οποία χρειάστηκαν εισαγωγή σε νοσοκομείο και 17 θανάτους. Τα 6 από τα ισχυρώς 30 αποδεδειγμένα περιστατικά λιστερίωσης προκλήθηκαν από ψάρια και αλιευτικά προϊόντα, 2 προκλήθηκαν από κρέας και προϊόντα κρέατος, και 1 από γαλακτοκομικά προϊόντα (European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control, 2021).

1.8 Απόκριση σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (ATR)

Οι μέθοδοι συντήρησης γίνονται όλο και πιο ήπιες (ελαφρώς αλατισμένα, μαριναρισμένα) με σκοπό να ανταπεξέρχονται στις απαιτήσεις του καταναλωτή για υψηλής ποιότητας και ελαφρώς επεξεργασμένα προϊόντα. Αυτά τα προϊόντα συνήθως βασίζονται στην χαμηλή θερμοκρασία ως μέθοδο συντήρησης, αποθήκευσης και διανομής και επομένως ο βασικότερος μικροβιολογικός κίνδυνος είναι οι ψυχρότροφοι και μεσόφιλοι μικροοργανισμοί (Abee & Wouters, 1999). Τα εμπόδια αυτά που χρησιμοποιούνται για την συντήρηση τροφίμων θεωρούνται ως μία σειρά διαφόρων στρες που υφίστανται οι μικροοργανισμοί. Για παράδειγμα, κατά την διάρκεια της κάπνισης ενός φιλέτου σολομού, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί δέχονται ωσμωτικό στρες (μείωση aw) και θερμικό στρες από το ψήσιμο και το κάπνισμα (αύξηση θερμοκρασίας). Ωστόσο, ένα φαινόμενο που ονομάζεται stress hardening, επιτρέπει την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών σε θανατηφόρες συνθήκες, μετά από έκθεση τους σε στρες που δεν είναι θανατηφόρο για τους παθογόνους μικροοργανισμούς (Lou & Yousef, 1997).

Ειδικότερα, οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει συστήματα μεταγωγής σήματος (Quorum Sensing) ως αντίδραση στις διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις (στρες), τα οποία ελέγχουν την συγχρονισμένη έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στους κυτταρικούς αμυντικούς μηχανισμούς και τα καθιστά ανθεκτικά όχι μόνο στο ίδιο στρες που δέχονται αλλά και σε άλλα περιβαλλοντικά στρες (Abee & Wouters, 1999; Koutsoumanis et al., 2003). Για παράδειγμα, οι Lou και Yousef (1997) μελέτησαν την ανθεκτικότητα του *L. monocytogenes* σε θανατηφόρες δόσεις οξέος (pH 3.5), αιθανόλης (17,5% v/v) υπεροξειδίου του υδρογόνου (0,1% w/v) και αλατιού (25% NaCl w/v) αφού πρώτα είχε εκτεθεί σε ηπιότερες δόσεις αιθανόλης (5%), pH (4,5) υπεροξειδίου του υδρογόνου (500ppm) και

αλάτι (7% NaCl). Επομένως, η απόδοση των μεθόδων συντήρησης ελαφρώς επεξεργασμένων προϊόντων θα πρέπει να αξιολογηθεί ειδικά όταν αφορά την πιθανότητα των παθογόνων μικροοργανισμών να προσαρμοστούν σε διάφορες συνθήκες στρες.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κατά την όξυνση των τροφίμων, η χρήση οξέος σε αδιάστατη μορφή μπορεί να εισέλθει στα μικροβιακά κύτταρα, και μέσα στο κυτταρόπλασμα να μειώσει το ενδοκυτταρικό pH έτσι κατά συνέπεια διαταράσσονται οι μεταβολικές δραστηριότητες. Ωστόσο, λόγω του μηχανισμού της ομοιόστασης του pH οι μικροοργανισμοί προσπαθούν να διατηρήσουν σταθερό το ενδοκυτταρικό τους pH αυξάνοντας το μέσω της διαδικασίας της πρωτεϊνοσύνθεσης (Hill et al., 2002).

Όσον αφορά το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes*, έχει αναπτύξει διάφορους κυτταρικούς μηχανισμούς για την προσαρμογή και επιβίωση στα όξινα περιβάλλοντα προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση του pH. Κάποιους από αυτούς περιλαμβάνουν την κατεύθυνση ιόντων H⁺ έξω από το κύτταρο (F₀F₁ ATPάσες), το σύστημα της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού (GAD), διαδικασία που αποδίδεται σε 3 γονίδια (GadA, GadB, GadC). Εκτός από τους παραπάνω μηχανισμούς έχουν αναφερθεί κάποια γονίδια (*lisR* και *lisK*) τα οποία κωδικοποιούν έναν ρυθμιστικό παράγοντα (σ^B) και την ιστιδίνη - κινάση. Πιο συγκεκριμένα, με την βοήθεια της ιστιδίνης - κινάσης (έκφραση γονιδίου *lisR*) το σύστημα αυτό έχει την ικανότητα αντίληψης των διάφορων μεταβολών του κυτταρικού περιβάλλοντος όπως το χαμηλό pH και εν συνεχεία αυξάνει την έκφραση του γονιδιώματος με την βοήθεια του ρυθμιστικού παράγοντα (έκφραση γονιδίου *lisK*) (Gahan & Hill, 1999; Hill et al., 2002).

Οι Koutsoumanis et al (2003) μελέτησαν την στατική φάση κυττάρων του *L. monocytogenes* σε θρεπτικό μέσο με ή χωρίς γλυκόζη όταν εκτίθενται σε διάφορους

στρεσογόνους παράγοντες όπως οξύ με pH (4 και 7), ωσμωτικό στρες (10,5 και 20,5% NaCl) και θερμοκρασία (-5°C έως 50°C) και στην συνέχεια εκτείθονταν σε ένα τελικό pH 3,5. Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν με γλυκόζη εμφάνισαν αυξημένη επιβίωση στο pH 3,5. Πειράματα επίσης έχουν γίνει και στα ίδια τα τρόφιμα, όπως σε ντοματίνια και φύλλα μαρουλιού, όπου οι Poimenidou et al. (2016) αξιολόγησαν στελέχη *L. monocytogenes* τα οποία είχαν τοποθετηθεί σε μαρούλι, ντοματίνια και TSBYE στους 5°C για 24 ώρες ή για 5 μέρες και στην συνέχεια μετά από μία σειρά έκθεσης σε ισχυρό στρες βρέθηκε ότι τα κύτταρα στα ντοματίνια εμφάνισαν υψηλή αντίσταση στο όξινο και ωσμωτικό στρες ενώ τα κύτταρα στο μαρούλι εμφάνισαν υψηλή ανθεκτικότητα στο θερμικό στρες. Ωστόσο, σε έρευνα των Carpentier και Cerf (2011) τα κύτταρα του *Listeria* που επέζησαν μετά από πολύμηνη αποξήρανση δεν εμφάνισαν κάποια διαφορά στην αντοχή σε όξινο και θερμικό στρες με τα μη ανθεκτικά κύτταρα.

Παρά τις δημοσιευμένες μελέτες που δείχνουν ότι το ελάχιστο pH για ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε εργαστηριακές συνθήκες είναι 4,4 με 4,5 (Parish & Higgins, 1989; Sorrells et al., 1989) άλλες μελέτες περιγράφουν την ικανότητα του παθογόνου να αντιδράει και να επιβιώνει και σε χαμηλότερες τιμές pH (Davis et al., 1996; O'driscoll et al., 1997). Συνεπώς, η εμπάθυνση της γνώσης στην συμπεριφορά του *L. monocytogenes* σε όξινες συνθήκες αποτελεί βασική προϋπόθεση για την αξιολόγηση και βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων.

1.9 Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να μελετήσει την πιθανής ανάπτυξη ανθεκτικότητας δύο στελεχών του *L. monocytogenes* σε ισχυρό χαμηλό pH που είχαν προηγουμένως στρεσοαριστεί στις ίδιες πειραματικές συνθήκες,

προσομοιάζοντας όσο το δυνατόν καλύτερα τις συνθήκες που λαμβάνουν χώρα σε βιομηχανική κλίμακα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Στελέχη μικροοργανισμών

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη που ανήκουν στο είδος *Listeria monocytogenes*, τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους -80°C σε beads και ανήκουν στα στελέχη B128 και B165. Για την προετοιμασία των στελεχών προηγήθηκε η φάση της αναζωογόνησής τους και έπειτα ο καθαρισμός τους. Ειδικότερα, με την βοήθεια του βακτηριακού κρίκου, ελήφθησαν δύο βακτηριακές αποικίες και υπό ασηπτικές συνθήκες μεταφέρθηκαν σε 9ml αποστειρωμένο Tryptone Soy Broth (TSB) (Neogen Culture Media, Heywood, UK). Ακολούθησε καλή ανάδευση με τον κρίκο και επώαση στους 37°C για 24h. Στη συνέχεια, οι φρέσκιες καλλιέργειες προετοιμάστηκαν κατάλληλα ώστε να είναι έτοιμες για εμβολιασμό. Πιο συγκεκριμένα, οι δύο καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε ξεχωριστούς σωλήνες Falcon χωρητικότητας 15ml το καθένα και φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στις 1.879 g σε φυγόκεντρο (Nuve, Turkey) για 5 min. Ακολούθησε απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 1 ml αλατούχο διάλυμα (0,85% w/v NaCl). Η συγκεκριμένη διαδικασία επανελήφθη 2 φορές και τελικά το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με 1ml αλατούχο διάλυμα. Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιείται με σκοπό την απομάκρυνση πιθανών υπολειμμάτων του θρεπτικού υλικού (σάκχαρα, πεπτίδια, αμινοξέα, άγαρ, κτλ.) για την απόκτηση καθαρών βακτηριακών κυττάρων.

2.2 Προετοιμασία θρεπτικών υλικών

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

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

Agar

Το TSA (Tryptic Soy Agar) είναι ένα θρεπτικό μέσο γενικής χρήσης που συστήνεται για χρήση σε ποιοτικές διαδικασίες (π.χ μέτρηση Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας σε ένα δείγμα) και για την μονοκαλλιέργεια μίας ευρείας γκάμας μικροοργανισμών. Περιέχει πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας οι οποίες παρέχουν άζωτο (N), αμινοξέα και πεπτίδια απαραίτητα για την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών. Το Yeast Extract αποτελεί επίσης ένα θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται είτε αυτούσιο είτε ως συμπλήρωμα για την καλλιέργεια ευκαρυωτικών (ζύμες) και προκαρυωτικών (βακτήρια) μικροοργανισμών, αντίστοιχα. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός των δύο προαναφερθέντων θρεπτικών μέσων. Σύμφωνα με το ISO 11290 το TSYE agar χρησιμοποιείται για την απαρίθμηση ζωντανών κυττάρων του *Listeria*, είτε πρόκειται για τραυματισμένα είτε για άθικτα κύτταρα. Συγκεκριμένα, σε μία φιάλη των 500ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 18,5gr θρεπτικού υλικού TSA και 3gr θρεπτικού υλικού YE σε 500ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15min και στην συνέχεια διάχυση του θρεπτικού υλικού σε τρυβλία Petri.

2.2.2 Tryptic Soy Agar supplemented with Yeast Extract (0,6% w/v) and NaCl

(5% w/v)-TSYE Agar with NaCl

Στο συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υλικά TSA και YE με την ίδια ακριβώς διαδικασία που περιεγράφηκε παραπάνω, με την μόνη διαφορά την προσθήκη NaCl (5% w/v), με σκοπό την απαρίθμηση των κυττάρων που δεν είχαν υποστεί καμία φθορά (intact). Έτσι, αφού είχαν προστεθεί σε φιάλη των 500ml το TSA και YE με τις ίδιες ακριβώς αναλογίες, προστέθηκαν και στην

συνέχεια 25gr NaCl. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15min και στην συνέχεια διάχυση του θρεπτικού σε τρυβλία Petri.

2.2.3. Tryptic Soy Broth με προσθήκη κιτρικού οξέος - TSB

Το TSB (Tryptic Soy Broth) αποτελεί πλούσιο θρεπτικό ζωμό (υγρό) γενικής χρήσης που χρησιμοποιείται κυρίως για τον εμπλουτισμό βακτηρίων. Περιέχει ουσίες που καταστέλλουν την ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηρίων και προάγουν την ανάπτυξη άλλων. Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν 3gr TSB και 0,64gr κιτρικό οξύ σε 100ml απιονισμένο νερό. Έχοντας στόχο το τελικό pH να είναι 3,7, χρησιμοποιήθηκε ψηφιακό πεχάμετρο και η μέτρηση γινόταν με εμβάπτιση του ηλεκτροδίου, και προστέθηκε HCL (υδροχλωρικού οξέος) κανονικότητας 1N, ώστε να ρυθμιστεί τελικά το pH σε αυτήν την τιμή. Τέλος, ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15min και στην συνέχεια ο διαχωρισμός 50ml TSB σε σωλήνες Falcon χωρητικότητας 50ml.

2.2.4 Αλατούχο διάλυμα (0,85% w/v)

Το αλατούχο διάλυμα παρέχει την ωσμωτική ρυθμιστική ικανότητα και χρησιμοποιείται στην διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων ως αραιωτικό μέσο. Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν 10,2 gr NaCl σε 1.200ml απιονισμένο νερό και μοιράστηκαν 9ml αλατούχου διαλύματος σε κάθε σωληνάκι. Έπειτα ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15min.

2.3 Έκθεση σε συνθήκες όξινης καταπόνησης

Για να συγκρίνουμε και να αξιολογήσουμε την τυχόν προσαρμογή των κυττάρων *Listeria*, αποφασίστηκε να ληφθούν κύτταρα που είχαν εκτεθεί για 8 και 24 ώρες στο TSB με pH 3,7 και προσθήκη κιτρικού οξέος και μετέπειτα να συγκριθούν με μη καταπονημένα κύτταρα μάρτυρες των ίδιων στελεχών. Ο πληθυσμός των

φρέσκων καλλιεργειών (24 ώρες, ~ 9 log cfu/g) αραιώθηκε για να είναι αντίστοιχος και συγκρίσιμος με αυτόν των στρεσαρισμένων καλλιεργειών (7,2 και 7,6 log cfu/g) μετά από 8 και 24 ώρες, αντίστοιχα. Όλα τα δείγματα (σύνολο 8) επώαστηκαν στους 8°C. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι συνθήκες επιλέχθηκαν με γνώμονα την όσο το δυνατόν καλύτερη προσομοίωση των συνθηκών που λαμβάνουν χώρα σε βιομηχανική κλίμακα σε μαριναρισμένα φιλέτα ψαριών.

2.4 Παρακολούθηση της πορείας του πληθυσμού του *Listeria monocytogenes* υπό συνθήκες στρες

Για την παρακολούθηση της πορείας του πληθυσμού του *Listeria monocytogenes* πραγματοποιούνταν δειγματοληψία κάθε 4 ώρες για συνολική διάρκεια 24 ωρών πιο συγκεκριμένα λαμβάνονταν υπό ασηπτικές συνθήκες 1 ml από κάθε δείγμα, πραγματοποίηση δεκαδικών διαδοχικών αραιώσεων σε 9ml αλατούχου διαλύματος και τέλος την εφαρμογή τεχνικής της επιφανειακής εξάπλωσης (επίστρωση) όγκου 0,1ml δείγματος, με την βοήθεια της πιπέτας, σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE με 0,6%YE αλλά και σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 5% NaCl. Η απαρίθμηση των αποικιών *Listeria monocytogenes* πραγματοποιούνταν μετά από επώαση των τρυβλίων στους 37°C σε επωαστικό θάλαμο για 24 ώρες.

2.5 Στατιστική ανάλυση

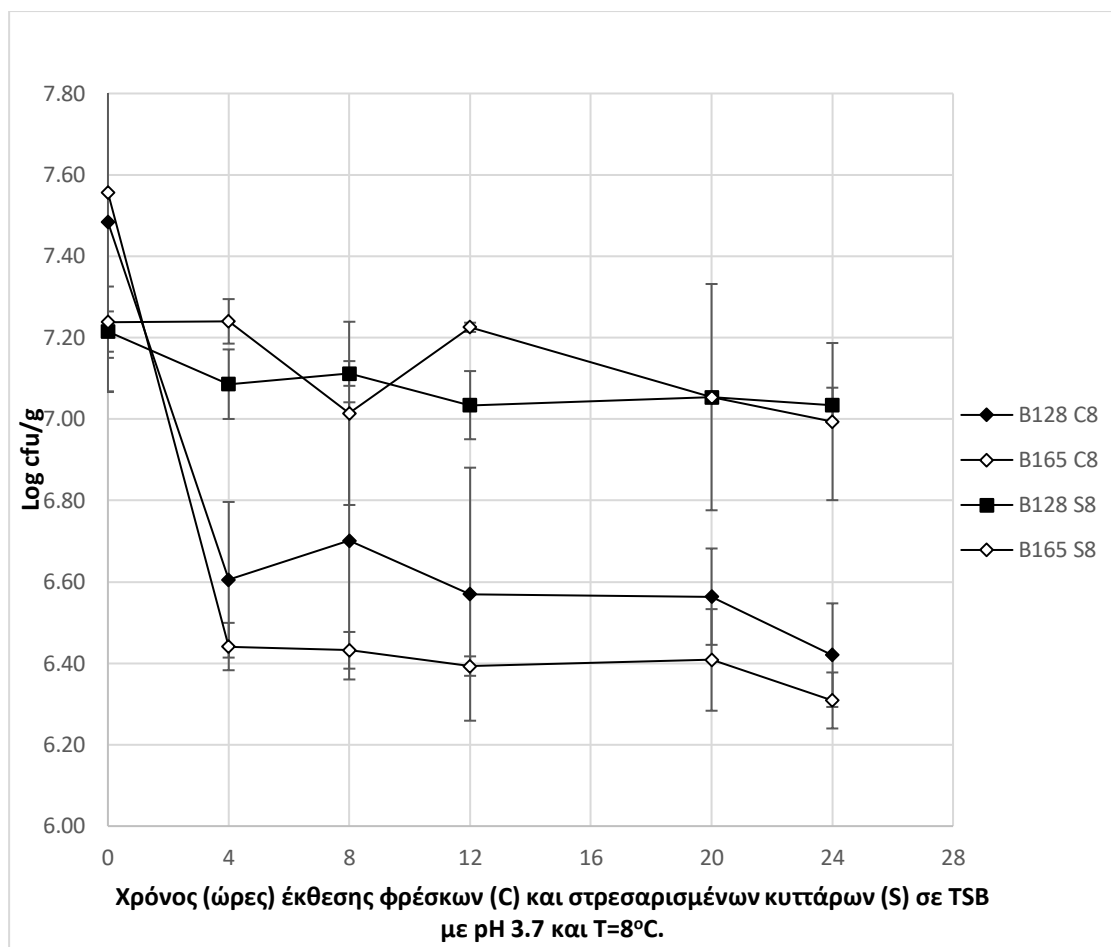
Η σύγκριση των μέσων πραγματοποιήθηκε με Ανάλυση μονής Διακύμανσης (one-way ANOVA) χρησιμοποιώντας το Tukey post hoc test σε επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0,05$. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό IBM® SPSS® statistics 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε όξινο περιβάλλον σε κύτταρα που εκτέθηκαν για 8 ώρες

Η τυχόν ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε όξινο περιβάλλον αξιολογείται με την βοήθεια της διαδικασίας της όξινης καταπόνησης (στρες). Στην συγκεκριμένη περίπτωση η όξινη καταπόνηση που δέχτηκαν τα κύτταρα ήταν η έκθεση τους σε θρεπτικό μέσο TSB το οποίο διακρινόταν από πολύ χαμηλό pH (3,7), προσθήκη κιτρικού (0,64% w/v) και θερμοκρασία 8°C, για 8 ώρες. Στην συνέχεια πάρθηκαν τα κύτταρα και τοποθετήθηκαν ακριβώς στις ίδιες συνθήκες. Τα κύτταρα αυτά παρακάτω κωδικοποιούνται ως S₈ (stressed), ενώ τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, δηλαδή δεν υπέστησαν καμία καταπόνηση αναφέρονται ως C₈ (control).

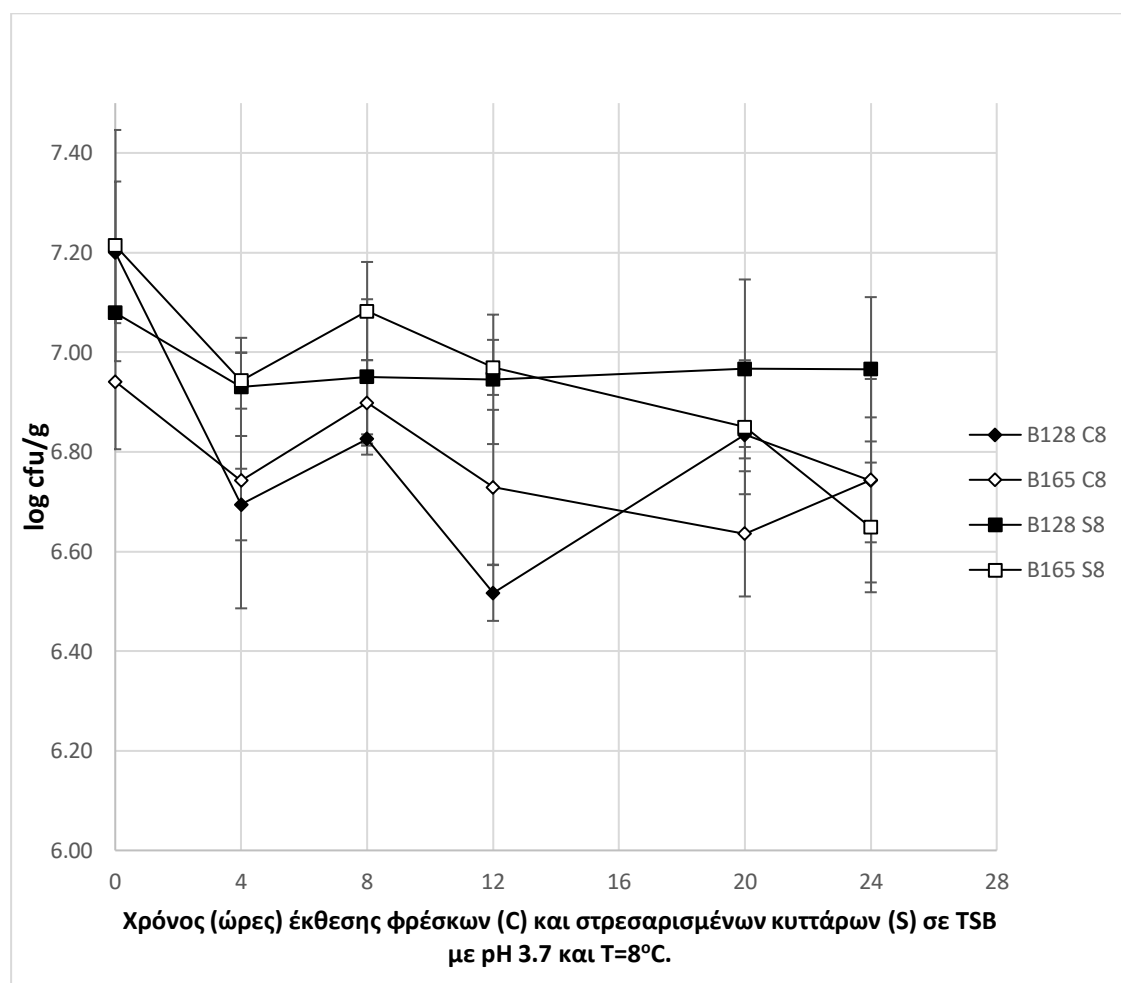
Στο Σχήμα 1 φαίνεται ο ρυθμός μείωσης των στελεχών των S₈ καθώς και των C₈ σε θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 0,6%.



Σχήμα 1. Επιβίωση μη καταπονημένων κυττάρων (C) *L. monocytogenes* σε TSB με pH 3.7 και T=8°C και επιβίωση στρεσαρισμένων κυττάρων (S) αφού έχουν εκτεθεί για 8 ώρες στις ίδιες συνθήκες. Αριθμημένα σε θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 0,6%.

Οι αρχικοί πληθυσμοί τόσο των S₈, όσο και των C₈ κυττάρων ήταν παρόμοιοι (~7,2 log cfu/g), με σκοπό την καλύτερη σύγκρισή τους. Και τα δύο στελέχη των S₈ παρουσίασαν αμυντικούς μηχανισμούς στις όξινες συνθήκες, καθώς οι πληθυσμοί τους ήταν σημαντικά υψηλότεροι σε σχέση με αυτούς των C₈ κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, οι πληθυσμοί των S₈ κυττάρων μετά από μία ελαφρά μείωση στις πρώτες 4 ώρες, έφτασαν σε σταθερά επίπεδο στους 7 log cfu/g χωρίς να μειωθούν τουλάχιστον για 24 ώρες. Αντίθετα, τα C₈ κύτταρα από την στιγμή της έκθεσης τους σε όξινες συνθήκες, εμφάνισαν απότομη μείωση έως και 1 log cfu/g τις πρώτες 4 ώρες και στην συνέχεια ο πληθυσμός σταθεροποιήθηκε στους 6,3 log cfu/g.

Στο σχήμα 2 απεικονίζεται επίσης ο ρυθμός μείωσης των στελεχών των S₈ καθώς και των C₈ αλλά σε θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 5%NaCl.



Σχήμα 2. Επιβίωση φρέσκων (C) *L. monocytogenes* σε TSB με pH 3.7 και T=8°C και επιβίωση στρεσαρισμένων κυττάρων (S) αφού έχουν εκτεθεί για 8 ώρες στις ίδιες συνθήκες. Αριθμημένα σε θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 5%NaCl.

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, χρησιμοποιήθηκαν δύο θρεπτικά υποστρώματα με σκοπό την απαρίθμηση των άθικτων κυττάρων (intact) με το TSAYE + 5% v/w NaCl και την απαρίθμηση όλων των κυττάρων με το θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 0,6%. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2 η διαφορά στην ανθεκτικότητα των στρεσαρισμένων και των φρέσκων κυττάρων δεν είναι ακριβώς ξεκάθαρη. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι τα ήδη στρεσαρισμένα κύτταρα, λόγω του ισχυρού όξινου στρες που δέχτηκαν, να υπέστησαν κάποιον τραυματισμό όπως

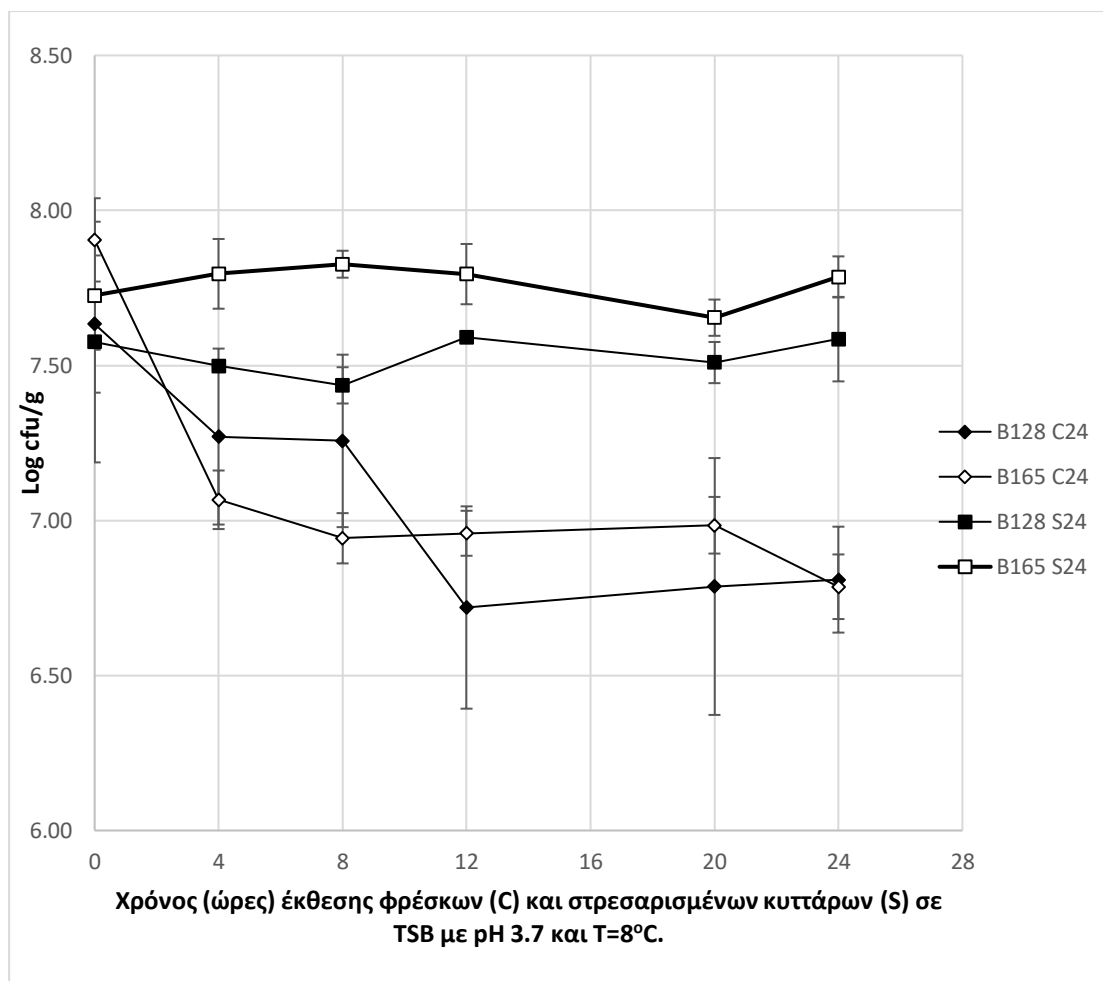
για παράδειγμα στην κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα να μειώθηκε ο πληθυσμός των άθικτων κυττάρων. Ωστόσο, δεν μπορούμε να γνωρίζουμε την τύχη των κυττάρων αυτών μετά τις 24 ώρες, δηλαδή το αν θα ανακάμψουν – θεραπευτούν ή πεθάνουν.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο πληθυσμός του στελέχους B165 των S_8 είναι αρκετά όμοιος με τον πληθυσμό των C_8 του ίδιου στελέχους (Σχήμα 2) με αποτέλεσμα να μην είναι ξεκάθαρη η ανάπτυξη κάποιας ανθεκτικότητας σε αυτήν την περίπτωση. Αντίθετα, το στέλεχος B128 και συγκεκριμένα ο πληθυσμός των στρεσαρισμένων κυττάρων μειώθηκε τις πρώτες 4 ώρες περίπου $0,2 \log \text{ cfu/g}$ και στην συνέχεια παρέμεινε σταθερός, ενώ τα κύτταρα μάρτυρες του στελέχους B128 τις 12 πρώτες ώρες μειώθηκαν κατά περίπου $1 \log \text{ cfu/g}$. Αυτό δείχνει κάποια ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο όξινο περιβάλλον, ωστόσο η διαφορά δεν είναι αρκετά ευδιάκριτη.

3.2 Ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε όξινο περιβάλλον σε κύτταρα που εκτέθηκαν 24 ώρες

Στην δεύτερη περίπτωση, τα κύτταρα που υπέστησαν όξινο στρες, στις ίδιες συνθήκες που περιεγράφηκαν παραπάνω, εκτέθηκαν για 24 ώρες. Τα κύτταρα αυτά κωδικοποιούνται ως S_{24} . Για να αξιολογήσουμε την τυχόν ανάπτυξη ανθεκτικότητας τοποθετήθηκαν φρέσκιες καλλιέργειες για σύγκριση (C_{24}) έχοντας παρόμοιο αρχικό πληθυσμό με αυτές των στρεσαρισμένων $\sim 7,7 \log \text{ cfu/g}$.

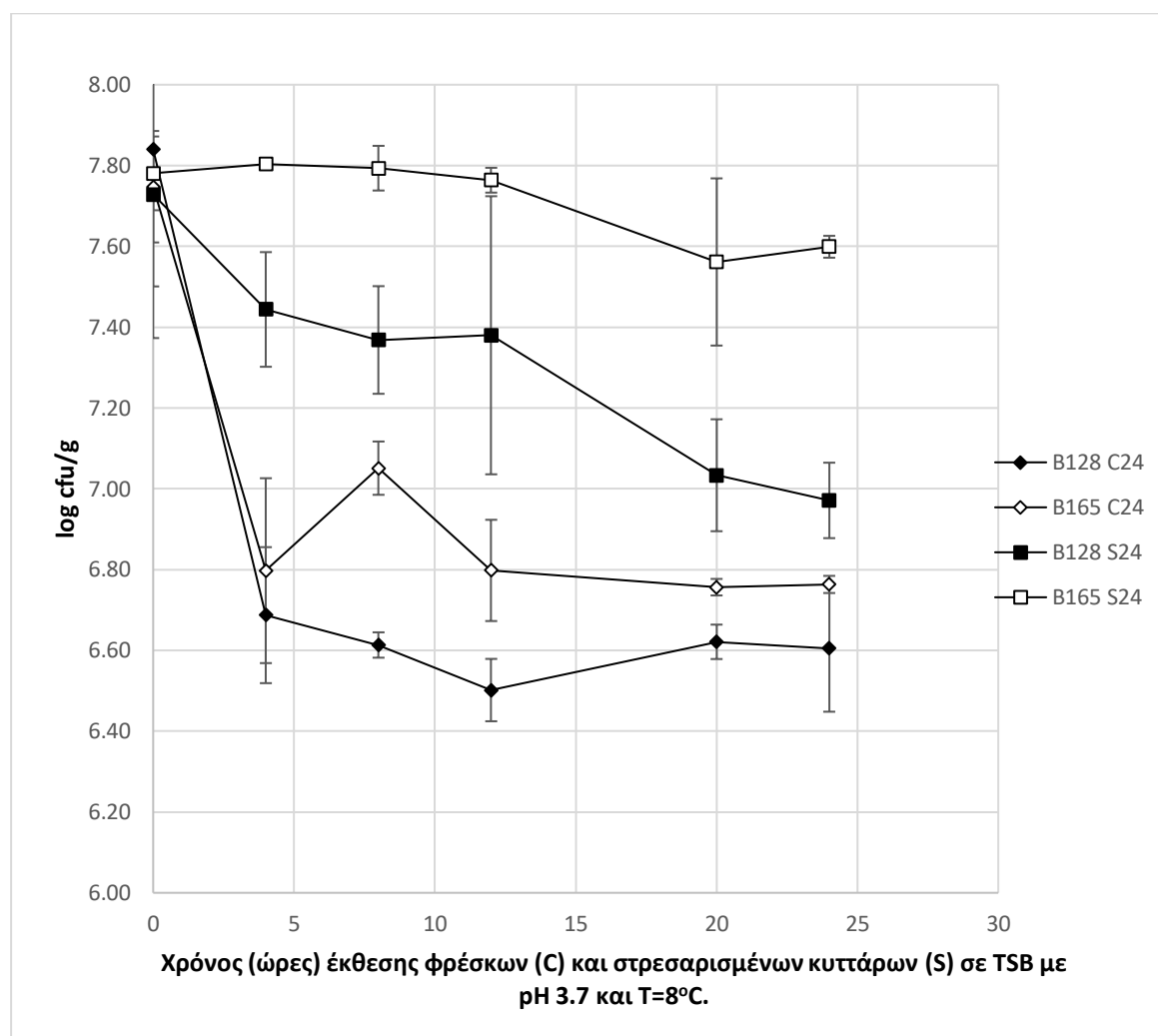
Στο Σχήμα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ρυθμού θανάτωσης μεταξύ των S_{24} κυττάρων και C_{24} σε θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 0,6%.



Σχήμα 3. Επιβίωση φρέσκων (C) *L. monocytogenes* σε TSB με pH 3.7 και T=8°C και επιβίωση στρεσαρισμένων κυττάρων (S) αφού έχουν εκτεθεί για 8 ώρες στις ίδιες συνθήκες. Αριθμημένα σε θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 0,6%.

Στο Σχήμα 3 είναι φανερή η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας σε όξινες συνθήκες και επομένως η προσαρμογή των S₂₄ κυττάρων, αφού από τις πρώτες ώρες και για 24 ώρες, ο πληθυσμός τους παραμένει σταθερός. Μάλιστα, οι πληθυσμοί των στελεχών B128 και B165 των S₂₄ κυττάρων, όχι μόνο δεν μειώθηκαν αλλά μετά από 12 ώρες έκθεσης τους αυξήθηκαν ελαφρώς οι πληθυσμοί τους στους 7,6 και 7,8 log cfu/g, αντίστοιχα. Τα C₂₄ κύτταρα και των δύο στελεχών εμφανίζουν απότομη μείωση έως και τις 8-12 ώρες και μετά σταθεροποιούνται. Ο πληθυσμός τους μειώθηκε περίπου κατά 1 log cfu/g.

Στο σχήμα 4 απεικονίζεται επίσης ο ρυθμός θανάτωσης των S₂₄ και C₂₄ κυττάρων στο θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 5% NaCl.



Σχήμα 4. Επιβίωση φρέσκων (C) *L. monocytogenes* σε TSB με pH 3.7 και T=8°C και επιβίωση στρεσαρισμένων κυττάρων (S) αφού έχουν εκτεθεί για 24 ώρες στις ίδιες συνθήκες. Αριθμημένα σε θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 5%NaCl.

Στο θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 5% NaCl όπου απαριθμήθηκαν τα άθικτα κύτταρα επίσης φαίνεται (Σχήμα 4) η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των στρεσαρισμένων κυττάρων έναντι των φρέσκων κυττάρων και μάλιστα η διαφορά είναι αρκετά ευδιάκριτη. Σε σύγκριση με το Σχήμα 2, στο Σχήμα 4 ο πληθυσμός των S₂₄ κυττάρων παραμένει σταθερός, ίσως γιατί τα κύτταρα κατάφεραν να αναπτύξουν τους κατάλληλους αμυντικούς μηχανισμούς σε όξινης συνθήκες μέσα σε 24 ώρες και να

καταφέρουν όχι μόνο να επιβιώσουν αλλά να παραμένουν και σταθερά κατά την διάρκεια αυτή. Αν και δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα σχετικά με την ανάπτυξη προσαρμογής σε ισχυρά χαμηλά pH μετά από έκθεση σε επίσης ισχυρό όξινο στρες, έχουν δημοσιευθεί παρόμοια αποτελέσματα όπως των Koutsoumanis & Sofos (2004) όπου αξιολόγησαν την ανθεκτικότητα του *Listeria monocytogenes* σε πολύ ισχυρό pH (3,5), μετά από έκθεση της σε ήπιο pH (5,5) για 90 λεπτά. Σε άλλες έρευνες βέβαια όπου μελετούν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του *L. monocytogenes* τα κύτταρα φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη αντοχή σε όξινες συνθήκες σε σχέση με την αντοχή σε οσμωτικές συνθήκες (Poimenidou et al., 2016; Tiganitas et al., 2009). Η έρευνα των Tiganitas et al, (2009) έδειξε επίσης ότι παίζει σημαντικό ρόλο η διάρκεια διαδοχής των διαφόρων στρες. Για παράδειγμα το διαδοχικό στρες είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερο ρυθμό θανάτωσης των κυττάρων από το απλό ή διπλό στρες που εφαρμόζεται ταυτόχρονα.

Στο θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE 5 % NaCl το στέλεχος B165 S₂₄ εμφανίζει ανθεκτικότητα, παραμένοντας σταθερός ο πληθυσμός του, ενώ το στέλεχος B128 S₂₄, ναί μεν η ανάπτυξη ανθεκτικότητας του στελέχους είναι ξεκάθαρη, ωστόσο στις 24 ώρες ο πληθυσμός του στελέχους μειώθηκε κατά 0,7 log cfu/g. Επίσης και στα C₂₄ κύτταρα, το στέλεχος B165 δείχνει να μειώνεται πιο αργά σε σχέση με το στέλεχος B128. Από τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύεται ότι το στέλεχος B165 έδειξε υψηλότερη ανθεκτικότητα στις συγκεκριμένες συνθήκες σε σύγκριση με το στέλεχος B128. Αυτό ίσως οφείλεται στην γενετική παραλακτικότητα μεταξύ των διαφόρων στελεχών του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes*, τα οποία μπορούν να αναπτύσσουν διαφορετικούς μηχανισμούς αντίστασης. Πράγματι, οι Makariti et al (2015) μελέτησαν την αντίδραση δύο στελεχών *L. monocytogenes* το C5 και το 6179

σε διάφορα είδη στρες, κυρίως όξινο και ωσμωτικό, αποδεικνύοντας ότι το C5 επηρεάστηκε λιγότερο σε σχέση με το 6179 εξαιτίας γονιδιακών ρυθμίσεων.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Εν κατακλείδι, η παρούσα μελέτη παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την αντίδραση δύο στελεχών του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* προς ένα ισχυρό όξινο στρες αφού πρώτα έχει εκτεθεί στις ίδιες συνθήκες για 8 και 24 ώρες, προσομοιάζοντας συνθήκες βιομηχανικής κλίμακας. Τα κύτταρα που είχαν ήδη εκτεθεί σε χαμηλό pH για 8 ώρες και 24 ώρες έδειξαν αυξημένη ανθεκτικότητα σε σχέση με τα μη καταπονημένα κύτταρα (μάρτυρες). Επίσης, τα κύτταρα που εκτέθηκαν για 24 ώρες είχαν καλύτερη ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε σχέση με αυτά που εκτέθηκαν για 8 ώρες, ίσως επειδή τα τελευταία δεν πρόλαβαν να αναπτύξουν ισχυρούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε σχέση με αυτά των 24 ωρών. Όσον αφορά τα στελέχη το B165 φάνηκε πιο ανθεκτικό από ότι το στέλεχος B128. Επίσης, τα αποτελέσματα έδειξαν την αντίσταση του στρεσαρισμένου πληθυσμού για τουλάχιστον 24 ώρες. Αυτά τα ευρήματα καταδεικνύουν ότι υπάρχει αυξημένη πιθανότητα προσαρμογής του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* κατά την επεξεργασία των ιχθύων (π.χ μαρινάρισμα) και η μη τήρηση των GHP θα οδηγήσει σε επιμόλυνση του προϊόντος. Η παρούσα μελέτη μπορεί να συνεισφέρει στην εμπάθυνση της γνώσης σχετικά με αυτά τα θέματα, λαμβάνοντας υπόψιν τον κίνδυνο επιβίωσης και προσαρμογής του *L. monocytogenes*. Ωστόσο, μελλοντικές έρευνες θα πρέπει να προσανατολιστούν σε περαιτέρω μελέτη στο ίδιο το τρόφιμο, αλλά και στην μελέτη των μηχανισμών αυτών που φαίνεται να παρουσιάζει το *L. monocytogenes* σε συνθήκες όξινου στρες, σε μοριακό επίπεδο (έκφραση γονιδίων) με στόχο την καλύτερη κατανόηση του φαινομένου ATR και τους μηχανισμούς που αναπτύσσει το βακτήριο αυτό. Επιπλέον, χρήσιμη θα ήταν η μελέτη πολλών διαφορετικών στελεχών του παθογόνου καθώς ο μηχανισμός ανταπόκρισης σε συνθήκες καταπόνησης εξαρτάται από το κάθε στέλεχος (strain-dependent). Τα δυο

προαναφερθέντα θα παρέχουν στην επιστημονική κοινότητα μία ολιστική προσέγγιση και ξεκάθαρη εικόνα όσο αναφορά τους κινδύνους που σχετίζονται με την ασφάλεια των αλιευτικών προϊόντων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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)
- Alasalvar, C., Shahidi, F., & Quantick, P. (2002). Food and Health Applications of Marine Nutraceuticals: a Review. In *Seafoods — Quality, Technology and Nutraceutical Applications* (pp. 175–204). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-09836-3_15
- Anagnostopoulos, D. A., Parlapani, F. F., & Boziaris, I. S. (2022). The evolution of knowledge on seafood spoilage microbiota from the 20th to the 21st century: Have we finished or just begun? In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 120, pp. 236–247). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.004>
- 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>
- Boziaris, I. S., & Parlapani, F. F. (2017). Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish. *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*, 61–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00006-6>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(12). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2021.6971>
- FAO. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*. FAO. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- 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).
- 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., & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 262–266. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00309-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00309-9)
- Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 33).
- 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).
- Huis In't Veld, J. H. J. H. I. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01139-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01139-7)
- Huss, H. H. (1997). Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. In *Food Control* (Vol. 8, Issue 2).
- Huss, H. H., Reilly, A., Karim, P., & Embarek, B. (2000). *Prevention and control of hazards in seafood*. www.elsevier.com/locate/foodcont
- Jay. (2005). Modern Food Microbiology. In *Modern Food Microbiology* (7th ed.). Springer US. <https://doi.org/10.1007/b100840>
- 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., & Sofos, J. N. (2004). Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 38(4), 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01491.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>
- 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>
- Makariti, I. P., Printezi, A., Kapetanakou, A. E., Zeaki, N., & Skandamis, P. N. (2015). Investigating boundaries of survival, growth and expression of genes associated with stress and virulence of *Listeria monocytogenes* in response to acid and osmotic stress. *Food Microbiology*, 45(PB), 231–244. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.023>
- 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>

- 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. (2021). Microbial diversity of seafood. *Current Opinion in Food Science*, 37, 45–51. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2020.09.005>
- 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>
- Skandamis, P. N., & Nychas, G.-J. E. (2002). Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 35–45. www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro
- 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>
- 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>
- Μποζιάρης, Σ. Ι. (2019a). Επιστήμη και Τεχνολογία τροφίμων. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ.
- Μποζιάρης, Σ. Ι. (2019b). Υγιεινή και Συντήρηση Εδώδιμων Αλιευμάτων. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ.
- Παρλαπάνη, Φ. (2013). *Ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί και η επίδραση τους στην ποιότητα και στην τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα* [Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος]. <https://doi.org/10.12681/eadd/46153>
- ΣΕΘ. (2020). *Ελληνική Υδατοκαλλιέργεια 2020*.

6. ABSTRACT

Fish spoilage is mainly due to the metabolic activity of microorganisms, which either come from the original microbiological profile of the fish or from contamination by humans and processing equipment. *Listeria monocytogenes* is responsible for severe food-borne illness (Listeriosis), which poses a global threat to public health. There are several outbreaks of listeriosis that have been previously reported in a variety of food products, including seafood, which is mainly attributed to the non-rational Good Hygiene Practice (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 seafood processing, since there are several indicates that these bacteria exhibit the ability to respond to the presence of environmental stress factors. Thus, the present work aimed study the potential response of 2 strains of *L. monocytogenes*, previously stressed in TSB broth supplemented with citric acid, in acidic environment that mimic the conditions taking place in marinated fish fillets. The population of stressed cells was compared with that of non-stressed cells of the same strains. Results indicated that both strains exhibited defense mechanisms to acidic conditions in TSB medium, since their populations were significantly higher to those of the controls. More specifically, after a slightly decrease at the first 3 h, the populations reached a plateau at 7 log cfu/g, not decreasing thereafter. It is also noteworthy that strain B165 showed higher adoptive response to this environment compared to strain B128. Overall, the present work shed light into *Listeria* survival to acidic environments, while the findings trigger the need for further studies in the food itself, but also at molecular level, to elucidate the genes expressed that are responsible for the development of these mechanisms.

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