



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**Ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε
μαλακά τυριά και ανταγωνιστικότητα των οξυγαλακτικών
βακτηρίων με την *Listeria monocytogenes***

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εισηγήτρια : Παπαδοπούλου Ευθαλία (15079)
Επιβλέποντες: Μπατρίνου Ανθιμία, Κοντελής Σπυρίδων

ΑΘΗΝΑ 2022

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

Αθήνα, 2021

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ανθμία Μπατρίνου Βιολόγος MSc, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

2. Επιβλέπων Καθηγητής: Σπυρίδων Κοντελής Γεωπόνος, PhD, Ακαδημαϊκός Υπότροφος, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

3. Μέλος επιτροπής: Βασίλης Σπηλιώτης Βιολόγος MSc, PhD, Καθηγητής Μικροβιολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

Δηλώνω υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του νόμου περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι είμαι η αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας πτυχιακής εργασίας, η οποία δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής, ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όλες οι πηγές (κάθε είδους, μορφής και προέλευσης) που χρησιμοποιήθηκαν για την συγγραφή της περιλαμβάνονται στην βιβλιογραφία. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, σε περίπτωση που αποδειχθεί διαχρονικά ότι η εργασία αυτή αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Παπαδοπούλου Ευθαλία

A handwritten signature in red ink on a yellow background. The signature is stylized and appears to be the name 'E. Papadopoulou'.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία αναλύεται η ικανότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων να ανταγωνίζεται την *Listeria monocytogenes* στα μαλακά τυριά. Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα τροφογενές παθογόνο, το οποίο προκαλεί την τροφογενή λοίμωξη της λιστερίωσης, και αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για της υγεία των καταναλωτών. Η εμφάνισή της στα τρόφιμα είναι πλέον σπάνια λόγω των προηγμένων συστημάτων ελέγχου που έχουν αναπτυχθεί, παρόλα αυτά όμως λόγω του μεγάλου ποσοστού θνησιμότητας από το οποίο διακατέχεται, καθώς και από την ανθεκτικότητα που την χαρακτηρίζει, αποτελεί σοβαρό ζήτημα για την βιομηχανία των τροφίμων. Το υπόστρωμα των μαλακών τυριών αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα ανάπτυξης της *L.monocytogenes*, και δεδομένου ότι η κατανάλωση του δεν απαιτεί αναθέρμανση, είναι επιρρεπές και επικίνδυνο για την εμφάνιση κυττάρων *L.monocytogenes*. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (Lactic-Acid-Bacteria, LAB) αποτελούν σημαντικό κομμάτι της φυσιολογικής μικροχλωρίδας των τυριών και γενικά των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η ύπαρξη τους για την διεκπεραίωση της ζυμωτικής διαδικασίας είναι απαραίτητη αφού είναι οι μικροοργανισμοί που ζυμώνουν την λακτόζη είτε αποκλειστικά προς γαλακτικό οξύ (ομοζυμωτικά βακτήρια), είτε προς γαλακτικό οξύ και άλλα προϊόντα (ετεροζυμωτική ζύμωση). Οι μεταβολές που προκαλεί στο τρόφιμο η δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι κρίσιμες, διότι από αυτές εξαρτάται η τελική βιοχημική κατάσταση του τροφίμου (pH), κάτι που ενδεχομένως να αποτελέσει εμπόδιο για την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών όπως είναι η *Listeria monocytogenes*. Η ανταγωνιστικότητα αυτή ωστόσο δεν είναι τόσο απλή, αποτελεί ένα πολύπλευρο ζήτημα που εξαρτάται από πολλές παραμέτρους και επηρεάζεται από πολλούς εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες. Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι να αναλύσει στο μέτρο του δυνατού, την ανταγωνιστικότητα που έχει η δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων απέναντι στην κυτταρική ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*, να παραθέσει τους παράγοντες από τους οποίους επηρεάζεται, και να κατανοήσει σε ποιες συνθήκες έχουμε παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παθογόνου *listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

In the present study, the ability of lactic acid bacteria to compete with *Listeria monocytogenes* in soft cheeses is analysed. *Listeria monocytogenes* is a food-borne pathogen, which causes food-borne listeriosis infection, and is a major health hazard for consumers, its occurrence in food is now rare due to the advanced control systems that have been developed, but nevertheless, due to the high mortality rate it is associated with, as well as its resistance, it is a serious issue for the food industry. The substrate of soft cheeses is an ideal substrate for the growth of *L. monocytogenes*, and since its consumption does not require reheating, it is susceptible and dangerous for the emergence of *L. monocytogenes* cells. Lactic Acid Bacteria (LAB) are an important part of the normal microflora of cheeses and dairy products in general. Their existence is essential for the fermentation process since they are the micro-organisms that ferment lactose either exclusively to lactic acid (homozye bacteria) or to lactic acid and other products (heterozye fermentation). The changes caused in the food by the action of the lactic acid bacteria are critical because the final biochemical state of the food (pH) depends on them, which may be an obstacle to the growth of pathogenic micro-organisms such as *Listeria monocytogenes*. However, this competitiveness is not so simple, it is a multifaceted issue that depends on many parameters and is influenced by many exogenous and endogenous factors. The aim of this thesis is to analyse, as far as possible, the antagonism that the action of the oxygenase bacteria has towards the cellular growth of *Listeria monocytogenes*, to list the factors by which it is influenced, and to understand under which conditions we have an inhibition of the growth of the pathogen *listeria monocytogenes*.

Περιεχόμενα

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
2.	<i>Listeria monocytogenes</i>	12
2.1	ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	12
2.2	ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ <i>LISTERIA</i>	13
2.3	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΗΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> 14	
2.4	ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	16
2.5	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	19
2.6	ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΤΗΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	23
2.7	ΠΗΓΕΣ ΤΗΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	27
2.8	ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗ	27
2.9	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗΣ	29
2.10	ΤΡΟΦΙΜΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΣΒΑΛΛΟΝΤΑΙ ΑΠΟ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	30
2.11	ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	39
2.12	ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΗ ΔΟΣΗ.....	40
2.13	ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΗΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	41
2.14	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΤΗΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΑ ΜΕ ΔΥΣΜΕΝΕΙΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	43
2.15	ΒΙΟΦΙΛΜ	49
2.16	ΜΕΤΡΑ ΕΛΑΤΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΗΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	51
3.	Οξυγαλακτικά Βακτήρια – Lactic Acid Bacteria (LAB)	55
3.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	55
3.2	ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	57
3.3	ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	57
3.4	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	58

3.5	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	63
3.6	ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	66
3.7	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΥΡΙΩΝ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	70
3.8	ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΥΝΗΘΩΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΥΡΙΩΝ	71
3.9	ΤΡΟΦΙΜΑ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΕΙΝΑΙ Η ΚΥΡΙΑΡΧΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ	75
3.10	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	77
3.11	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΣΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	78
3.12	ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΥ ΤΟΥ ΤΥΡΙΟΥ	81
3.13	ΕΠΙΚΡΑΤΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΤΟΥ ΤΥΡΙΟΥ.....	82
3.14	ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΓΙΑ ΑΠΟΦΥΓΗ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΥΣ	84
3.15	ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟ STRESS.....	84
3.16	ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ	90
4.	Ανταγωνιστικότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων με την <i>Listeria monocytogenes</i> σε μαλακά τυριά	96
4.1	ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΜΑΛΑΚΩΝ ΤΥΡΙΩΝ.....	96
4.2	ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΜΑΛΑΚΩΝ ΤΥΡΙΩΝ	96
4.3	ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ 1: ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ΚΑΙ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟ ΚΑΤΙΚΙ ΔΟΜΟΚΟΥ (ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ (Kagkli, Iliopoulos, Stergiou, Lazaridou, & Nychas, 2009))	97
4.4	ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ 2: ΠΕΙΡΑΜΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΗΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> subsp. <i>LACTIS</i> ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ΣΤΟ ΜΑΡΟΚΙΝΟ ΤΥΡΙ JBEN (ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ (Benkerroum, Oubel, Zahar, Dlia, & Filali-Maltouf, 2003))	103
4.5	ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ 3: ΠΕΙΡΑΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ (ΒΙΟΦΙΛΜ) ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΧΩΡΙΣ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ΣΤΑ	

ΜΑΛΑΚΑ ΤΥΡΙΑ (ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ (Speranza, Sinigaglia, & Corbo, 2009)) 109

4.6 ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ 4: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΑ ΙΤΑΛΙΚΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ: ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΕΝΑΝΤΙ ΣΤΗΝ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ ΣΤΑ ΜΑΛΑΚΑ ΤΥΡΙΑ (ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ (Panebianco, και συν., 2020))

115

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 122

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 125

Βιβλιογραφία 125

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι μια κατηγορία μικροβίων η οποία ταλαιπωρεί συχνά την βιομηχανία τροφίμων λόγω της επικινδυνότητάς που έχουν τα παθογόνα και την έξαρση που προκαλούν σε περίπτωση τροφογενών λοιμώξεων. Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα τροφογενές παθογόνο βακτήριο, το οποίο προσβάλλει κατά κύριο λόγο τον άνθρωπο, προκαλώντας του της ασθένεια της λιστερίωσης. Η ικανότητα του να αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες όπως είναι αυτές της ψύξης, το μεγάλο εύρος ανάπτυξης που έχει τόσο στην θερμοκρασία όσο και στις τιμές του pH, και η ικανότητά του να σχηματίζει ανθεκτικά πολυκυτταρικά υποστρώματα όπως είναι τα βιοφίλμ, τα οποία χαρακτηρίζονται από μεγάλη ανθεκτικότητα, και επιβιώνουν σε απολυμαντικά, καθιστούν το συγκεκριμένο παθογόνο ως ένα μεγάλο παράγοντα κινδύνου σε περίπτωση που ανιχνευθεί μέσα σε ένα χώρο επεξεργασίας τροφίμων, και κατ' επέκτασιν και στο ίδιο το τρόφιμο. Λόγω των παραπάνω δεδομένων, και σε συνεργασία με το γεγονός ότι στελέχη της *L.monocytogenes* απαντώνται αρκετά στο περιβάλλον και ευδοκιμούν σε υποστρώματα πολλών τροφών, είναι σημαντικό να δώσουμε μεγάλη προσοχή σε κρίσιμα σημεία στα οποία ενδέχεται να έχουμε εμφάνιση του μικροοργανισμού. Τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα και τα μαλακά τυριά είναι τρόφιμα τα οποία είναι επιρρεπή στην εμφάνιση της *L.monocytogenes* και είναι λογικό και λόγω υποστρώματος, των τυριών κυρίως, και λόγω της κατανάλωσης τους χωρίς την διαδικασία της αναθέρμανσης. Το γεγονός ότι η *L.monocytogenes* ευδοκιμεί στα μαλακά τυριά αποτελεί σημαντικό παράγοντα ανάλυσης της συνύπαρξης τους με τα οξυγαλακτικά βακτήρια που υπάρχουν στην μικροχλωρίδα όλων των τυριών. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι υπεύθυνα για όλες τις γαλακτικές ζυμώσεις των τυριών. Είναι οι μικροοργανισμοί που ζυμώνουν την λακτόζη προς παραγωγή γαλακτικού οξέος, αυξάνοντας την οξύτητα του τροφίμου και απελευθερώνοντας ενέργεια. Υπάρχουν οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία χαρακτηρίζονται ως ομοζυμωτικά, διότι παράγουν αυστηρά μόνο γαλακτικό οξύ, ενώ υπάρχουν και οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία είναι ετεροζυμωτικά, διότι εκτός από γαλακτικό οξύ έχουν την τάση να παράγουν και άλλα προϊόντα, όπως για παράδειγμα αρωματικές ενώσεις. Για την παρασκευή των τυριών αλλά και γενικότερα γαλακτοκομικών προϊόντων, η

ενσωμάτωση καλλιέργειών οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι απαραίτητη διότι μέσω της παστερίωσης του γάλακτος για λόγους ασφάλειας, αλλοιώνεται η φυσική μικροχλωρίδα του, επομένως μόνο με προσθήκη των κατάλληλων καλλιεργειών (καλλιέργειες εκκίνησης) μπορούμε να ξεκινήσουμε την διαδικασία της ζύμωσης. Οι καλλιέργειες εκκίνησης συνήθως αποτελούνται από ένα μίγμα βακτηριακών στελεχών και όχι από ένα απομονωμένο στέλεχος. Πέρα από τα προϊόντα που σχετίζονται τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου, όπως το γαλακτικό οξύ, το CO₂ και άλλες αρωματικές ενώσεις, σημαντικό ρόλο παίζει και η παραγωγή βακτηριοσινών από τα βακτήρια. Οι βακτηριοσίνες είναι αντιμικροβιακές ουσίες οι οποίες έχουν την ικανότητα να δρουν ανασταλτικά σε κάποια παθογόνα, όπως την *L.monocytogenes*, και να υποβοηθούν τα γαλακτικά βακτήρια έτσι ώστε να έχουν μικρότερο ανταγωνισμό σε θρεπτικά υλικά, και να διευκολύνεται η ανάπτυξη τους. Οι βακτηριοσίνες παίζουν καταλυτικό ρόλο και στην επιβίωση των οξυγαλακτικών από ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς, αλλά και στην ανταγωνιστικότητα που επιφέρουν οι ίδιοι, ως προς αυτούς. Παρόλο όμως που τα οξυγαλακτικά βακτήρια συνήθως είναι τα κυρίαρχα στα υποστρώματα των τυριών, υπάρχουν παράγοντες που απειλούν την δράση τους. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι, φυσικοί ανασταλτικοί παράγοντες του γάλακτος και αντιβιοτικά, απολυμαντικά και η ύπαρξη βακτηριοφάγων, οι οποίοι αποτελούν μια κατηγορία ιών που προσβάλλουν και καταστρέφουν τις κυτταρικές δομές των βακτηρίων. Πέρα από τους παραπάνω παράγοντες, σημαντική επιρροή στην δράση των οξυγαλακτικών μπορεί να προκαλέσει και η έκθεση τους σε στρεσογόνα περιβάλλοντα, όπως είναι το όξινο στρες, οξειδωτικό στρες, ψυχρό και θερμό στρες, ωσμωτικό στρες κ.α. Είναι λοιπόν, αδιαμφισβήτητο ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν να ανταγωνίζονται παθογόνους μικροοργανισμούς όπως η *L.monocytogenes* και να περιορίζουν την ανάπτυξη τους. Κάτι τέτοιο βέβαια δεν είναι πάντα δεδομένο, διότι η επικράτησή τους σχετίζεται με πολλούς παράγοντες, όπως είναι θερμοκρασία, το pH, η παροχή θρεπτικών υλικών, οι αρχικές ποσότητες των βακτηρίων της κάθε ανταγωνιστικής πλευράς, το είδος και ο συνδυασμός των στελεχών που χρησιμοποιούνται, καθώς και η βιοχημική κατάσταση στην οποία βρίσκεται η κάθε ανταγωνιστική πλευρά (βιοφίλμ ή πλαγκτονικά κύτταρα). Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες στις οποίες μελετάται το

συγκεκριμένο φαινόμενο ανταγωνιστικότητας, και σιγουρά είναι ένα πολύπλευρο ζήτημα το οποίο θα μελετάται εκτενώς και στην πορεία.

2. *Listeria monocytogenes*

2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η κατανομή των βακτηριδίων σε Gram θετικά και Gram αρνητικά και η διαπίστωση ότι τα Gram αρνητικά βακτήρια έχουν άμεση συσχέτιση με αρκετές νοσολογικές καταστάσεις που πιθανώς να ταυτίζονται με την λιστερίωση, ήταν ήδη γνωστό από το 1891 (Gray, 1960). Το 1924 ήταν η πρώτη φορά που έγινε απομόνωση και περιγραφή του μικροοργανισμού από τον Murray και τους συνεργάτες του στο πανεπιστήμιο του Cambridge. Η πρώτη ονομασία που δόθηκε τότε στο μικροοργανισμό ήταν *Bacterium monocytogenes*, και ο χαρακτηρισμός προήλθε από το γεγονός ότι η νόσος που προκαλούσε ο μικροοργανισμός είχε σαν τυπικό σύμπτωμα την μονοκυττάρωση. Έπειτα από έναν χρόνο, ένας ερευνητής ο Pirie κάνοντας πειράματα στην Ν. Αφρική απομόνωσε ένα παρόμοιο είδος μικροοργανισμού από γερβίλους *Tatera lobengulae*, (μικρά τρωκτικά που μετέδιδαν την πανώλη), και του έδωσε την ονομασία *Listerella hepatolytica*, διότι η λοίμωξη που προκαλούταν επέφερε συχνά σε βλάβες του ήπατος, ενώ το όνομα του γένους δόθηκε προς τιμήν του λόρδου Lister, ο οποίος θεωρείται πατέρας της αντισηψίας. (Παππά-Κονιδάρη, 1996).

Αργότερα διαπιστώθηκε ότι οι δύο μικροοργανισμοί, ο *Bacterium monocytogenes* και ο *Listerella hepatolytica* είναι ταυτόσημοι, οπότε και μετονομάστηκε ο μικροοργανισμός *Listerella monocytogenes*. Η συγκεκριμένη ονομασία επικράτησε για τα επόμενα 12 χρόνια μέχρι που το 1939 διαπιστώθηκε ότι το όνομα *Listerella* είχε ήδη δοθεί από το 1906 από τον Jahn σε μια ομάδα μυκήτων. Τέλος, η τελική ονομασία *listeria monocytogenes* δόθηκε από τον Pirie το 1940, και έγινε αποδεκτό από την διεθνή επιτροπή για την ταξινόμηση των Βακτηρίων (Παππά-Κονιδάρη, 1996).

2.2 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ *LISTERIA*

Η *Listeria* ως γένος κατατάσσεται στην οικογένεια *Listeriaceae*, και περιλαμβάνει 17 είδη, εκ των οποίων τα 9 περιεγράφηκαν από το 2009 και μετά, αν και έχουν ταυτοποιηθεί μόνο σε ορισμένες χώρες. Από τα 17 αυτά είδη, υπάρχει μια ξεχωριστή ομάδα έξι ειδών (*Listeria sensu strictu*) τα οποία μοιράζονται κοινά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως για παράδειγμα την ικανότητα ανάπτυξης σε χαμηλή θερμοκρασία. Αυτά τα έξι είδη είναι τα *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria grayi* και *Listeria monocytogenes* (Renato H. Orsi & Martin Wiedmann, 2016). Από αυτά τα είδη βακτηρίων μόνο η *Listeria monocytogenes* και η *Listeria ivanovii* είναι παθογόνα, με την *L.monocytogenes* να είναι παθογόνο του ανθρώπου, ενώ την *L.ivanovii* να αποτελεί παθογόνο των ζώων (Montville & Matthews, 2010). Τα υπόλοιπα 11 είδη (*Listeria sensu lato*) αντιπροσωπεύουν τρεις διακριτές μονοφυλετικές ομάδες, κάτι το οποίο μπορεί και να τα κατατάξει ως ξεχωριστά γένη. Αυτά λοιπόν τα τρία προτεινόμενα γένη περιέχουν μόνο μη παθογόνα είδη τα οποία είναι και μη κινητικά, και τα περισσότερα μπορούν να αναγάγουν τα νιτρικά, ενώ άλλα είναι αρνητικά στην δοκιμασία Voges-Proskauer, και είναι τα ακόλουθα: *Listeria marthii*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia*, and *Listeria booriae* (Renato H. Orsi & Martin Wiedmann, 2016).

Όσον αφορά τον χαρακτηρισμό των ειδών, οι αρχές δημόσιας υγείας έχουν απομονώσει στελέχη της *Listeria monocytogenes* και τα έχει κατηγοριοποιήσει σε επιμέρους τύπους του ίδιου είδους, προκειμένου να είναι πιο εύκολη η διερεύνηση των κρουσμάτων. Αυτό μπορεί να συμβεί με γενετική αποτύπωση ή οροαποτύπωση. Υπάρχουν 13 διαφορετικοί αντιγονικοί ορότυποι του παθογόνου *Listeria monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4ab και 7, ενώ από την διερεύνηση των κρουσμάτων έχει βρεθεί ότι το 95% των οργανισμών που απομονώνονται από θύματα λιστερίωσης ανήκουν σε τρεις συγκεκριμένους ορότυπους, τον 1/2a τον 1/2b και 4b (Adzitey & Huda, 2010). Υπάρχουν επίσης και τρεις γενεαλογικές γραμμές. Η γενεαλογική γραμμή I χαρακτηρίζεται ως πολύ παθογόνος, έχει επιδημικούς κλώνους και είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες

επιδημίες, η γενεαλογική γραμμή II χαρακτηρίζεται από μια μέση παθογένεια και σχετίζεται περισσότερο με περιστατικά σποραδικών κρουσμάτων και η γενεαλογική γραμμή III χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά χαμηλή παθογένεια και αποτελεί σπάνια αιτιολογία για ανθρώπινη ασθένεια (Adzitey & Huda, 2010). Το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών (CDC) των Ηνωμένων Πολιτειών έχει δημιουργήσει ένα online δίκτυο εργαστηρίων (PulseNet) το οποίο χρησιμοποιεί τυποποιημένες μεθόδους με σκοπό να υποδιαιρέσει τα τροφογενή παθογόνα βακτήρια, με την βοήθεια ηλεκτροφόρησης παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου σε πηκτή (PFGE). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ταχύτατη σύγκριση των προτύπων PFGE των τροφογενών παθογόνων από διαφορετικά σημεία του πλανήτη έτσι ώστε να ταυτοποιούν κρούσματα που έχουν κοινή πηγή (Montville & Matthews, 2010).

2.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Θερμοκρασία

Η *L.monocytogenes* είναι ένα τροφογενές παθογόνο βακτήριο το οποίο απασχολεί ως επί το πλείστον τον άνθρωπο, προκαλώντας του λιστερίωση. Ως προς το μέγεθός του είναι μικρό σε σχήμα κοκκοβάκιλλου ή βάκιλλου, είναι θετικό κατά Gram, μη σπορογόνο και δυνητικά αναερόβιο (Ανδρίτσου, 2008). Όσον αφορά τώρα στην βιωσιμότητα και την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στις διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες, η *Listeria monocytogenes* αναπτύσσεται σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, μεταξύ 1-45°C, όπου στις θερμοκρασίες μεταξύ 20-25°C είναι κινητό, ενώ όταν η θερμοκρασία ξεπερνά τους 30°C είναι ακίνητο (Ανδρίτσου, 2008). Είναι επομένως ένας ψυχρότροφος μικροοργανισμός, ο οποίος έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C, κάτι το οποίο τον καθιστά πολύ δύσκολο τροφιμογενές παθογόνο, εφόσον επιβιώνει και αναπτύσσεται και σε θερμοκρασίες ψυγείου αλλά και σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, ενώ θανατώνεται σε θερμοκρασίες άνω των 50°C, και έχει μειωμένη ανάπτυξη στις χαμηλές θερμοκρασίες. (Montville & Matthews, 2010).

pH

Οι τιμές pH στις οποίες αναπτύσσεται είναι από 4.4 έως 9.4, με βέλτιστη τιμή pH το 7.0 . Σε τιμές από 4.3 και κάτω μπορεί να μην αναπτύσσεται αλλά τα κύτταρα επιβιώνουν. Τα οργανικά οξέα μπορούν να δράσουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη της *L.monocytogenes* και να την παρεμποδίσουν, κάποια από αυτά είναι το οξικό το κιτρικό και το γαλακτικό τα οποία σε ποσοστό 0,1% μπορούν να την αδρανοποιήσουν. Η αντιλειτουργική δραστηριότητα του κάθε οργανικού οξέος έγκειται στον βαθμό διάσπασης του. Για παράδειγμα το κιτρικό και το γαλακτικό οξύ είναι λιγότερο επιβλαβή όταν βρίσκονται σε ένα συγκεκριμένο pH σε σχέση με το οξικό οξύ, ενώ το HCl είναι το λιγότερο δραστικό από όλα (Montville & Matthews, 2010).

Συγκέντρωση άλατος

Ακόμη, η *L.monocytogenes* είναι ανθεκτική στην ξηρασία και στην ψύξη, αναπτύσσεται σε υψηλά επίπεδα όταν βρίσκεται σε περιβάλλοντα μέτριας συγκέντρωσης άλατος (6,5%) (Montville & Matthews, 2010), ενώ επιβιώνει και σε μεγάλη συγκέντρωση αλάτων (δυνατότητα ανάπτυξης σε 10% NaCl και επιβίωση σε 20-30% NaCl) (Ανδρίτσου, 2008). Η μείωση της θερμοκρασίας μπορεί να επιδράσει θετικά στην ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού, αυξάνοντας την επιβίωση του σε περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας (Montville & Matthews, 2010).

Ενεργότητα ύδατος aw

Τελευταίος παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη της *L.monocytogenes* είναι η ενεργότητα ύδατος (a_w). η *L.monocytogenes* αναπτύσσεται καλύτερα όταν η ενεργότητα νερού είναι μεγαλύτερη από 0.97. Για τα περισσότερα στελέχη η κατώτατη a_w για ανάπτυξη είναι 0.93, αν και υπάρχουν ορισμένα στελέχη που αναπτύσσονται σε a_w 0.90. Παρόλο αυτά το βακτήριο είναι ικανό να επιβιώνει σε τιμές a_w μέχρι και 0.83 για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα. Η θερμοανθεκτικότητα του βακτηρίου αυξάνεται με την μείωση της a_w κάτι το οποίο δημιουργεί προβλήματα στους παραγωγούς των τροφίμων οι οποίοι συνδυάζουν χαμηλή a_w και θερμικούς χειρισμούς έτσι ώστε να διατηρήσουν την ασφάλεια του τροφίμου (Montville & Matthews, 2010).

2.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Η *L.monocytogenes* είναι ένα αερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, το οποίο έχει ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C, παρόλο που όπως έχει προαναφερθεί έχει αρκετά μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος (1-44°C) (Τυμπής , Πετράκης , & Κοντελής , 2016). Παρόλες τις απαιτήσεις τις αποτελεί ένα αρκετά κρίσιμο μικροοργανισμό διότι είναι σε θέση να ξεπερνά περιβαλλοντικούς φραγμούς που δεν ευνοούν την ανάπτυξη της, συμπεριλαμβανομένης την αναερόβιας κατάστασης, των μεταβολών του pH και της υψηλής μοριακότητας, και δημιουργεί αποικίες σε διάφορες περιβαλλοντικές περιοχές, όπως ο γαστρεντερικός σωλήνας, το έδαφος, το σιλό και η ιλύς. Η ικανότητα που παρουσιάζει το μικρόβιο να αναπτύσσεται σε ποικίλα περιβάλλοντα, τόσο εξωκυτταρικά όσο και ενδοκυτταρικά αποτελεί μια ενδιαφέρουσα ένδειξη ότι τα μεταβολικά χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού μπορεί να διαφέρουν κατά την διάρκεια αερόβιων, χαμηλών σε O₂ και αναερόβιων συνθήκων (Lungu, Ricke, & Johnson, 2008).

Διατροφικές απαιτήσεις της listeria monocytogenes

Για να ξεκινήσει η αναφορά των διατροφικών απαιτήσεων του μικροοργανισμού θα πρέπει πρώτα να αναφερθεί ότι δεν υπάρχει ένα συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα του οποίου τα συστατικά να ευνοούν την ανάπτυξη όλων των διαφορετικών ορότυπων του μικροοργανισμού της *L.monocytogenes*. Ανάλογα λοιπόν με τον τύπο του μικροοργανισμού μπορεί να ευνοείται ή να παρεμποδίζεται η ανάπτυξη του με βάση τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος που το περιβάλλει. Σε ένα γενικότερο φάσμα όμως πολλά στελέχη του μικροοργανισμού προτιμούν ως πηγή άνθρακα την γλυκόζη, παρότι απουσία γλυκόζης υποστηρίζεται η ανάπτυξη τους και από άλλους πολυσακχαρίτες όπως η φρουκτόζη, η μαννόζη, η σελοβιόζη, η τρεχαλόζη, η μαλτόζη, η γλυκερόλη, η γλυκοζαμίνη και η N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Έχουν και αρκετές απαιτήσεις σε αμινοξέα όπως η γλουταμίνη, η λευκίνη, η ισολευκίνη, η αργινίνη, η μεθειονίνη, η βαλίνη, η κυστεΐνη, η ριβοφλαβίνη, η βιοτίνη και η θειαμίνη, ενώ απαιτήσεις υπάρχουν και σε θειογαλακτικό οξύ (Lungu, Ricke, & Johnson, 2008). Ωστόσο έχει μελετηθεί ότι από όλα τα αμινοξέα που προαναφέρθηκαν μόνο η κυστεΐνη και η μεθειονίνη είναι απαραίτητα αμινοξέα για την ανάπτυξη της *L.monocytogenes* (Tsai & Hodgson, 2003). Μελέτες ακόμη έχουν

δείξει ότι με την ενσωμάτωση απαραίτητων βιταμινών και αυξητικών παραγόντων ενισχύεται η ανάπτυξη όλων των ειδών της *listeria* (Lungu, Ricke, & Johnson, 2008).

Μεταβολισμός υδατανθράκων ως πηγή ενέργειας

Η *L.monocytogenes* είναι περιορισμένη όσον αφορά τις πηγές άνθρακα που μεταβολίζει για να πάρει την ενέργεια που χρειάζεται, με την γλυκόζη να είναι η προτιμώμενη πηγή. Απουσία όμως γλυκόζης χρειάζεται να δράσει ως αποικοδομητής και να χρησιμοποιήσει εναλλακτικές πηγές ενέργειας προκειμένου και επιβιώσει. Έχει επομένως ζυμωτικό χαρακτήρα, μεταβολίζοντας τα σάκχαρα προς παραγωγή οξέων. Στους περισσότερους ζυμωτικούς μικροοργανισμούς ο αερόβιος μεταβολισμός υλοποιεί έναν ολόκληρο κύκλο τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) και παράγει ενδιάμεσα προϊόντα πυροσταφυλικού και κιτρικού οξέος τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα. Στην περίπτωση όμως της *L.monocytogenes* τα συνήθη παραγόμενα οξέα της ζύμωσης (πυροσταφυλικό, κιτρικό, ισοκιτρικό, ακετογλουταρικό, φουμαρικό, μηλικό) δεν υποστήριξαν την ανάπτυξη της, ακόμη και όταν προστέθηκαν ως υποστρώματα παρουσία γλυκόζης όπου παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρξε αύξηση στην ανάπτυξη της, σε σχέση με την ανάπτυξη που έχει έχοντας ως θρεπτικό μέσο μόνο την γλυκόζη. Στην προσπάθεια κατανόησης του μεταβολισμού των υδατανθράκων από την *L.monocytogenes* μελέτες κατέληξαν ότι ο κλασικός κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) στην συγκεκριμένη περίπτωση μπορεί να πραγματοποιηθεί και διαιρεμένος, χωρίς την μετατροπή του α-κετογλουταρικού σε σουκκινικό οξύ, και ότι η *L.monocytogenes* είναι ικανή να προάγει μία διαιρεμένη κυκλική οδό κιτρικού η οποία θα περιλαμβάνει ένα οξειδωτικό τμήμα (συνθάση του κιτρικού, ακονοσιταρική υδρατάση, ισοκιτριωμένη υδρογονάση) και ένα αναγωγικό τμήμα (μηλική αφυδρογονάση, φουμαρική υδρατάση και φουμαρική αναγωγάση). Αντίστοιχες περιπτώσεις βακτηρίων τα οποία δεν πραγματοποιούν τον συμβατικό κύκλο TCA έχουν παρατηρηθεί, όπως είναι η *Escherichia coli* καθώς και μύκητες όταν επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες. Επομένως κατανοούμε ότι στο μεταβολισμό των υδατανθράκων πέρα από την συμβατική οδό, ο κύκλος TCA μπορεί να προσαρμοστεί ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε περιβάλλοντος και να χρησιμοποιηθεί οξειδωτικά ή αναγωγικά για την παροχή αναβολικών βημάτων στην

ανάπτυξη ή την επιβίωση προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών όπως είναι η *L.monocytogenes* (Lungu, Ricke, & Johnson, 2008).

Μεταβολισμός αμινοξέων

Γενικά η *L.monocytogenes* έχει διαφορετικές απαιτήσεις σε αμινοξέα και άζωτο, ανάλογα το στέλεχος. Παρότι σαν βακτήριο δεν είναι ικανό να υδρολύει πρωτεΐνες προς απόσπαση αμινοξέων, παραδόξως έρευνα έδειξε ότι διαθέτει ένα γονίδιο το *perC* το οποίο κωδικοποιεί την αμινοπεπτιδάση C. Ακόμη η *L.monocytogenes* δεν είναι σε θέση ανεξάρτητα να αξιοποιήσει τις πρωτεΐνες του γάλακτος, συνδυαστικά όμως με κάποια είδη *Pseudomonass* τα οποία αποικοδομούν τις πρωτεΐνες αυτές σε μικρότερα πεπτίδια, μπορούν να λειτουργήσουν και να ευνοήσουν την ανάπτυξη τους. Ενδεχομένως λοιπόν, η *L.monocytogenes* μπορεί να αξιοποιήσει μεγάλες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, απλώς όχι ανεξάρτητα, χρειάζεται συνύπαρξη από εναλλακτικά εξωτερικά πρωτεολυτικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένων εγχώριων πρωτεϊνασών και πρωτεΐνασών που προέρχονται από άλλους οργανισμούς (Lungu, Ricke, & Johnson, 2008).

Μεταβολισμός του σιδήρου

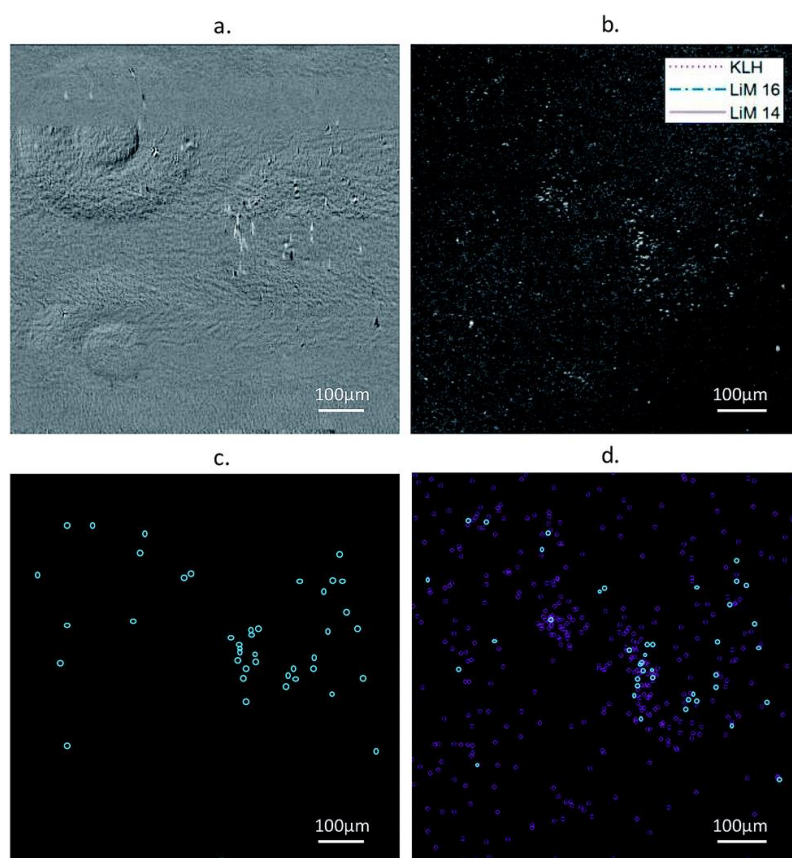
Ο σίδηρος είναι ένα ιχνοστοιχείο το οποίο είναι απαραίτητο για την επιβίωση και την ανάπτυξη όλων των έμβιων όντων. Συνεπώς και τα βακτήρια προκειμένου να μπορέσουν να δημιουργήσουν αποικίες και να προκαλέσουν παθογένεια σε κάποιο ξενιστή χρειάζονται μια πηγή σιδήρου. Ο σίδηρος υπάρχει σε περίσσεια στα σωματικά υγρά και των ανθρώπων και των ζώων, ωστόσο όμως τα βακτήρια δεν έχουν πρόσβαση σε αρκετά μεγάλες πηγές σιδήρου, συνεπώς έχουν αναπτύξει πολλά συστήματα μεταβολισμού, προκειμένου να μπορούν να χορηγηθούν το συγκεκριμένο μέταλλο. Οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται από το βακτήριο προκειμένου να προσλάβει σίδηρο σχετίζονται με τις υπάρχουσες συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα, όπως το χαμηλό οξυγόνο, η υψηλή ωσμωτικότητα, η έλλειψη πληθώρας θρεπτικών συστατικών, οι όξινες και αλκαλικές συνθήκες, υποβοηθούν το παθογόνο να εισβάλει στα κύτταρα του ξενιστή και να του επιφέρει νόσηση. Η *L.monocytogenes* έχει τέσσερα διαφορετικά συστήματα προκειμένου να μεσολαβήσει η απόκτηση του σιδήρου. Το πρώτο είναι η πρόσληψη του κιτρικού

σιδήρου από έναν επαγωγικό υποδοχέα κιτρικού, η δεύτερη είναι η αναγωγή του σιδήρου από μία επιφανειακά συνδεδεμένη αναγωγή, ή μια εξωκυτταρική αναγωγή, η τρίτη είναι η απόκτηση σιδήρου από μια πρωτεΐνη η οποία δεσμεύει την επιφανειακή μεταφορά το σιδήρου και τέλος η τέταρτη είναι με χρήση εξωγενών σιδεροφόρων ή μορίων που μοιάζουν με σιδεροφόρα. Συνεπώς η υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο (υπερσιδήρωση) όχι μόνο αυξάνει την εισβολή της *L.monocytogenes* στα κύτταρα, αλλά μπορεί να αυξήσει και την ευαισθησία των ασθενών στην λοίμωξη της λιστερίωσης, αυξάνοντας έτσι την μολυσματικότητα του μικροοργανισμού και μειώνοντας τη φαγοκυτταρική ικανότητα των μονοκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων (Lungu, Ricke, & Johnson, 2008).

2.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Η σοβαρότητα της ασθένειας της λιστερίωσης έχει κάνει την ανάγκη της άμεσης ανίχνευσης και ταυτοποίησης της πολύ μεγάλη. Για τον λόγο αυτό, έχουν τυποποιηθεί και εφαρμόζονται μικροβιολογικές διαδικασίες και έχουν θεσπιστεί κατευθυντήριες γραμμές ώστε οι κυβερνήσεις και η βιομηχανία τροφίμων να μπορούν να ελέγχουν τακτικά και άμεσα τα δείγματα των τροφίμων για την παρουσία της *Listeria monocytogenes*. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση η αναλυτική μέθοδος που αναφέρεται είναι το πρωτόκολλο εμπλουτισμού ISO 11290-1 για την ανίχνευση της *L.monocytogenes*. Ο έλεγχος για την παρουσία του παθογόνου καθορίζεται με τυποποιημένους εμπλουτισμούς με βάση την καλλιέργεια, ώστε να είναι δυνατή η ανάκτηση και η αύξηση των αρχικών χαμηλών συγκεντρώσεων του παθογόνου, ακολουθούμενη από ανίχνευση με μεθόδους εξαρτώμενες από την καλλιέργεια ή μοριακές μεθόδους. Συγκεκριμένα η σύνθεση των υποστρωμάτων θα πρέπει να σχεδιάζεται έτσι ώστε οι συνθήκες ανάπτυξης να είναι οι βέλτιστες, όχι μόνο για ανάπτυξη αλλά και για επιδιόρθωση των βλαβών και την έναρξη της ανάπτυξης των δυνητικά τραυματισμένων κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα να καταστέλλει την ανάπτυξη του ανταγωνιστικού μικροβιώματος που υπάρχει στο υπόστρωμα. Το ισχύον πρωτόκολλο ISO 11290-1:2017 για τον εμπλουτισμό της *L.monocytogenes* που παρασιτεί στα προϊόντα τροφίμων αποτελείται από εμπλουτισμό 24 ωρών σε μισό ζωμό Fraser, και στην συνέχεια υλοποίηση δευτερογενούς εμπλουτισμού σε πλήρη

ζωμό Fraser για 24 ώρες με ραβδισμό σε επιλεκτικές πλάκες ALOA και σε άλλο εκλεκτικό μέσο επιλογής για 48 ώρες μετά τα δύο στάδια εμπλουτισμού. Στην συνέχεια οι αποικίες που αποτελούν πιθανές αποικίες της *L.monocytogenes* πρέπει να ελέγχονται με αντιδράσεις επιβεβαίωσης. Το πρώτο στάδιο εμπλουτισμού πρέπει να διευκολύνει την ανάκτηση των τραυματισμένων κυττάρων που μπορεί να υπάρχουν στο προϊόν. Επομένως το πρωτογενές μέσο εμπλουτισμού περιέχει μόνο τις μισές συγκεντρώσεις των εκλεκτικών ενώσεων ακριφλαβίνης και ναλιδιξικού οξέος. Ακολουθεί δευτερογενής εμπλουτισμός Fraser ο οποίος είναι πλήρους ισχύος ζωμός και περιέχει διπλάσιες συγκεντρώσεις εκλεκτικών ενώσεων (Bannenberg, Abee, Zwietering, & Besten, 2021).



Εικόνα 1: Εικόνες αποτελεσμάτων από πείραμα με έγχυση *L.monocytogenes* 2×10^2 cfu/ml. Οι εικόνες λήφθηκαν 400 λεπτά μετά την έγχυση. a) Διαφορική εικόνα RO-SPRI, b) εικόνα διαφορικής μικροσκοπίας (DIC), c και d) αποτελέσματα της ανίχνευσης γεγονότων με την χρήση του Image J στις εικόνες a και b. Τα κύτταρα που ανιχνεύονται είναι χρωματισμένα με μπλε χρώση (Boulade, et al., 2019).

Πειραματική πορεία για απομόνωση και ταυτοποίηση της L.monocytogenes

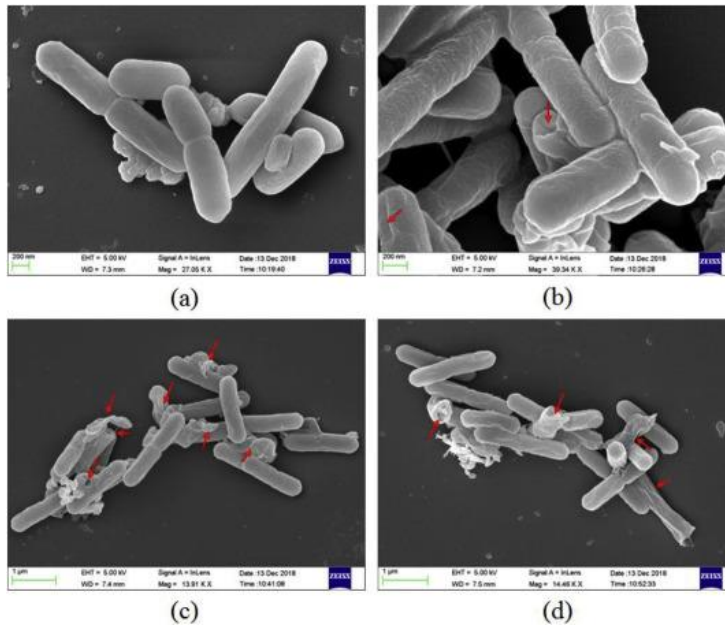
Παίρνουμε 25 g ή ml δείγματος και τα ομογενοποιούμε με 225ml LEB Broth Base και επώαζουμε στους 30°C, για 4 ώρες. Έπειτα πραγματοποιούμε προσθήκη εκλεκτικού παράγοντα στον εμπλουτισμό, και συνέχεια της επώασης στους 30°C μέχρι στις 24 ώρες. Στις 24 ώρες πραγματοποιούμε ανακαλλιέργεια σε Oxford Agar και PALCAM Agar και συνεχίζουμε την επώαση για ακόμη 24 ώρες, μέχρι ο συνολικός χρόνος επώασης να φτάσει τις 48 ώρες και έπειτα πραγματοποιούμε δεύτερη ανακαλλιέργεια σε Oxford Agar και PALCAM Agar. Τοποθετούμε ξανά για επώαση στους 35°C, για 24-48 ώρες. Λαμβάνουμε πέντε πιθανές αποικίες και τις μεταφέρουμε σε TSA-YE Aga, ακολουθεί επώαση στους 30°C, για 24-48 ώρες. Οι καλλιέργειες είναι έτοιμες να υποστούν βιοχημικές δοκιμές (Τυμπής , Πετράκης , & Κοντελής , 2016).

Buffered Listeria Enrichment Broth Base (LEB): 30,0g Tryptic Soy Broth, 6,0g Yeast Extract, 9,6g Di-sodium Hydrogen Phosphate, 1,35g Potassium Di-hydrogen Phosphate, 1,1g Sodium Pyruvate, 1000,0ml D.W.q.s.p / pH: 7,3 και αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά (Τυμπής , Πετράκης , & Κοντελής , 2016).

Oxford Agar (Oxford Listeria Selective Agar, Base): 23,0g peptone, 1,0g starch, 5,0g sodium chloride, 1,0g esculin, 0,5g ammonium iron (III) citrate, 15,0g lithium chloride, 13,0 g agar, 1000,0ml D.W.q.s.p/ pH: 7,0 και αποστείρωση στους 121°C, για 15 λεπτά (Τυμπής , Πετράκης , & Κοντελής , 2016).

PALCAM Agar (PALCAM Listeria Selective Agar, Base): 23,0g peptone, 3,0g yeast extract, 1,0g starch, 5,0g sodium chloride, 10,0g D(-)mannitol, 0,5g ammonium iron (III) citrate, 0,8g esculin, 0,5g dextrose, 15,0g lithium chloride, 0,08g phenol red, 13,0g agar, 1000,0ml D.W.q.s.p/ pH:7,2 και αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά (Τυμπής , Πετράκης , & Κοντελής , 2016).

Tryptic Soy Agar – Yeast Extract (TSA-YE Agar): 15,0g peptone from casein, 5,0g peptone from soymeal, 5,0g sodium chloride, 6,0g yeast extract, 15,0g agar, 1000,0ml D.W.q.s.p/ pH: 7,3 και αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά (Τυμπής , Πετράκης , & Κοντελής , 2016).



Εικόνα 2: Εικόνες ανάπτυξης της *L.monocytogenes* στους 25°C μετά από έκθεση σε διαφορετικά πρότυπα επεξεργασίας, α) μη επεξεργασμένα κύτταρα, β) κύτταρα επεξεργασμένα με πλάσμα για 2 λεπτά, γ) κύτταρα με προεπεξεργασία 15 λεπτών με υπέρηχους ακολουθούμενη από 2 λεπτά επεξεργασία με πλάσμα, δ) επεξεργασία με πλάσμα για 4 λεπτά (Pan, Zhang, Cheng, & Sun, 2019).

Πίνακας 1: Βιοχημικές Δοκιμές της *L.monocytogenes* (πηγή (Τυμπής, Πετράκης, & Κοντελής, 2016))

Δοκιμή	Αποτέλεσμα
Καταλάσης	Θετικό
Αναγωγής νιτρικών	Αρνητικό
Παραγωγής υδρόθειου	Αρνητικό
Διάσπασης της ουρίας	Αρνητικό
MR	Θετικό
Voges-Proskauer	Θετικό
Αποικοδόμησης Εσκουλίνης	Θετικό
Αποικοδόμησης Δεξτρόζης	Θετικό
Αποικοδόμησης Μαλτόζης	Θετικό
Αποικοδόμησης Μανιτόλης	Αρνητικό

Αποικοδόμησης Ραμνόζης	Θετικό
Αποικοδόμησης Ξυλόζης	Αρνητικό

2.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Λόγω της επικινδυνότητας που χαρακτηρίζει την ασθένεια της λιστερίωσης, η παρακολούθηση των κρουσμάτων σε όλο τον κόσμο είναι απαραίτητη, πράγμα που έχει ως προαπαιτούμενο οι τεχνικές με τις οποίες υπολογίζονται και καταμετρούνται οι αποικίες των στελεχών της *listeria* να είναι αρκετά ακριβείς και αποτελεσματικές έτσι ώστε να βοηθούν στο να έχουμε καλύτερη εικόνα των διάφορων επιδημιολογικών δεδομένων που συμβαίνουν κατά καιρούς. Η βελτίωση των τεχνικών απαρίθμησης είναι ένα ζήτημα μείζονος σημασίας διότι θα βοηθήσουν στην παροχή αξιόπιστων δεδομένων για ερευνητικές μελέτες στην προγνωστική μικροβιολογία, την επιδημιολογία, την ποσοτική εκτίμηση κινδύνου, καθώς και την ανάλυση ρουτίνας ή την παρακολούθηση σε μονάδες επεξεργασίας τροφίμων. Λόγω της αρκετά μικρής, ποσοτικά, επιμόλυνσης των τροφών από την *L.monocytogenes* <100 cfu/g, η ανίχνευσή και καταμέτρησή τους καθίσταται πιο δύσκολη (Aunolat & Besse, 2015).

Συμβατικές μέθοδοι : τεχνικές με βάση την καλλιέργεια

Πρότυπη μέθοδος αναφοράς

Η συγκεκριμένη μέθοδος συγκαταλέγεται στις άμεσες μετρήσεις, και πραγματοποιείται σε πλάκες, είναι αρκετά απλή και γρήγορη αλλά χαρακτηρίζεται από κακές επιδόσεις σχετικά με την ευαισθησία, την αναπαραγωγικότητα, την ανάκτηση των κυττάρων που έχουν υποστεί πίεση και μερικές φορές την επιλεκτικότητα. Έχει σχετικά υψηλή μεταβλητότητα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν κατά τον καθορισμό των ορίων ανοχής και των σχεδίων δειγματοληψίας για τον έλεγχο των τροφίμων (Aunolat & Besse, 2015).

Μέθοδοι καλλιέργειας που περιλαμβάνουν στάδιο ανακαλλιέργειας για αναζωογόνηση των κυττάρων

Ο τραυματισμός βακτηριακών κυττάρων, που προκύπτει εντός του τροφίμου από διάφορες πηγές, όπως η θέρμανση, η ξήρανση, η έκθεση σε οξέα και απολυμαντικά και έκθεση σε ωσμωτική πίεση δυσκολεύει ακόμη περισσότερο την απαρίθμηση μικρών ποσοτικά αποικιών της *L.monocytogenes*. Έτσι, λοιπόν, δημιουργήθηκε η ανάγκη για αναζωογόνηση των κυττάρων με χρήση ανακαλλιέργειας. Αναπτύχθηκε μια μέθοδος αναζωογόνησης στερεών μέσων (λεπτό στρώμα άγαρ). 5 ml επιλεκτικού μέσου από θρυπτικό άγαρ σόγιας (TSA) πάνω σε προσχηματισμένο και στερεοποιημένο τροποποιημένο θρεπτικό μέσο Oxford. Οι εκλεκτικοί παράγοντες που παρέχει το συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα διαχέονται αργά στο ανώτερο στρώμα, επιτρέποντας στα κύτταρα του TSA να υποστούν επιδιόρθωση, από τις πρώτες μέρες επώασης (Auvolat & Besse, 2015).

Μέθοδοι καλλιέργειας που περιλαμβάνουν βήμα συγκέντρωσης κυττάρων

Για απαρίθμηση μικρών αριθμών αποικιών μια άλλη μέθοδος είναι η συγκέντρωση των βακτηρίων που υπάρχουν με φυγοκέντρωση ή διήθηση με μεμβράνη. Για την πραγματοποίηση της μεθόδου καλό είναι να ελέγχεται η απόδοση της μεθόδου στα κομμάτια της ευαισθησίας, της εκλεκτικότητας, της γραμμικότητας και της επαναληψιμότητας. Η τεχνική της διηθήσεως με μεμβράνη έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την ανίχνευση της *L.monocytogenes* με καλλιέργεια της μεμβράνης σε εκλεκτικό άγαρ, ή μέσω διάφορων ταχέων τεχνικών, όπως η τεχνική φίλτρου άμεσου επιθροισμού, η ηλεκτρονική μικροσκοπία ή οι ανοσοδοκιμές. Η απαίτηση της μεθόδου για επεξεργασία των προϊόντων με μία μορφή που να μπορεί να φιλτραριστεί περιορίζει την δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου επειδή οι όγκοι που μπορούν να διηθηθούν εξαρτώνται από τον τύπο του δείγματος (Auvolat & Besse, 2015).

Η τεχνική του Most Probable Number (MPN)

Η συγκεκριμένη τεχνική βασίζεται σε στατιστικές πιθανοτήτων. Τα αποτελέσματα ουσιαστικά δείχνουν την συχνότητα εμφάνισης σε μία σειρά διαδοχικών αραιώσεων ενός δείγματος, με βάση την οποία υπολογίζεται η πιθανότητα παρουσίας ενός συγκεκριμένου αριθμού βακτηριακών κυττάρων στο δείγμα. Τα στατιστικά βγαίνουν από το ποσοστό των θετικών στην ανάλυση δειγμάτων τα οποία είναι διαδοχικά

αραιωμένα μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες, σε σχέση με τους συνολικούς δοκιμαστικούς σωλήνες που είχα χρησιμοποιήσει για την δοκιμή. Αυτή η τεχνική έχει δύο βασικές παραδοχές. Η μία είναι ότι όλα τα κύτταρα έχουν κατανεμηθεί τυχαία μέσα στο αναιώρημα και ότι δεν έχει προκληθεί κάποια συσσωμάτωση. Και η άλλη είναι πως όταν η κάθε αραιώση έχει πραγματοποιηθεί με σωστό τρόπο και έχει επώσει σωστά, θα παρουσιάσει ανάπτυξη σε περίπτωση ύπαρξης μικροοργανισμού. αυτή η τεχνική απαρίθμησης των βακτηριακών πυκνοτήτων χρησιμοποιείται ευρύτατα ακόμη και σήμερα για την *L.monocytogenes* τόσο για ερευνητικές μελέτες, όσο και για μελέτες ρουτίνας (Auvolat & Besse, 2015).

Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας

Φθορισμομετρικοί μέθοδοι υβριδισμού in situ (Fluorescence in situ hybridization, FISH)

Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί μία κυτταρογενετική τεχνική που κατ'ουσίαν ανιχνεύει την παρουσία ή απουσία, αντίστοιχα συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA. Χρησιμοποιεί φθορίζοντες ανιχνευτές οι οποίοι προσδένονται σε συμπληρωματικές αλληλουχίες και απεικονίζονται με την χρήση της μικροσκοπίας φθορισμού. Οι ερευνητές (Fuchizawa, Shimizu, Kawai, & Yamazaki, 2008) σχεδίασαν μία τεχνική με βάση αυτή την αρχή. Συνδύασαν την συγκεκριμένη τεχνική με καλλιέργεια φίλτρου (FISHFC) και κατάφεραν ταχεία καταμέτρηση των βιώσιμων κυττάρων της *listeria spp.* Το 2009 οι ίδιοι ερευνητές βελτίωσαν την ειδικότητα της μεθόδου και κατάφεραν τον ποσοτικό προσδιορισμό της *L.monocytogenes* στα τρόφιμα, μέσα σε χρόνο 16 ωρών (Auvolat & Besse, 2015).

Μέθοδος PCR

Η αξιοποίηση της PCR τεχνικής ξεκίνησε από το 1990, αν και χρησιμοποιούταν μόνο για την ταυτοποίηση καθαρών βακτηριακών καλλιεργειών, ή αποικιών σε πλάκες άγαρ. Πλέον έχει αναγνωριστεί ως μία πολύ υποσχόμενη ταχεία μικροβιολογική μέθοδο για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των βακτηρίων σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων. Χρησιμοποιείται αρκετά για τον ποσοτικό προσδιορισμό βακτηριακών πληθυσμών με έμμεσο (MPN-PCR) και άμεσο τρόπο. Η PCR ως τεχνική ενισχύει μία συγκεκριμένη αλληλουχία DNA παράγοντας χιλιάδες αντίγραφα. Οι αντιδράσεις της

PCR χαρακτηρίζονται από έναν κύκλο βημάτων που αποτελείται από τρία στάδια. Αρχικά έχουμε μετουσίωση του δίκλωνου DNA του δείγματος, έπειτα έχουμε ανόπτηση των εκκινητών που στοχεύουν στο DNA κατά συμπληρωματικότητα, και τέλος έχουμε σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού DNA από την πολυμεράση του DNA. Συνήθως τα γονίδια της *L.monocytogenes* που παρακολουθούνται είναι το γονίδιο O της λιστεριολυσίνης (hlyA), το γονίδιο της πρωτεΐνης p60 που σχετίζεται με την εισβολή, τα γονίδια της ιντερναλίνης (inlA,inlB), τα γονίδια της αμινοπεπτιδάσης C και το 16S rRNA. Οι ερευνητές (Wang & Hong, 1998) ανέπτυξαν ένα ανταγωνιστικό πρωτόκολλο PCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό της *L.monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος ή ψαριών, το οποίο συνδύαζε την βασική τεχνική με μία ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία, η οποία ονομάστηκε ELISA (Auvolat & Besse, 2015).

Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Η συγκεκριμένη τεχνική απαιτεί τη συσσώρευση των κυττάρων. Η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος PCR είναι ανάλογη με την αύξηση της σήμανσης φθορισμού, η οποία παρακολουθείται κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Ο αριθμός των κυττάρων μπορεί να εκτιμηθεί με χρήση τυποποιημένων καμπυλών παλινδρόμησης των τιμών του κύκλου ποσοτικοποίησης (Cq). Για να υπάρχει αποτέλεσμα απαρίθμησης πρέπει να εφαρμόζεται απευθείας στο δείγμα του τροφίμου, χωρίς να έχει προηγηθεί κάποιος εμπλουτισμός. Το ποσοτικό εύρος της ανέρχεται σε πάνω από 100 αντίγραφα DNA (Auvolat & Besse, 2015).

Ψηφιακή PCR (dPCR)

Αποτελεί μια καινούργια προσέγγιση που έχει την δυνατότητα να ποσοτικοποιεί άμεσα, να ανιχνεύει και να ενισχύει μια αλληλουχία ενός νουκλεϊκού οξέος στόχου. Η dPCR χωρίζει ένα δείγμα σε διάφορα επιμέρους δείγματα PCR. Ορισμένες από αυτές τις αντιδράσεις λαμβάνουν το μόριο στόχο (θετικές) ενώ άλλες όχι (αρνητικές). Ο όγκος της αντίδρασης της dPCR είναι από μερικά πικόλιτρα έως νανόλιτρα. Η μέση συγκέντρωση του νουκλεϊκού οξέος- στόχου καθορίζεται από το ποσοστό των αρνητικών αντιδράσεων PCR, με βάση την κατανομή Poisson. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατός ο προσδιορισμός του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου-στόχου χωρίς την ανάγκη εσωτερικών ελέγχων ή προτύπων για ποσοτικοποίηση και εκτίμηση της

αποτελεσματικότητας της αντίδρασης όπως απαιτούνται για την qPCR. Η μέθοδος είναι ακριβής και αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο που παρέχει άμεσο ποσοτικό προσδιορισμό των γονιδίων-στόχων (Auvolat & Besse, 2015).

2.7 ΠΗΓΕΣ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Η *L.monocytogenes* είναι ένα βακτήριο το οποίο απαντάται συχνά στη φύση. Βρίσκεται παντού στο περιβάλλον , καθώς επιβιώνει και αναπτύσσεται στο νερό και στο χώμα, συνεπώς εντοπίζεται σε υδάτινα περιβάλλοντα όπως είναι διάφορα κανάλια και λίμνες , σε παραποτάμους με γλυκά νερά καθώς και σε υπονόμους. Στελέχη της *listeria* έχουν απομονωθεί από φυτά τα οποία μεγάλωσαν σε έδαφος το οποίο τροφοδοτούταν με νερό μολυσμένο από *listeria*. Συναντάται επίσης τόσο στο γρασίδι όσο και στις ζωτροφές, ενώ η αποσύνθεση περιττωματικού υλικού συμβάλλει στην παρουσία της *listeria* στο έδαφος (Montville & Matthews, 2010).

2.8 ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗ

Η *listeria monocytogenes* είναι ένα προαιρετικό ενδοκυτταρικό παθογόνο το οποίο είναι ικανό να προκαλέσει μια σοβαρή ανθρώπινη ασθένεια η οποία ονομάζεται λιστερίωση. Η ασθένεια της λιστερίωσης είναι σπάνια και τα τυπικά συμπτώματα που την χαρακτηρίζουν περιλαμβάνουν σηψαιμία, αποβολές και εγκεφαλίτιδα (Renato H. Orsi & Martin Wiedmann, 2016). Ως μία δυνητικά θανατηφόρα ασθένεια, θεωρούνταν ζωνόσος μέχρι και τις αρχές της δεκαετίας του '80, η πρώτη φορά που έγινε ταυτοποίηση της λιστερίωσης ως μια τροφογενή ασθένεια ήταν το 1981 στον Καναδά, και πηγή του κρούσματος ήταν μια λαχανοσαλάτα. Η επικρατέστερη αιτιολόγηση για το συγκεκριμένο περιστατικό, είναι τα λάχανα να είχαν επιμολυνθεί με κοπριά προβάτου το οποίο έπασχε από μηνιγγίτιδα, η οποία είχε προέλθει από στέλεχος *listeria* (Montville & Matthews, 2010). Συνήθως συναντάται σε ομάδες υψηλού κινδύνου όπως είναι οι έγκυες, τα νεογνά και οι ανοσοκατασταλμένοι ενήλικες. Το ποσοστό θνησιμότητας είναι από 20-25%, και άτομα με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης είναι ασθενείς με κακοήθεις όγκους, μεταμόσχευση οργάνων, ασθενείς που βρίσκονται σε κατάσταση ανοσοκαταστολής, είναι επιβαρυνμένοι με

μόλυνση από τον ιό του AIDS, και άτομα προχωρημένης ηλικίας. Ενώ μία από τις κρισιμότερες ευπαθείς ομάδες είναι οι έγκυες γυναίκες, οι οποίες μπορεί να παρουσιάζουν ελαφριά συμπτώματα, ειδικά κατά τους πρώτους τρεις μήνες της εγκυμοσύνης, παρόμοια με αυτά της γρίπης, σε περίπτωση μόλυνσης από την *L.monocytogenes*, έχει όμως βαριές επιπτώσεις στο έμβρυο και συχνά μπορεί να προκαλέσει αποβολή ή γέννηση νεκρού εμβρύου (Montville & Matthews, 2010). Τα περιστατικά κρουσμάτων ανθρώπινης λιστερίωσης είναι σποραδικά, πράγμα που καθιστά πολύ δύσκολη την παρατήρηση τους ως επιδημιολογικά κρούσματα. Είναι επομένως πιθανό ότι πολλά κρούσματα με κοινή πηγή μόλυνσης δεν αναγνωρίστηκαν. Σε αυτό δεν συντέλεσε μόνο το γεγονός της σποραδικότητας, αλλά και έπαιξε ρόλο και ο μεγάλος χρόνος επώασης που χρειάζεται ο μικροοργανισμός μέχρι να εκδηλώσει τα συμπτώματα της ασθένειας, ο οποίος φτάνει και έως 5 εβδομάδες (Montville & Matthews, 2010).

Η έκθεσή μας στο μικροοργανισμό *L.monocytogenes* είναι συνηθισμένη καθώς απαντάται αρκετά στο περιβάλλον, αλλά η εκδήλωση της ασθένειας της λιστερίωσης είναι αρκετά σπάνια. Το συγκεκριμένο γεγονός δεν έχει κάποια σαφή εξήγηση. Δεν γνωρίζουμε, δηλαδή, αν αυτό οφείλεται στην ανθρώπινη ανθεκτικότητα ή στο γεγονός ότι τα περισσότερα στελέχη είναι αδύναμα παθογόνα. Το σύστημα της λιστερίωσης δεν είναι απολύτως κατανοητό, δεδομένου το ότι υπάρχουν περιπτώματικοί φορείς του μικροοργανισμού οι οποίοι δεν νοσούν από την ασθένεια (Montville & Matthews, 2010). Η λιστερίωση πέρα από την επιθετική της μορφή, η οποία είναι η προαναφερθείσα, προκαλεί και μια δεύτερη μορφή ασθένειας η οποία είναι λιγότερο επιθετική, την εμπύρετη γαστρεντερίτιδα. Τα συμπτώματα εμφανίζονται λίγες μόνο ώρες μετά την έκθεση. Το πρώτο κρούσμα εμπύρετης λιστερικής γαστρεντερίτιδας ανιχνεύθηκε το 1994, από μόλυνση σοκολατούχου γάλακτος μετά την επεξεργασία, το οποίο δεν είχε σωστή μεταχείριση, διότι αποθηκεύτηκε εκτός ψυγείου, με αποτέλεσμα να επώασει ο μικροοργανισμός (Montville & Matthews, 2010).

2.9 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το πρώτο περιστατικό επιδημίας της λιστερίωσης, εντοπίστηκε στη Nova Scotia του Καναδά το 1981, η ανίχνευση ότι η συγκεκριμένη ασθένεια πρόκειται για μια τροφογενή ασθένεια έγινε από την οροαποτύπωση του στελέχους. Αναφέρθηκαν 34 περιστατικά που αφορούσαν εγκύους και 7 περιστατικά σε μη εγκύους ενήλικες εντός ενός εξαμήνου. Η πηγή μόλυνσης ήταν μία λαχανοσαλάτα τις οποίας τα λάχανα είχαν επιμολυνθεί από περιττώματα προβάτου, το οποίο πιθανά να είχε νοσήσει με μηνιγγίτιδα από στέλεχος της *Listeria* (Montville & Matthews, 2010).

Άλλο κρούσμα λιστερίωσης καταγράφηκε το 1985 στην Καλιφόρνια σε μεξικάνικο τυρί. Σε διάρκεια οκτώ μηνών καταγράφηκαν 142 περιστατικά, εκ των οποίων τα 93 αφορούσαν έγκυο γυναίκες. Αν αναλογιστούμε πως το τυρί καταναλώθηκε από περίπου 10.000 ανθρώπους, κατανοούμε πως υπήρξε πολύ μικρό ποσοστό προσβολής, ενώ τα περιστατικά αφορούσαν ως επί το πλείστον άτομα τα οποία είχαν προδιάθεση στη λιστερίωση, και σχεδόν το 1/3 των ασθενών πέθαναν από την λιστερίωση (Montville & Matthews, 2010).

Μία μεγάλη έξαρση λιστερίωσης εμφανίστηκε στην Ελβετία η οποία διήρκησε 4 χρόνια, και υπεύθυνη ήταν η *L.monocytogenes* που είχε αναπτυχθεί σε μαλακό τυρί. Άλλη περίπτωση μεγάλης έξαρσης προκλήθηκε από ένα μολυσμένο πατέ το οποίο προκάλεσε 300 περιστατικά στο Ηνωμένο Βασίλειο (Montville & Matthews, 2010).

Η πιο πρόσφατη αναφορά, για τα ετήσια κρούσματα λιστερίωσης δίνετε από τον EFSA για το έτος 2020, και αναφέρει 1.876 επιβεβαιωμένα κρούσματα ανθρώπινης λιστερίωσης, εκ των οποίων τα 1.283 επιβεβαιώθηκαν ότι αποτελούσαν εγχώρια κρούσματα, εντοπίστηκαν δηλαδή εντός της χώρας προέλευσης του τροφίμου. Τα δεδομένα κρούσματα αφορούσαν το 99,8% των κρουσμάτων λιστερίωσης που εντοπίστηκαν εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης συνολικά εντός του 2020. Το στέλεχος της *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 έξη από τα ισχυρώς

αποδεδειγμένα περιστατικά λιστερίωσης προκλήθηκαν από ψάρια και αλιευτικά προϊόντα, 2 προκλήθηκαν από κρέας και προϊόντα κρέατος, και ένα από γαλακτοκομικά προϊόντα. Από τα επτά ασθενώς επιβεβαιωμένα κρούσματα, μόνο το ένα προσδιορίστηκε ότι αφορούσε γαλακτοκομικά προϊόντα, ενώ για τα υπόλοιπα έξι δεν κατάφεραν να προσδιοριστούν οι πηγές τους (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 2021).

Η αναφορά του EFSA για την ανίχνευση της *L.monocytogenes* εξηγεί ότι κατά την περίοδο 2017-2020 19 κράτη μέλη της ΕΕ και 2 μη κράτη μέλη, ανέφεραν στοιχεία για τα τυροκομικά προϊόντα τα οποία διατίθενται έτοιμα προς κατανάλωση. Συγκεκριμένα το 2020, 15 κράτη μέλη και τρία μη κράτη μέλη (Μαυροβούνιο, Βόρεια Μακεδονία και Σερβία) ανέφεραν δεδομένα σχετικά με την ανίχνευση της *L.monocytogenes* στα τυριά. Τα περισσότερα δείγματα που διατέθηκαν προς εξέταση ήταν από τις χώρες Βουλγαρία, Βέλγιο, Γερμανία, Ολλανδία, Ρουμανία και Ισπανία, και τα δείγματα αποτελούσαν το 81,5% των συνολικών δειγμάτων που εξετάστηκαν. Από τα συνολικά δείγματα τα τυριά που είχαν παρασκευαστεί από παστεριωμένο αγελαδινό γάλα αποτέλεσαν πάνω από το 64,7%. Αν λάβουμε μια συνολική εικόνα όλων των τυριών που εξετάστηκαν (όλων των προελεύσεων και τύπων τυριών) η *L.monocytogenes* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0,54% στα 11.934 δείγματα. Το 2020 τα ποσοστά εμφάνισης της *L.monocytogenes* στα μαλακά και ημι-μαλακά τυριά που παρασκευάστηκαν από νωπό γάλα με χαμηλή θερμική επεξεργασία (LHT) ήταν στο 0,67%, ενώ τα ποσοστά εμφάνισης από παστεριωμένο γάλα ήταν 0,68%. Δεν υπήρξε δηλαδή μεγάλη διαφορά στα ποσοστά εμφάνισης της *L.monocytogenes* μεταξύ των τυριών από νωπό και παστεριωμένο γάλα (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 2021).

2.10 ΤΡΟΦΙΜΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΣΒΑΛΛΟΝΤΑΙ ΑΠΟ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση

Με βάση τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης της *L.monocytogenes*, τις απαιτήσεις και την ανθεκτικότητα του παθογόνου στους διάφορους παράγοντες, όπως την επιβίωση και ανάπτυξη του σε θερμοκρασίες ψυγείου, τα τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση που

διατίθενται στην αγορά (π.χ. μαλακά τυριά, αλλαντικά, λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης κ.α.) αποτελούν υψηλό κίνδυνο λιστερίωσης για τους ευπαθείς πληθυσμούς, καθώς τα περισσότερα από αυτά δεν έχουν υποστεί υψηλή θερμική επεξεργασία και αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες ψυγείου (Montville & Matthews, 2010).

Γάλα

Η ύπαρξη *L.monocytogenes* στο γάλα αφορά κατά βάση το ακατέργαστο γάλα. Μέσω της παστερίωσης ο μικροοργανισμός μειώνεται σε σημαντικά επίπεδα λόγω της θανάτωσης του σε θερμοκρασίες άνω των 50°C, και με αυτόν τον τρόπο η παστερίωση θεωρείται επαρκής μέθοδος εξυγίανσής του γάλακτος από την *listeria*. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει αναφέρει: η παστερίωση είναι μία ασφαλής διαδικασία, η οποία μειώνει τον αριθμό της *L.monocytogenes* στο ακατέργαστο γάλα σε επίπεδα τέτοια ώστε να μην αποτελεί υπολογίσιμο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Παρόλο αυτά το παθογόνο έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται ικανοποιητικά μέσα στο υπόστρωμα του παστεριωμένου γάλακτος, συνεπώς οποιαδήποτε επιμόλυνση μετά το στάδιο της παστερίωσης αποτελεί κύρια πηγή ανησυχίας (Montville & Matthews, 2010).

Τυριά

Η *L.monocytogenes* όπως έχει προαναφερθεί έχει υψηλή ανθεκτικότητα και επιβιώνει σε διάφορα περιβάλλοντα και επομένως σε διάφορες μορφές επεξεργασίας. Η υψηλή θερμοκρασιακή αντοχή της, η ικανότητα της να αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες και η ανθεκτικότητα της στο αλάτι την βοηθά στο να επιβιώνει κατά τα στάδια της επεξεργασίας και ωρίμανσης των τυριών, ενώ παράλληλα σημαντικό ρόλο παίζει και η μείωση κάποιων ανταγωνιστικών βακτηρίων λόγω της παστερίωσης που έχει προηγηθεί. Κατά τα στάδια της παραγωγής του τυριού η *L.monocytogenes* συγκεντρώνεται στο τυρόπηγμα και επηρεάζεται άμεσα από τον τύπο του τυριού. Για παράδειγμα το τυρί Καμεμπέρ ευνοεί την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, στο Τσένταρ και στο Κόλμπυ σταδιακά θανατώνεται, ενώ στο μπλε τυρί μειώνεται ταχύτατα κατά την πρώιμη ωρίμανση και μετά σταθεροποιείται. Η κατανάλωση μαλακών τυριών από ευπαθείς ομάδες και

ιδιαίτερα από έγκυο γυναίκες και άτομα με χαμηλό ανοσοποιητικό είναι επικίνδυνη και το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών συνιστά την αποφυγή του (Montville & Matthews, 2010).

Προϊόντα κρέατος και Πουλερικά

Από τα είδη ζωικών η *L.monocytogenes* αναπτύσσεται καλύτερα στα πουλερικά, σε σύγκριση με άλλα κρέατα, ενώ το ψητό βοδινό και τα ξηρά λουκάνικα είναι αυτά στα οποία ευδοκιμεί λιγότερο. Η μόλυνση μπορεί να προκληθεί είτε μέσα στο ζώο είτε πάνω πριν τη σφαγή ή μετά από μόλυνση του σφαγείου μετά την σφαγή. Ο μικροοργανισμός προσκολλάται στην επιφάνεια των ωμών κρεάτων και η θανάτωση ή η αφαίρεση του είναι σχετικά δύσκολη. Σαν ξενιστής έχει την τάση να συγκεντρώνεται και να πολλαπλασιάζεται στο νεφρό, στους λεμφαδένες, στο συκώτι και στο σπλήνα, ενώ η κατανάλωση των οργάνων του κρέατος μπορεί να χαρακτηριστεί πιο επικίνδυνη από την κατανάλωση του μυϊκού ιστού. Αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε προϊόντα κρεάτων, όπως βοδινά συσκευασμένα υπό κενό τα οποία έχουν pH κοντά στο 6,0. Επίσης κρεατοσκευάσματα έτοιμα προς κατανάλωση τα οποία αρχικά θερμαίνονται και έπειτα ψύχονται σε άλμη πριν συσκευαστούν ευνοούν την ανάπτυξη της *listeria* λόγω της μείωσης των ανταγωνιστικών βακτηρίων και της ανοχής που έχει το παθογόνο στην αλατότητα. Συνεπώς το ανεπαρκές μαγείρεμα σε κρέατα που θα διατεθούν στην αγορά ως προϊόντα έτοιμα προς κατανάλωση η ανάπτυξη της *L.monocytogenes* μπορεί να είναι επικίνδυνη (Montville & Matthews, 2010).

Θαλασσινά

Έχουν απομονωθεί κύτταρα της *L.monocytogenes* από φρέσκα και κατεψυγμένα θαλασσινά. Υπάρχει επικινδυνότητα για εκδήλωση λιστερίωσης σε θαλασσινά στα οποία δεν έχει υπάρξει επαρκές μαγείρεμα: όπως μύδια, χτένια, στρείδια, ωμά ψάρια, ψάρια ελαφράς συντήρησης (π.χ αλατισμένα, ζυμωμένα κ.τ.λ) (Montville & Matthews, 2010).

Πίνακας 2. Ανίχνευση της *L.monocytogenes* σε διάφορα είδη τροφίμων από διάφορους ερευνητές (Adzitey & Huda, 2010).

Δείγματα Τροφών	Αριθμός Αναλύσεων	Αριθμός θετικών δειγμάτων	Θετικά δείγματα (%)	Πηγές
Ωμά αυγά	144	25	17	(Katell Rivoal, et al., 2010)
Παστεριωμένα αυγά	144	4	3	(Katell Rivoal, et al., 2010)
Τεμάχια μπριζόλας	142	73	51	(Johansson, 1998)
Τεμαχισμένο και μη λουκάνικο και ζαμπόν	24	19	79	(Johansson, 1998)
Λουκάνικα Φρανκφούρτης και πατέ	44	5	11	(Johansson, 1998)
Καπνιστά και παστά ψάρια σε κενό αέρος	110	22	20	(Johansson, 1998)
Μαλακά τυριά με μπαχαρικά	6	6	100	(Johansson, 1998)
Περιβαλλοντικά δείγματα από τυροκομεία	69	4	6	(Johansson, 1998)
Εγκαταστάσεις επεξεργασίας ψαριών	24	5	21	(Johansson, 1998)
Ζωοτροφές	5	0	0	(Johansson, 1998)
Σκληρά και ημίσκληρα τυριά	11	0	0	(Johansson, 1998)
Νωπά τυριά	36	0	0	(Johansson, 1998)
Φρέσκο κρέας πουλερικών	40	2	5	(Mahmood , Ahmed , & Hussain, 2003)
Νωπά πουλερικά χωρίς κόκαλα	40	1	3	(Mahmood , Ahmed , & Hussain, 2003)

Κατεψυγμένο κρέας πουλερικών	40	3	8	(Mahmood , Ahmed , & Hussain, 2003)
Κατεψυγμένο κοτόπουλο πανέ	40	5	13	(Mahmood , Ahmed , & Hussain, 2003)
Κατεψυγμένα μπιφτέκια κοτόπουλου	40	3	8	(Mahmood , Ahmed , & Hussain, 2003)
Επιφάνεια κοπής	40	6	15	(Mahmood , Ahmed , & Hussain, 2003)
Μηχανή τεμαχισμού του κιμά	40	4	10	(Mahmood , Ahmed , & Hussain, 2003)
Διατηρημένα, μη θερμικά επεξεργασμένα προϊόντα ψαριών	335	35	10	(Nørrung, Andersen, & Schlundt, 1999)
Διατηρημένα προϊόντα κρέατος με θερμική επεξεργασία	328	77	23	(Nørrung, Andersen, & Schlundt, 1999)
Προϊόντα κρέατος που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία	772	45	6	(Nørrung, Andersen, & Schlundt, 1999)
Ωμά ψάρια	232	33	14	(Nørrung, Andersen, & Schlundt, 1999)
Ωμό κρέας	343	106	31	(Nørrung, Andersen, & Schlundt, 1999)

Ωμό κοτόπουλο	158	57	36	(Vitas, Aguado, & Garcia-Jalon, 2003)
Ακατέργαστο αγελαδινό γάλα	340	23	7	(Vitas, Aguado, & Garcia-Jalon, 2003)
Ακατέργαστο πρόβειο γάλα	202	6	3	(Vitas, Aguado, & Garcia-Jalon, 2003)
Κατεψυγμένα λαχανικά	1750	31	2	(Vitas, Aguado, & Garcia-Jalon, 2003)
Μαγειρεμένο κρέας	396	35	9	(Vitas, Aguado, & Garcia-Jalon, 2003)
Παστό κρέας	345	23	7	(Vitas, Aguado, & Garcia-Jalon, 2003)
Καπνιστός σολομός	100	28	28	(Vitas, Aguado, & Garcia-Jalon, 2003)
Μαλακό τυρί	99	1	1	(Vitas, Aguado, & Garcia-Jalon, 2003)
Ακατέργαστος μοσχαρίσιος κιμάς	100	52	52	(BOHAYCHUK, et al., 2006)
Ακατέργαστα μπούτια κοτόπουλου	100	34	34	(BOHAYCHUK, et al., 2006)
Ωμές χοιρινές μπριζόλες	98	24	24	(BOHAYCHUK, et al., 2006)
Λουκάνικα που έχουν υποστεί ζύμωση	100	4	4	(BOHAYCHUK, et al., 2006)
Ψητό μοσχάρι	101	0	0	(BOHAYCHUK, et al., 2006)

Στήθος γαλοπούλας	100	3	3	(BOHAYCHUK, et al., 2006)
Μοσχαρίσια λουκάνικα	100	5	5	(BOHAYCHUK, et al., 2006)
Λουκάνικα κοτόπουλου	101	3	3	(BOHAYCHUK, et al., 2006)
Μοσχαρίσιος κιμάς	49	11	22	(Okutani, Okada, Yamamoto, & Igimi, 2003)
Μοσχαρίσιο κρέας ολόκληρα τεμάχια	4231	217	5	(Okutani, Okada, Yamamoto, & Igimi, 2003)
Χοιρινό ολόκληρο	4421	355	8	(Okutani, Okada, Yamamoto, & Igimi, 2003)
Χοιρινός κιμάς	104	20	19	(Okutani, Okada, Yamamoto, & Igimi, 2003)
Κοτόπουλο ολόκληρο	331	49	15	(Okutani, Okada, Yamamoto, & Igimi, 2003)
Κιμάς κοτόπουλο	53	22	42	(Okutani, Okada, Yamamoto, & Igimi, 2003)
Ακατέργαστο γάλα	139	7	5	(Okutani, Okada, Yamamoto, & Igimi, 2003)
Τυρί	19	0	0	(Okutani, Okada, Yamamoto, & Igimi, 2003)
Ακατέργαστο πλήρες γάλα (συμβατική μέθοδος)	81	13	16	(Vanegas, Vásquez, Martinez, & Rueda, 2008)
Ακατέργαστο πλήρες γάλα (Real time-PCR)	81	21	26	(Vanegas, Vásquez,

				Martinez, & Rueda, 2008)
Ζαμπόν/σαλάμι/ μπέικον/κρέας για σνακ	17	3	18	(Doris & Seah, 1995)
Ψαροκροκέτες	16	3	19	(Doris & Seah, 1995)
Τόνος	5	0	0	(Doris & Seah, 1995)
Σαλάτα λαχανικών	50	2	4	(Doris & Seah, 1995)
Παγωτό	61	0	0	(Doris & Seah, 1995)
Γιαούρτι	40	0	0	(Doris & Seah, 1995)
Αλοιφή τυριού	103	0	0	(Doris & Seah, 1995)
Κρέμα γάλακτος	17	0	0	(Doris & Seah, 1995)
Σάντουιτς/κουλο υράκια	11	0	0	(Doris & Seah, 1995)
Ρύζι πάπιας/ ρύζι κοτόπουλου	71	0	0	(Doris & Seah, 1995)
Τηγανητό κοτόπουλο/μέρη κοτόπουλου	26	0	0	(Doris & Seah, 1995)
Γέμιση κρέατος	3	0	0	(Doris & Seah, 1995)
Καπνιστά μύδια	2	1	50	(Doris & Seah, 1995)
Ακατέργαστο αγελαδινό γάλα	90	1	1	(Rahimi, Ameri, & Momtaz, 2010)
Ακατέργαστο πρόβειο γάλα	62	4	6	(Rahimi, Ameri, & Momtaz, 2010)
Ακατέργαστο κατσικίσιο γάλα	60	1	2	(Rahimi, Ameri, & Momtaz, 2010)

Ακατέργαστο γάλα καμήλας	48	0	0	(Rahimi, Ameri, & Momtaz, 2010)
Εμπορικό τυρί	30	0	0	(Rahimi, Ameri, & Momtaz, 2010)
Παραδοσιακό τυρί	60	9	15	(Rahimi, Ameri, & Momtaz, 2010)
Εμπορικό παγωτό	28	0	0	(Rahimi, Ameri, & Momtaz, 2010)
Παραδοσιακό παγωτό	40	2	5	(Rahimi, Ameri, & Momtaz, 2010)
Εμπορικό βούτυρο	15	0	0	(Rahimi, Ameri, & Momtaz, 2010)
Παραδοσιακό βούτυρο	25	1	4	(Rahimi, Ameri, & Momtaz, 2010)
Καπνιστός σολομός σε κενό αέρος	102	11	11	(Garrido, A.I. Vitas, & I. García-Jalón, 2008)
Καπνιστή πέστροφα σε κενό αέρος	40	10	25	(Garrido, A.I. Vitas, & I. García-Jalón, 2008)
Συσκευασμένα σε κενό αέρος προϊόντα κρέατος	220	6	3	(Garrido, A.I. Vitas, & I. García-Jalón, 2008)
Ανοιγμένα προϊόντα αλλαντικών	200	17	9	(Garrido, A.I. Vitas, & I. García-Jalón, 2008)
Πατέ σε συσκευασία κενού	120	1	1	(Garrido, A.I. Vitas, & I. García-Jalón, 2008)
Ανοιγμένο πατέ	41	0	0	(Garrido, A.I. Vitas, & I. García-Jalón, 2008)

Reference: Adzitey, F., & Huda, N. (2010). *Listeria monocytogenes* in foods: incidences and possible control measures. *African Journal of Microbiology Research*, 4(25), 2848-2855.

2.11 ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Η *L.monocytogenes* είναι ένα ενδοκυτταρικό θετικό κατά Gram βακτήριο το οποίο αποτελεί πηγή έξαρσης της τροφογενής ασθένειας λιστερίωσης, ή οποία είναι δυνητικά θανατηφόρα για ορισμένες ομάδες κινδύνου. Ο μηχανισμός μολυσματικότητας της είναι ιδιαίτερος κάτι που της προσδίδει την αυξημένη επικινδυνότητα που την διακατέχει, και αυτό απορρέει από το γεγονός ότι τα περισσότερα παθογόνα βακτήρια είτε εκκρίνουν τοξίνες, είτε πολλαπλασιάζονται μέσα στο αίμα, και με αυτό τον τρόπο βάλλουν το σύστημα του οργανισμού (Montville & Matthews, 2010). Εν αντιθέσει η *L.monocytogenes* έχει την ικανότητα να εισβάλει μέσα στα κύτταρα του ξενιστή και ακολουθεί έναν εξαιρετικά πολύπλοκο, αλλά ταυτόχρονα συντονισμένο ενδοκυτταρικό κύκλο, ο οποίος περιλαμβάνει πολλά κρίσιμα στάδια. Τα στάδια έχουν την εξής ακολουθία, αρχικά έχουμε προσκόλληση και εισβολή του βακτηρίου στον οργανισμό μέσω των κυττάρων, στην συνέχεια ακολουθεί ενδοκυτταρικός πολλαπλασιασμός και κινητικότητα, και τέλος έχουμε την διακυτταρική εξάπλωση, με την οποία ο ξενιστής επιτυγχάνει να μεταναστεύει και να μολύνει από κύτταρο σε κύτταρο (Camejo, και συν., 2011). Αν αναλύσουμε πιο εκτεταμένα και στο σύνολο του οργανισμού την εξάπλωσή της η *L.monocytogenes* εισέρχεται στον οργανισμό από το στόμα μέσω της πρόσληψης τροφής και έχει την ικανότητα να περνάει μέσα από τρεις φυσιολογικούς φραγμούς, το έντερο, το αιματοεγκεφαλικό σύστημα, και τον εμβρυοπλακουντιακό φραγμό. Διασχίζοντας τον εντερικό φραγμό το βακτήριο απορροφάτε από τον εντερικό αυλό, διασχίζοντας έτσι την στιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων, αν σε όλη αυτή την διαδρομή το ανοσοποιητικό σύστημα δεν ελέγξει την μόλυνση, τότε το παθογόνο περνάει στην κυκλοφορία του αίματος και στους μεσεντέριους λεμφαδένες. Από εκεί μεταφέρεται στην συνέχεια στο ήπαρ και τον σπλήνα όπου έχει την δυνατότητα να πολλαπλασιαστεί στο εσωτερικό των σπληνικών και ηπατικών μακροφάγων ή των επιθηλιακών κυττάρων. Μια ακόμη συνηθισμένη εκδοχή για να πολλαπλασιαστεί το παθογόνο μετά την προσβολή του εντέρου αποτελούν τα δενδριτικά κύτταρα, στα οποία η *L.monocytogenes* είναι σε θέση να διαφύγει από τα φαγοσώματα και να εξαπλωθεί στα γειτονικά κύτταρα. Αν ο οργανισμός-ξενιστής που έχει προσβληθεί από το βακτήριο δεν χαρακτηρίζεται από ένα έμφυτο αποτελεσματικό και δραστικό ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο θα μπορέσει να ανταποκριθεί στην μόλυνση

περιορίζοντας δραστικά τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου, τότε εκείνο είναι σε θέση να ξεφύγει από την ανοσολογική κάθαρση και να συνεχίσει να πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα. Συνεπώς κατανοούμε ότι η επιβίωση του ξενιστή εξαρτάται από την ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής και ταυτόχρονα προσαρμοστικής ανοσολογικής απάντησης. Αν αυτό δεν είναι παρεχόμενο τότε τα βακτήρια μπορούν να εισέλθουν εκ νέου στην κυκλοφορία του αίματος, και ενδεχομένως να φτάσουν στο εγκέφαλο ή στον πλακούντα, προκαλώντας δυνητικά θανατηφόρες συστηματικές λοιμώξεις (Camejo, και συν., 2011).

2.12 ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΗ ΔΟΣΗ

Η μολυσματική δόση της *L.monocytogenes* δεν είναι σαφώς καθορισμένη. Εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή, η μολυσματικότητα του μικροβίου (το πόσο εξασθενημένο μπορεί να είναι το παθογόνο), καθώς και το περιβάλλον του τροφίμου στο οποίο παρασιτεί (Montville & Matthews, 2010). Είναι γεγονός ότι το κάθε τρόφιμο δρα ως ένα συνολικό υπόστρωμα και έχει πολλούς παράγοντες οι οποίοι μπορεί είτε να ευνοούν είτε να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη διαφόρων βακτηρίων. Οι κλινικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αφορούν πειραματόζωα, και συγκεκριμένα τα ποντίκια, στα οποία χορηγήθηκε το βακτήριο της *L.monocytogenes* ενδοφλεβίως ή από το στόμα. Η μολυσματικότητα υπολογίζεται συγκρίνοντας την 50% θανατηφόρο δόση (LD₅₀ : δόση στην οποία το 50% των πειραματόζωων θα θανατωθεί ή μετρώντας τα βακτήρια στο σπλήνα ή στο συκώτι. Οι τιμές LD₅₀ κυμαίνονται από 10³ έως 10⁷ CFU. Σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα η μολυσματική δόση της *L.monocytogenes* για υγιείς ανθρώπους είναι 10²-10³ cfu/g, για τους ασθενείς όμως η μολυσματική δόση κατέρχεται έως και 1-10³cfu/g (Τυμπής, Πετράκης, & Κοντελής, 2016). Οι πληθυσμοί της *L.monocytogenes* στα τρόφιμα τα οποία έχουν συσχετιστεί με τροφογενή περιστατικά είναι συνήθως >100 CFU/gr τροφίμου (Montville & Matthews, 2010).

Μελέτη ανάλυσης για την εκτίμηση της μολυσματικής δόσης της Listeria Monocytogenes.

Παρόλο τα προαναφερθέντα, λόγω της δυσκολίας στην καταγραφή των κρουσμάτων λιστερίωσης, δεν ήταν εύκολο να καθοριστεί μία συγκεκριμένη τιμή κυττάρων που

να αφορά στην μολυσματικότητα της ασθένειας. Στις αρχές του 2015 ανιχνευθήκαν κρούσματα λιστερίωσης τα οποία είχαν πηγή μόλυνσης προϊόντα παγωτού, λόγω αυτής της διεσδυτικής επιδημίας, ο Οργανισμός Τροφίμων και Ποτών των ΗΠΑ (FDA), σύλλεξε μεγάλη ποσότητα παγωτού από τα εργοστάσια παραγωγής, προκειμένου να διεξαχθούν μικροβιολογικές δοκιμές. Η έξαρση της συγκεκριμένης επιδημίας αποτέλεσε ευκαιρία προκειμένου να μπορέσουν να εκτιμηθούν οι ποσότητες των κυττάρων στις οποίες αν εκτεθεί ο οργανισμός νοσεί από το παθογόνο. Αυτό υφίσταται γιατί το παγωτό έχει μεγάλη διάρκεια ζωής, και η *L.monocytogenes* μπορεί να μην αναπτύσσεται αλλά επιβιώνει για πολύ μεγάλα διαστήματα σε κατεψυγμένα προϊόντα, και επίσης λόγω της δυσκολίας στην ανάπτυξη του παθογόνου τα εμπλεκόμενα προϊόντα που παρασκευάστηκαν κατά την διάρκεια της επιδημίας αν και συλλέχθηκε μετά την επιδημία, ήταν πολύ πιθανό να παρείχαν ένα αρκετά αντιπροσωπευτικό δείγμα για τα επίπεδα των κυττάρων τα οποία πρόσβαλαν τους οργανισμούς. Ο FDA σύλλεξε και μέτρησε τα κύτταρα της *L.monocytogenes* σε τρία διαφορετικά είδη δειγμάτων. Από την διεξαγωγή των αναλύσεων εκτιμήθηκε ο αριθμός των κυττάρων ανά μερίδα προϊόντος. Ο μέσος αριθμός των κυττάρων *L.monocytogenes* ανά 80gr προϊόντος 1 υπολογίστηκε στα 620 CFU, και από την κατανομή του επιπέδου μόλυνσης που προέκυψε από το μοντέλο εκτιμήθηκε ότι το 0,1% των μερίδων του προϊόντος 1 είχε δόση >7.400 CFU/μερίδα. Για το προϊόν παγωτού 2 η *L.monocytogenes* που ανακτήθηκε απαντούσε στο 80% των 294 μονάδων (μέγεθος μονάδας προϊόντος 70gr), οπότε υπολογίστηκε ο μέσος όρος 310 CFU/μερίδα. Τέλος, για το προϊόν 3 από 95 δείγματα προϊόντος το 45% απέδωσε *L.monocytogenes* το οποίο ανέρχεται σε μέσο όρο 0,12 CFU/g (Pouillot, και συν., 2015).

2.13 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

Το νομοθετικό πλαίσιο της Ε.Ε. σε σχέση με την παρουσία της *L.monocytogenes* στα τρόφιμα δίνεται από τον Κανονισμό 2073/2005. Τα όρια της παρουσίας του παθογόνου βακτηρίου σχετίζονται και με το είδος της τροφής αλλά και με την ομάδα καταναλωτών στην οποία στοχεύει. Πιο συγκεκριμένα, για τις παιδικές τροφές, ακολουθείται μηδενική ανοχή στην παρουσία του βακτηρίου, επιβάλλεται δηλαδή η

καθολική απουσία του βακτηρίου σε 25g δείγματος του τροφίμου για όλη την διάρκεια της ζωής του. Τρόφιμα τα οποία παρουσιάζουν κίνδυνο για ανάπτυξη της *L.monocytogenes* στα σημεία πώλησης του τροφίμου σε όλη την διάρκεια της ζωής τους πρέπει να πληρούν τα ακόλουθα: α) είναι επιτρεπτή η παρουσία του βακτηρίου μέχρι 100 cfu/g στα 25g δείγματος τροφίμου στα σημεία πώλησης, σε όλη την διάρκεια της ζωής τους, και β) πρέπει να υπάρχει απουσία του βακτηρίου στα 25g, όταν φεύγει από τον παραγωγό. Για τα τρόφιμα τώρα τα οποία βάση φυσιολογίας δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη του συγκεκριμένου βακτηρίου, το όριο αποδοχής είναι στα 100 cfu/g στα σημεία πώλησης, σε όλη την διάρκεια της ζωής τους (Τυμπής , Πετράκης , & Κοντελής , 2016).

Πίνακας 3: Κριτήρια ασφάλειας για τον έλεγχο της *L.monocytogenes* στα τρόφιμα (ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005, 2005).

Κατηγορία Τροφίμων	Πλάνο δειγματοληψίας ⁽¹⁾		Όρια ⁽²⁾		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
	n	c	m	M		
Τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση, τα οποία προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	10	0	Απουσία σε 25 g δείγματος		EN/ISO 11290-1	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά την διάρκεια διατήρησής τους
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της <i>L.monocytogenes</i> διαφορετικά από	5	0	100 cfu/g		EN/ISO 11290-2	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά την διάρκεια διατήρησής τους

εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	5	0	Απουσία σε 25 g δείγματος	EN/ISO 11290-1	Πριν το τρώσιμο αποδεδειγμένο από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης
Τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της <i>L.monocytogenes</i> διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	5	0	100cfu/g	EN/ISO 11290-2	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά την διάρκεια διατήρησής τους

(1) : n = αριθμός μονάδων δειγματοληψίας που αποτελούν το δείγμα, c : αριθμός μονάδων δειγματοληψίας με τιμές μεγαλύτερες του m ή μεταξύ του m και M .

(2) : m = η ανώτατη αποδεκτή συγκέντρωση, κάτω από συνθήκες Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής, M = μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση του μικροοργανισμού προκυμμένου το προϊόν να είναι αποδεκτό.

2.14 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΑ ΜΕ ΔΥΣΜΕΝΕΙΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Επιβίωση σε χαμηλές θερμοκρασίες

Ένας βασικός παράγοντας ο οποίος καθιστά της *L.monocytogenes* ως ένα αρκετά ανθεκτικό βακτήριο, είναι το εύρος θερμοκρασιών στο οποίο μπορεί και αναπτύσσεται (1-44°C), η ικανότητα του δηλαδή να επιβιώνει και να αναπτύσσεται σε

θερμοκρασίες ψυγείου (2-4°C) είναι που κάνει δύσκολο τον έλεγχο του συγκεκριμένου τροφογενούς παθογόνου. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί προσαρμογής οι οποίοι κάνουν το βακτήριο να ανθίσταται στις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος στο οποίο παρασιτεί.

Αλλαγές στην σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης

Τα λιπίδια των μεμβρανών των βακτηριακών κυττάρων, υπάρχουν με μια υγρή κρυσταλλική κατάσταση, η οποία ως συνθήκη είναι απαραίτητη για την διατήρηση της ρευστότητας των μεμβρανών και της εύρυθμης λειτουργίας τους. Όταν το βακτηριακό κύτταρο βάλλεται με μεταβολή θερμοκρασίας, χρησιμοποιεί προσαρμοστικούς μηχανισμούς προκειμένου να μεταβάλει τη σύνθεση των λιπιδίων της μεμβράνης, έτσι ώστε να επέλθει η απαιτούμενη ρευστότητα που χρειάζεται για να πραγματοποιήσει σωστή ενζυμική δραστηριότητα, και να μπορεί να μεταφέρει τις απαραίτητες διαλυμένες ουσίες που χρειάζεται δια μέσου της μεμβράνης (Gandhi & Chikindas, 2006). Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που περιέχονται στην κυτταρική μεμβράνη της *listeria monocytogenes* είναι τα anteiso-C15:0, anteiso-C17:0, και iso-C15:0 (Annous, Becker, Bayles D O, Labeda, & Wilkinson, 1997). Κατά την επιρροή λοιπόν της χαμηλής θερμοκρασίας στα κύτταρα της *L.monocytogenes* μια από τις κύριες μεταβολές είναι η αύξηση της αναλογίας του anteiso-C15:0 εις βάρος του anteiso-C17:0, όταν η θερμοκρασία πέσει κάτω από τους 7°C. Επιπρόσθετα η ανάπτυξη σε χαμηλές θερμοκρασίες επιφέρει αύξηση του βαθμού των ακόρεστων λιπαρών οξέων, γεγονός που συμβάλει στην ενίσχυση της ρευστότητας της μεμβράνης. Ακόμη οι ερευνητές (Annous, Becker, Bayles D O, Labeda, & Wilkinson, 1997) έδειξαν ότι η αλλαγή της θερμοκρασίας από 20°C σε 5°C προκάλεσε σμίκρυνση των λιπαρών οξέων (εξαιτίας της μείωσης των C που σημειώθηκε προηγουμένως) και μεταστροφή της διακλάδωσης iso-C15:0 σε anteiso-C15:0. Η συστολή των λιπαρών οξέων μειώνει την αλληλεπίδραση άνθρακα- άνθρακα μεταξύ γειτονικών αλυσίδων στην κυτταρική μεμβράνη, πράγμα που συμβάλει στη διατήρηση της ρευστότητας της μεμβράνης για ανάπτυξη σε χαμηλές θερμοκρασίες (Gandhi & Chikindas, 2006).

Μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση και επαγωγή πρωτεϊνών

Ο ψυχρός εγκλιματισμός ενός παθογόνου συνοδεύεται από αλλαγές στην γονιδιακή έκφρασή του. Για την *L.monocytogenes* παρατηρήθηκε ότι συνθέτει μεγαλύτερες ποσότητες mRNA όταν αναπτύσσεται στους 10°C σε σύγκριση με την ανάπτυξη της στους 37°C (Liu, Graham, Bigelow, Morse II, & Wilkinson, 2002). Ακόμη παρατηρήθηκε ότι κατά την διάρκεια της ανάπτυξης της σε χαμηλές θερμοκρασίες παράγει περίπου 12 διαφορετικές πρωτεΐνες ψυχρού σοκ προκυμμένου να ανταπεξέλθει στην προσαρμογή της στο κρύο (Gandhi & Chikindas, 2006).

Συμβατές διαλυτές ουσίες ως κρουοπροστατευτικά

Η *L.monocytogenes* έχει την δυνατότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες να συσσωρεύει συμβατές διαλυτές ουσίες, όπως είναι η γλυκίνη, η βεταΐνη και η καρνιτίνη και να τις χρησιμοποιεί ως κρουοπροστατευτικά (Gandhi & Chikindas, 2006).

Ο ρόλος του παράγοντα stress sigma (σ B)

Κατά την επιβίωση των βακτηρίων σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες προκύπτουν αλλαγές στην μεταγραφή των γονιδίων, οι οποίες επιτυγχάνονται με την σύνδεση εναλλακτικών παραγόντων stress sigma με τον πυρήνα της πολυμεράσης. Ο παράγοντας stress sigma B (σ B) έχει εντοπιστεί σε θετικά κατά Gram βακτήρια όπως την *L.monocytogenes* και τον *Bacillus subtilis*. Ο σ B διεγείρεται ως απόκριση στην πτώση της θερμοκρασίας και βοηθά στην συσσώρευση των κρουοπροστατευτικών πρωτεϊνών όπως η βεταΐνη και η καρνιτίνη. Είναι επομένως ο παράγοντας ο οποίος είναι υπεύθυνος για την συσσώρευση των κρουοπροστατευτικών πρωτεϊνών (Gandhi & Chikindas, 2006).

Επιβίωση υπό την επίδραση όξινου stress

Η *L.monocytogenes* έρχεται συχνά σε επαφή με περιβάλλοντα χαμηλού pH, καθώς διέρχεται από τον γαστρικό σωλήνα και καταλήγει στο φαγόσωμα του μακροφάγου. Ο μικροοργανισμός καταφέρνει να επιβιώνει σε αυτές τις συνθήκες χρησιμοποιώντας έναν αριθμό μηχανισμών προσαρμογής στο stress (Gandhi & Chikindas, 2006).

Επαγωγή πρωτεϊνών

Κατά την έκθεση του βακτηρίου σε όξινο περιβάλλον πραγματοποιούνται μεταβολές στο κύτταρο. Σε πείραμα που έγινε εκτέθηκαν βακτηριακά κύτταρα σε θανατηφόρο

όξινο pH (όξινο στρες) και σε μη θανατηφόρο όξινο pH (προσαρμογή στα οξέα), προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση των πρωτεϊνών. Παρόλο που οι περισσότερες πρωτεΐνες επάγονται στα κύτταρα που εκτέθηκαν στο θανατηφόρο pH, η πλειονότητα των πρωτεϊνών που επάγονται ήταν κοινή και στις δύο συνθήκες pH. Η *L.monocytogenes* αφού προσαρμοστεί στο όξινο περιβάλλον (pH 5,2 για 2 ώρες) είχε αυξημένη αντοχή στο θερμικό σοκ (52°C), το οσμωτικό σοκ (25-30%), αλλά και στο αλκοολικό στρες, κάτι το οποίο μας δείχνει ότι η προσαρμογή του βακτηρίου στα οξέα του προσδίδει την δυνατότητα να είναι πιο ανθεκτικό απέναντι και σε άλλες καταπονήσεις. Αυτή η διασταυρούμενη ανθεκτικότητα που αποκτούν τα κύτταρα έπειτα από την προσαρμογή τους στο όξινο περιβάλλον έχει σημαντικές επιπτώσεις στην βιομηχανία τροφίμων, αφού τα τρόφιμα αντιμετωπίζουν υποθανατηφόρες όξινες επεξεργασίες κατά την παραγωγική διαδικασία (Gandhi & Chikindas, 2006).

Ομοιόσταση του pH

Όλοι οι έμβιοι οργανισμοί κατέχουν και αξιοποιούν μηχανισμούς ομοιόστασης προκειμένου να διατηρούν τα φυσικά τους χαρακτηριστικά. Στην περίπτωση των μικροοργανισμών και ιδιαίτερα όσον αφορά την λειτουργικότητα του κυττάρου έχουν ένα μηχανισμό ομοιόστασης του pH ο οποίος επιτυγχάνει να διατηρεί σταθερό το pH στο ενδοκυτταροπλασματικό τους δίκτυο. Στους αερόβιους οργανισμούς, η ενεργός μεταφορά των κατιόντων υδρογόνου συνδέεται με τη μεταφορά ηλεκτρονίων στις αναπνευστικές αλυσίδες, ενώ στους αναερόβιους η μεταφορά πραγματοποιείται μέσω κατιόντων υδρογόνου της ATPάσης χρησιμοποιώντας ενέργεια από την υδρόλυση της ATP. Η *L.monocytogenes* είναι προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο και επομένως έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί και τις δύο διαδικασίες ως ομοιοστατικό μηχανισμό, ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος (Gandhi & Chikindas, 2006).

Σύστημα αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού

Άλλος ένας μηχανισμός προσαρμογής της *L.monocytogenes* για την επιβίωση σε όξινο στρες είναι η αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού οξέος (GAD). Ο μηχανισμός GAD αποτελείται από τρία γονίδια τα *gadA*, *gadB*, *gadC*, τα οποία κωδικοποιούν δύο αποκαρβοξυλάσες του γλουταμινικού και έναν αντιφορέα γλουταμινικού/ Υ-

αμινοβουτυρικού. Το γλουταμινικό προσλαμβάνεται από το κύτταρο μέσω ενός ειδικού μεταφορέα, και μετά την αποκαρβοξυλίωσή του καταλήγει στο κυτταρόπλασμα, όπου εκεί παράγει Υ-αμινοβουτυρικό και με αποτέλεσμα την χρήση ενός ενδοκυτταρικού πρωτόνιο. Το Υ-αμινοβουτυρικό εξάγεται από το κύτταρο μέσω ενός αντιφορέα της κυτταρικής μεμβράνης. Η απώλεια πρωτονίων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του pH στο κυτταρόπλασμα και την απελευθέρωση αλκαλικού Υ-αμινοβουτυρικού, με αποτέλεσμα την ελαφριά αύξηση του εξωτερικού pH. Η ύπαρξη γλουταμινικού στα τρόφιμα είναι ένας παράγοντας ο οποίος αυξάνει την επιβίωση της *L.monocytogenes* στο γαστρικό υγρό, αφού του παρέχει προσαρμοστική ανθεκτικότητα (Gandhi & Chikindas, 2006).

Ο ρόλος του παράγοντα stress sigma (σ B)

Μελέτες που έχουν διεξαχθεί για τον προσδιορισμό του ρόλου που παίζει ο παράγοντας stress sigma (σ B) στην ανθεκτικότητα της *L.monocytogenes* στο όξινο περιβάλλον. Η επιβίωση του παθογόνου στο όξινο περιβάλλον εξαρτάται από την έκφραση των πρωτεϊνών που είναι εξαρτώμενα από τον παράγοντα σ B. Υπάρχουν σ B-εξαρτώμενοι και σ B-ανεξάρτητοι μηχανισμοί αντίστασης στα οξέα οι οποίοι εξαρτώνται και από την φάση ανάπτυξης στην οποία βρίσκεται ο μικροοργανισμός. Η επιβίωση και η αυξημένη ανθεκτικότητα των κυττάρων της *L.monocytogenes* στην εκθετική φάση ανάπτυξης στο γαστρικό υγρό μετά από έκθεση σε ήπιες όξινες συνθήκες εξαρτώνται εν μέρει από τον παράγοντα σ B. Ο σ B ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων *gadB* (επιβίωση σε όξινο στρες) και *OpuC*, ο οποίος ενεργοποιείται στις χαμηλές θερμοκρασίες και είναι μεταφορέας για την καρνιτίνη (Gandhi & Chikindas, 2006).

Επιβίωση υπό οσμωτικό στρες

Η απόκριση των μικροοργανισμών στο οσμωτικό στρες ονομάζεται οσμωπροσαρμογή, και περιλαμβάνει τόσο φυσιολογικές αλλαγές όσο και αλλαγές των προτύπων της γονιδιακής έκφρασης. Η χρήση άλατος για την μείωση της ενεργότητας ύδατος είναι μια από τις μεθόδους συντήρησης των τροφίμων, η ικανότητα όμως της *listeria monocytogenes* να προσαρμόζεται και να επιβιώνει σε

υψηλές συγκεντρώσεις άλατος καθιστά δύσκολο τον έλεγχο του παθογόνου στα τρόφιμα.

Επαγωγή των πρωτεϊνών

Ένας μηχανισμός που χρησιμοποιεί η *L.monocytogenes* για να ανθίσταται σε περιβάλλοντα άλατος είναι η αλλαγή της γονιδιακής της έκφρασης, η οποία οδηγεί σε μειωμένη ή σε αυξημένη σύνθεση πρωτεϊνών. Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε για το πρότυπο της έκφρασης των πρωτεϊνών με χρήση ηλεκτροφόρησης 2-D, έπειτα από πρόκληση stress άλατος στην *L.monocytogenes*, βρέθηκαν 12 πρωτεΐνες οι οποίες επάγονται από την καταπόνηση άλατος και ταυτοποιήθηκαν με μικροακολουθία και φασματομετρία μάζας (Duché, Trémoulet, Glaser, & Labadie, 2002). Με αυτόν τον τρόπο εντοπίστηκαν οι πρωτεΐνες του άλατος που επάγονται ταχέως και συνεχίζουν να εκφράζονται για αρκετές ώρες. Δυο από τις βασικές πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν είναι η DnaK και η Ctc. Η DnaK είναι πρωτεΐνη θερμικού σοκ η οποία έχει την τάση να σταθεροποιεί τις κυτταρικές πρωτεΐνες. Ενώ το γονίδιο της Ctc σχετίζεται με την αντίσταση της *L.monocytogenes* στην υψηλή οσμωτικότητα απουσία οσμωπροστατευτικών ουσιών όπως η γλυκίνη (Gandhi & Chikindas, 2006).

Συμβατές διαλυτές ουσίες ως οσμωπροστατευτικά

Η προστασία της *L.monocytogenes* στην ώσμωση, υποβοηθάτε από κάποιες συμβατές διαλυτές ουσίες, τα οσμωπροστατευτικά. Είναι διαλυτές ενώσεις, οι οποίες δεν έχουν καθαρό φορτίο στο φυσιολογικό pH και μπορούν να συσσωρευτούν σε υψηλές συγκεντρώσεις μέσα σε ένα κύτταρο χωρίς να επηρεάζουν τις υπόλοιπες κυτταρικές λειτουργίες. Οσμωπροστατευτικές ουσίες οι οποίες έχουν αναφερθεί είναι η γλυκίνη-βηταΐνη, η προλίνη-βηταΐνη, η ακετυλοκαρνιτίνη, η καρνιτίνη, η γβουτυροβηταΐνη και η 3-διμεθυλοσουλφονιοπροπιονική. Παρουσία τέτοιων ενώσεων μπορεί να αυξηθεί ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων του παθογόνου έως και 2,6 φορές, σε σύγκριση με την ανάπτυξη κυττάρων που υπέστησαν καταπόνηση από αλάτι και δεν περιείχαν οσμωπροστατευτικά. Τα κύτταρα προσλαμβάνουν οσμωλύτες από το εξωτερικό περιβάλλον ως απάντηση στο οσμωτικό στρες, κάτι που

βοηθά στην ανάκτηση της ισορροπίας στο εσωτερικό των κυττάρων (Gandhi & Chikindas, 2006).

Ο ρόλος του παράγοντα stress sigma (σ_B)

Ο παράγοντα σ_B είναι σε ακόμη μία περίπτωση λειτουργικός αφού και στην περίπτωση της όσμωσης είναι σημαντικός για την αξιοποίηση της βεταΐνης και της καρνιτίνης ως οσμωπροστατευτικά. Ακόμη έχει μελετηθεί ότι συμβάλει και στην έκφραση του γονιδίου για την κωδικοποίηση της Ctc η οποία έχει θετική επίδραση στην αντίσταση του παθογόνου στην όσμωση. Ενώ είναι αδιαμφισβήτητο ότι ο παράγοντας σ_B αποτελεί σημαντικό μέρος της γενικής απόκρισης της *L.monocytogenes* όταν βρίσκεται σε στρες λόγω αντίξων συνθηκών ανάπτυξης, πρέπει να σημειωθεί ότι ο βαθμός στον οποίο εκείνη εξαρτάται από τον σ_B για την απόκριση στο στρες ποικίλλει μεταξύ των οροτύπων (Gandhi & Chikindas, 2006).

2.15 ΒΙΟΦΙΛΜ

Σχηματισμός Βιομεμβρανών

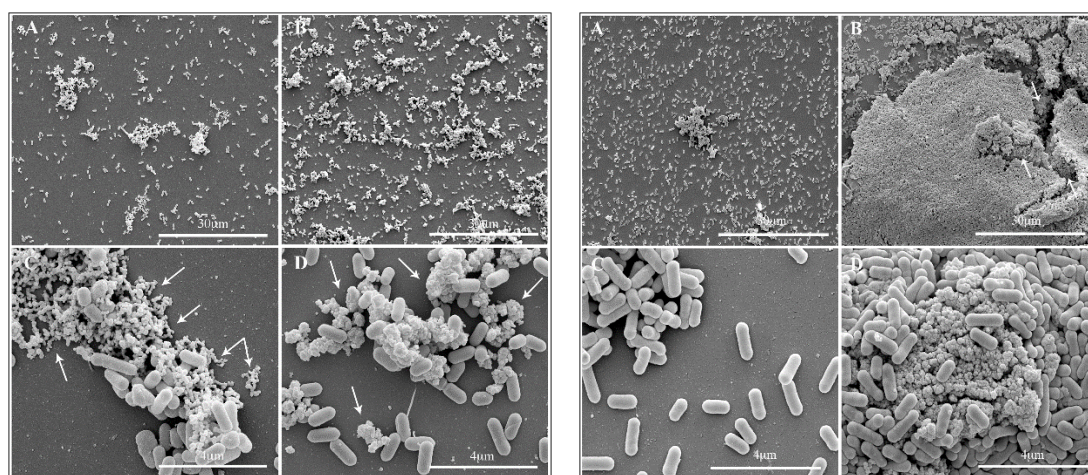
Ένας από τους κυριότερους παράγοντες που καθιστούν την *L.monocytogenes* ένα μεγάλο πρόβλημα για την βιομηχανία των τροφίμων είναι η ικανότητα της να σχηματίζει μεμβράνες οι οποίες προσκολλώνται στις επιφάνειες και ονομάζονται βιοφίλμ, βιομεμβράνες ή και βιοϋμένια. Τα βιοφίλμ ουσιαστικά είναι κοινότητες κυττάρων οι οποίες είναι προσκολλημένες σε μία επιφάνεια και περικλείονται σε μια μήτρα που αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρικό υλικό. Λίγα από τα χαρακτηριστικά των μικροβιακών βιοφίλμ είναι ότι παρουσιάζουν μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης, διαφοροποίηση στα μεταγραφόμενα με τα μη μεταγραφόμενα γονίδια, υψηλότερο βαθμό μεταφοράς γονιδίων μέσω σύζευξης, αυξημένη παραγωγή εξωπολυσακχαριτών και κυρίως παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή σε απολυμαντικά και αντιμικροβιακά, κάτι που δυσχεραίνει κατά πολύ την απολύμανση των βιομηχανικών εγκαταστάσεων. Μπορούν να σχηματίζονται σε ευρύ φάσμα επιφανειών όπως ιατρικές συσκευές, σωληνώσεις συστημάτων ύδρευσης, βιομηχανικό εξοπλισμό κ.α. Σε ένα περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων τα βιοϋμένια εμφανίζονται κυρίως σε επιφάνειες χειρισμού τροφίμων, επιφάνειες επεξεργασίας

τροφίμων και χώρους στους οποίους αποθηκεύονται τα τρόφιμα. Ο σχηματισμών αυτών των βιομεμβρανών σε εγκαταστάσεις παρασκευής και επεξεργασίας τροφίμων είναι επιβλαβής διότι με αυτόν τον τρόπο τα βακτήρια μολύνουν τα τρόφιμα. Τα βιοϋμένια της *L.monocytogenes* εμφανίζονται συνήθως σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων που σχετίζονται με το κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, και προκαλούν ιδιαίτερη ανησυχία, αφού είναι πολύ ανθεκτικά στα απολυμαντικά και η απομάκρυνση τους από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας των τροφίμων αποτελεί ένα μεγάλο πρόβλημα (Gandhi & Chikindas, 2006).

Χαρακτηριστικά Βιομεμβρανών

Τα κύτταρα που είναι προσκολλημένα σε επιφάνειες σε ένα βιοφίλμ διαφέρουν σε πολλά επίπεδα από τα πλαγκτονικά κύτταρα. Μελέτες που έχουν διεξαχθεί για την φυσιολογία των κυττάρων που εμπεριέχονται σε ένα βιοφίλμ εντόπισαν διαφορές στην γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών σε σύγκριση με τα πλαγκτονικά κύτταρα. Από τις 19 πρωτεΐνες που απαντώνται στα βιοφίλμ και εκφράζονται σε υψηλότερα ποσοστά, αρκετές συσχετίζονταν με συνθήκες όπως απόκριση στο στρες, σύνθεση σε διάφορες ρυθμιστικές λειτουργίες του κυττάρου. Η *L.monocytogenes* μπορεί να περιέχεται σε μονοκαλλιέργεια βιοφίλμ, είτε να συνυπάρχει σε βιοφίλμ μικτής καλλιέργειας με άλλα βακτήρια. Ερευνητές ακόμη διεξήγαγαν μια μελέτη για να προσδιορίσουν το επίπεδο προσκόλλησης της *L.monocytogenes* σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα, όταν εκείνη εμπεριέχεται σε βιοφίλμ καθαρής καλλιέργειας και όταν εμπεριέχεται σε βιοφίλμ μικτής καλλιέργειας με *Flavobacterium* (BREMER, MONK, & OSBORNE, 2001). Παρατηρήθηκε, λοιπόν, από την μελέτη αυτή ότι στις επιφάνειες αυτές, προσκολλάται σημαντικά μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων από ένα βιοφίλμ μικτής καλλιέργειας, παρά από ένα βιοφίλμ καθαρής καλλιέργειας, ενώ ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα από το βιοφίλμ μικτής καλλιέργειας μπορούσαν να επιβιώνουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (BREMER, MONK, & OSBORNE, 2001). Η παρουσία της *L.monocytogenes* σε ένα μικτού τύπου βιοφίλμ είναι αρκετά πιθανή μέσα σε ένα χώρο επεξεργασίας τροφίμων διότι συνευρίσκονται στις επιφάνειες επεξεργασίας διάφορα είδη μικροοργανισμών. Το 2004 δύο ερευνητές, οι Carpentier και Chassaing, έκαναν ένα πολύ σημαντικό πείραμα,

απομόνωσαν από ένα περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων 29 βακτηριακά στελέχη, αφού πρώτα είχε πραγματοποιηθεί καθαρισμός και απολύμανση, και τα καλλιέργησαν σε δυαδικά συστήματα με την *L.monocytogenes*. Η σημαντικότητα του πειράματος πηγάζει από το ότι έτσι θα μπορούσαμε να αντιληφθούμε την επίδραση των βακτηρίων που απομονώθηκαν, στην ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ της *L.monocytogenes* σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 16 από τα στελέχη των βακτηρίων προκάλεσαν μείωση του αριθμού των σχηματιζόμενων αποικιών βιοφίλμ, ενώ 4 από τα στελέχη είχαν θετική επίδραση στην εγκατάσταση του παθογόνου σε επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα (Carpentier & Chassaing, 2004). Συμπερασματικά, κατανοούμε πως ο σχηματισμός βιοφίλμ από το βακτήριο *L.monocytogenes*, επηρεάζεται σημαντικά από την ανταγωνιστικότητα που επικρατεί στο θρεπτικό υπόστρωμα από άλλα βακτήρια (Gandhi & Chikindas, 2006).



Εικόνες 3 και 4 : Παρατηρήσεις με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης του σχηματισμού βιοφίλμ δύο διαφορετικών στελεχών *Listeria monocytogenes* αριστερά και δεξιά (Ammendolia, et al., 2014).

2.16 ΜΕΤΡΑ ΕΛΑΤΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Σε κάθε περίπτωση εμφάνισης λιστερίωσης, τα τρόφιμα που ευθύνονται για τα περιστατικά, αποσύρονται από την αγορά με την μέθοδο της ανάκλησης. Το συγκεκριμένο γεγονός επιφέρει μεγάλη οικονομική ζημιά στην βιομηχανία, και

επομένως γίνονται πολλές προσπάθειες για την μείωση της εμφάνισης και του πολλαπλασιασμού της *listeria monocytogenes* στα τρόφιμα που διατίθενται στους καταναλωτές.

Χρήση του παράγοντα σB

Η πρόοδος της γενετικής, προσφέρει τον εντοπισμό γονιδίων και των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν, καθώς και των λειτουργιών τους. Οι πληροφορίες αυτές είναι πολύ χρήσιμες για την ανάπτυξη νέων στρατηγικών για την πρόληψη την επιβίωση και την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών. Όπως έχει αναφερθεί ο παράγοντας σB είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής για την απόκριση της *L.monocytogenes* στο στρες. Το παθογόνο μόλις αντιληφθεί ένα περιβαλλοντικό στρες ενεργοποιεί τον παράγοντα σB και ξεκινά την μεταγραφή του. Τα πρωτεϊνικά προϊόντα που παράγονται αποτελούν μέρος της απόκρισης στο στρες και παρέχουν προστασία στο βακτηριακό κύτταρο. Η λογική της καλύτερης κατανόησης του μηχανισμού ενεργοποίησης του παράγοντα σB θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη μεθόδων συντήρησης, η οποίες έχουν στόχο την αδρανοποίηση του παράγοντα σB και συνεπώς την έκθεση του παθογόνου στις καταστάσεις του στρες (Gandhi & Chikindas, 2006).

Τεχνολογία πολλαπλών εμποδίων

Η τεχνολογία πολλαπλών εμποδίων, είναι ένας συνδυασμός δύο ή περισσότερων επεξεργασιών και χρησιμοποιείται για να επιτευχθεί μία πιο αποτελεσματική μέθοδος συντήρησης τροφίμων. Η σημερινή τάση θέλει τους καταναλωτές να αναζητούν τρόφιμα με όλο και λιγότερες μορφές επεξεργασίας. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει την βιομηχανία στην ανάγκη για φυσική συντήρηση των τροφίμων, όπως την χρήση αντιμικροβιακών πεπτιδίων που δεν έχουν δυσμενείς επιδράσεις στον καταναλωτή ή στο ίδιο το τρόφιμο. Η βακτηριακή νισίνη χρησιμοποιείται ευρέως σαν συντηρητικό για τον έλεγχο της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα, και έχει επίσης αποδειχθεί πολύ χρήσιμη ως μέρος της τεχνολογίας

πολλαπλών εμποδίων. Ο συνδυασμός της νισίνης και του διοξειδίου του άνθρακα σε κύτταρα της *L.monocytogenes* στους 4°C προκάλεσε μείωση των κυττάρων της επιθετικής μορφής του παθογόνου έως και 4 λογαριθμικούς κύκλους. Ένας ακόμη συνδυασμός παρεμποδισμού είναι ο συνδυασμός της νισίνης σε συνεργασία με την επίδραση θερμότητας, η οποία προκάλεσε μείωση των κυττάρων κατά 3,7 λογαριθμικούς κύκλους στα πρώτα 7 λεπτά της επεξεργασίας. Τρίτος μηχανισμός παρεμποδισμού είναι ο συνδυασμός νισίνης και θυμόλης. Η θυμόλη είναι ένα αιθέριο έλαιο του θυμαριού το οποίο έχει αντιμικροβιακή δράση. Αποδείχθηκε ότι όταν αυτοί οι δύο παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν μόνοι τους, είχαν σαν αποτέλεσμα μερική αναστολή των μικροοργανισμών *L.monocytogenes* και *B.subtilis* (Gandhi & Chikindas, 2006).

Τεχνολογία ενθυλάκωσης

Παρότι η τεχνολογία πολλαπλών εμποδίων είναι αρκετά υποσχόμενη, ωστόσο υπάρχει αρκετά μεγάλη απώλεια δραστηριότητας της νισίνης με την πάροδο του χρόνου κάτι που έστρεψε τους ερευνητές στην τεχνική της μικροενθυλάκωσης. Η τεχνολογία της ενθυλάκωσης είναι μια μέθοδος εγκλεισμού υλικών σε κάψουλες πριν από την παράδοση τους σε ένα σύστημα. Τα ενθυλακωμένα υλικά προστατεύονται από δυσμενείς επιδράσεις, όπως θερμότητα, υγρασία, μεταβολών του pH και η δραστηριότητα τους καταφέρνει να μένει ανεπηρέαστη. Στο χώρο των τροφίμων η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται κυρίως για την χορήγηση αρωματικών ενώσεων και βιταμινών σε τρόφιμα και μικροενθυλάκωση προβιοτικών βακτηρίων. Η απελευθέρωση των ενθυλακωμένων υλικών μπορεί να ξεκινήσει από συνθήκες όπως η θερμοκρασία, το pH, η υγρασία κ.α. Έτσι μπορούμε να αξιοποιήσουμε την τεχνική της ενθυλάκωσης για να παρέχουμε στα τρόφιμα αντιμικροβιακούς παράγοντες όπως η νισίνη, χωρίς να χάνουν την δραστηριότητα τους. Η χρήση της νισίνης στα τυριά έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή των καλλιεργείων εκκίνησης, και αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών, επηρεάζοντας τελικά την οξίνιση και την γεύση του τελικού προϊόντος. Ακόμη η χρήση στελεχών που παράγουν βακτηριοσίνες κατά τα στάδια παραγωγής τω τυριών, μεταβάλλει την ποιότητα του τελικού ζυμούμενου προϊόντος. Η τεχνική χορήγησης βακτηριοσινών

σε ενθυλακωμένη μορφή σε συστήματα τροφίμων για την βελτίωση της σταθερότητας είναι πολλά υποσχόμενη αλλά απαιτεί περαιτέρω έρευνα για την βελτιστοποίηση της και την χρήση της στα τρόφιμα (Gandhi & Chikindas, 2006).

Τεχνολογία ενεργού συσκευασίας

Κατά τα στάδια επεξεργασίας του τροφίμου ένα πολύ συχνό φαινόμενο αποτελεί η επιμόλυνση του, η οποία μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο της επεξεργασίας του. Παρατηρήσεις από αρμόδιους φορείς έχουν καταλήξει στο ότι η επιμόλυνση των τροφών μετά το στάδιο της επεξεργασίας και πριν το στάδιο της συσκευασίας, αποτελεί σημαντική πηγή κρουσμάτων. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος αναπτύχθηκε η τεχνολογία της ενεργής συσκευασίας, όπου υλικά ενσωματώνονται στην συσκευασία, είτε για τον έλεγχο της ατμόσφαιρας στο εσωτερικό της συσκευασίας (υγρασία, οξυγόνο, pH) είτε για να εμποδίσουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών στο τρόφιμο. Η αυξανόμενη ζήτηση των καταναλωτών για ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα, τα οποία να έχουν βολική συσκευασία, και υψηλή διατηρησιμότητα, έχει εξελίξει αρκετά τον τομέα της αντιμικροβιακής συσκευασίας, όπου χρησιμοποιούνται βρώσιμες μεμβράνες, και επιστρώσεις για την παροχή αντιμικροβιακών παραγόντων όπως η λυσοζύμη, η τρικλοζάνη και η νισίνη στα τρόφιμα (Gandhi & Chikindas, 2006).

3. Οξυγαλακτικά Βακτήρια – Lactic Acid Bacteria (LAB)

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παραγωγή πολλών παραδοσιακών και σύγχρονων προϊόντων τροφίμων, στηρίζεται η βασική βιοχημική διεργασία της ζύμωσης. Ο ορισμός της ζύμωσης ως προς την βιοχημική της έννοια, είναι ότι η ζύμωση αποτελεί μια διαδικασία που χρησιμοποιούν τα βακτήρια, ώστε να μπορέσουν να παράγουν ενέργεια από τον καταβολισμό των υδατανθράκων, υπό την απουσία οξυγόνου (Montville & Matthews, 2010). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι τα βακτήρια που ευθύνονται για τις γαλακτικές ζυμώσεις. Υπάρχουν τα ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια, που παράγουν μόνο γαλακτικό οξύ και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των γαλακτοκομικών προϊόντων (LAB-lactic acid bacteria), και τα ετεροζυμωτικά βακτήρια, τα οποία παράγουν περισσότερα από ένα προϊόντα, και συμβάλουν στην παραγωγή αρωματικών ενώσεων. Βέβαια, κατά τα στάδια παραγωγής γαλακτοκομικών και συγκεκριμένα κατά το στάδιο της παστερίωσης, τα περισσότερα από τα γαλακτικά βακτήρια του γάλακτος θανατώνονται, κάτι το οποίο επιφέρει στους παραγωγούς καλύτερο έλεγχο, αφού με την προσθήκη κατάλληλης καλλιέργειας σε συγκεκριμένη ποσότητα μπορούν να ελέγξουν την παραγωγή του οξέος στο τελικό προϊόν. Το συγκεκριμένο γεγονός καθιστά το προϊόν πιο σταθερό ως προς την παραγωγή του. Τα γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως προσθήκες κατά την παραγωγική διαδικασία, ονομάζονται καλλιέργειες εκκίνησης (Montville & Matthews, 2010).

Πίνακας 3 : οξυγαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τυριών και ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων. (Montville & Matthews, 2010)

Προϊόν	Χρησιμοποιούμενο γαλακτικό βακτήριο	Καλλιέργεια που έχει ενσωματωθεί σκοπίμως από τον παραγωγό
---------------	--	---

Κόλμπυ, Τσένταρ, κότατζ, τρούι κρέμα	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp.cremoris</i> ή <i>lactis</i>	-
Γκούντα, Ένταμ, Αβάρτι	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp.cremoris</i> ή <i>lactis</i>	<i>Leuconostoc spp.</i> , <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
Μπρίκ, Λιμπούργκερ	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp.cremoris</i> ή <i>lactis</i>	<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Brevibacterium linens</i> , <i>micrococcus spp.</i>
Καμαμπέρ	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp.cremoris</i> ή <i>lactis</i>	<i>Penicillium camamberti</i>
Μπλέ	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp.cremoris</i> ή <i>lactis</i>	<i>L.lactis subsp lactis</i> , <i>Penicillium roqueforti</i>
Μοσαρέλλα, προβολόνε, Ρομάνο, Παρμεζάνα	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus</i> , <i>lactobacillus helveticus</i>	Προστίθενται μόνο ζωικές λιπάσες στο ρομάνο για πιο πικάντικη γεύση.
Ελβετικό	<i>S.thermophilus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii</i>
Γιαούρτι	<i>S.thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i>	-
Βουτυρόγαλα	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp.cremoris</i> ή <i>lactis</i>	<i>Leuconostoc spp.</i> , <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
Ξινή κρέμα	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp.cremoris</i> ή <i>lactis</i>	-

3.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το 1873 έγινε η πρώτη καθαρή καλλιέργεια από βακτήριο του γαλακτικού οξέος (LAB), μέσω διαδοχικών απομονώσεων από τον J. Lister. Παρότι η ζύμωση σαν διαδικασία παρασκευής των τροφών, υπάρχει περισσότερο από 5.000 χρόνια, οι καλλιέργειες εκκίνησης που χρησιμοποιούνται για τις διαδικασίες της ζύμωσης τυριών και ξινών γαλακτοκομικών προϊόντων ξεκίνησαν από το 1890. Έπειτα από την έναρξη πιο συστηματικής προσέγγισης στην παραγωγή των γαλακτοκομικών προϊόντων, το 1919 έγινε από τον S. Orla-Jensen η πρώτη μονογραφία. Σύμφωνα με αυτήν, τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, το οποίο αναπτύσσεται υπό κανονικές συνθήκες είναι αεροανεκτικό, έχει ανθεκτικότητα στα οξέα, οργανοτροφικό και είναι αυστηρά ζυμωτικό σε ραβδόμορφο ή σε σχήμα κόκκου, και παράγει γαλακτικό οξύ ως κύριο τελικό προϊόν. Δεν διαθέτουν κυτοχρώματα και δεν είναι ικανά να συνθέσουν πορφυρίνες, αν και τα χαρακτηριστικά του μπορούν να μεταβληθούν υπό ορισμένες συνθήκες, επομένως η καταλάση και τα κυτοχρώματα ενδέχεται να σχηματιστούν παρουσία αίμης και το γαλακτικό οξύ μπορεί να μεταβολιστεί περεταίρω, με αποτέλεσμα να προκύψει μικρότερη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος. Τα κύτταρά τους είναι συνήθως μη κινητικά, και έχουν απαίτηση από σύνθετους κινητικούς παράγοντες όπως είναι οι βιταμίνες και τα αμινοξέα (König & Fröhlich, 2017).

3.3 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) ανήκουν στην κατηγορία των Gram θετικών βακτηρίων, είναι μη σπορογόνα βακτήρια, βάκκιλοι ή κοκκοβάκιλοι, και δεν παράγουν καταλάση. Δεν έχουν κυτοχρώματα και είναι ανθεκτικά στα οξέα. Τα περισσότερα είδη είναι αερόβια, αν και υπάρχουν και κάποια τα οποία είναι αυστηρά αναερόβια. Εντοπίζονται ευρύτατα στο περιβάλλον, καθώς απαντώνται σε σύνθετα υποστρώματα τροφίμων, στην στοματική κοιλότητα και στο έντερο του ανθρώπου. Από όλα τα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων κανένα δεν είναι παθογόνο, ενώ παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα παρουσία γαλακτικού οξέος (Τυμπής , Πετράκης , & Κοντελής , 2016). Απαντώνται σε πολλά τρόφιμα τα οποία είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, όπως λαχανικά, γάλα , κρέας. Υπάρχουν φυσικά και

εξαιρέσεις, γαλακτικά βακτήρια δηλαδή που έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά από τα κοινότυπα, εκτός των χαρακτηριστικών της θετικότητας κατά Gram και το γεγονός ότι είναι μη σπορογόνα, τα οποία δεν είναι αμφισβητήσιμα. Ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η ικανότητα σύνθεσης ομάδων πορφυρίνης, το οποίο αποτελεί την βάση της ύπαρξης πολλών χαρακτηριστικών που προαναφέρθηκαν. Η ικανότητα λοιπόν αυτή, είναι που βοηθά τα βακτήρια να προσαρμόζονται όταν αναπτύσσονται σε εργαστηριακά μέσα ανάπτυξης, τα οποία στερούνται αιματίνης και συναφών ενώσεων. Υπό αυτές τις συνθήκες τα βακτήρια δεν χρησιμοποιούν τον μηχανισμό της μεταφοράς των ηλεκτρονίων της αλυσίδας, και βασίζονται αποκλειστικά και μόνο στη ζύμωση, δηλαδή στο επίπεδο του υποστρώματος της φωσφορυλίωσης, για την παραγωγή ενέργειας (Khalid, 2011).

Δεν είναι όλες οι οξυγαλακτικές ζυμώσεις ωφέλιμες, η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, μπορεί να επιφέρουν ανεπιθύμητα αποτελέσματα στα τρόφιμα, όπως για παράδειγμα, σκασίματα και σχηματισμό βλέννας στα τυριά, περίεργη οσμή στην κρέμα γάλακτος, πρασίνισμα κρεάτων και αλλαντικών, σχηματισμός βλέννας και αερίων σε μαρινάτα ψάρια, διόγκωση κονσερβών, σχηματισμός αερίων και περίεργης οσμής στην μαγιονέζα κ.α. (Τυμπής , Πετράκης , & Κοντελής , 2016).

3.4 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Η φυσιολογία των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος άρχισε να απασχολεί τον επιστημονικό κλάδο, από την στιγμή που διαπιστώθηκε ότι σχετίζονται με την οξίνιση των τροφίμων και των ζωοτροφών. Η πλήρης επίγνωση των μεταβολικών οδών που ακολουθούν τα βακτήρια προκυμμένου να ζυμώσουν τους υδατάνθρακες προς παραγωγή γαλακτικού οξέος, θα βοηθούσε στο να γίνουν πιο ελεγχόμενες οι διαδικασίες παραγωγής των προϊόντων. Οι σύγχρονη βιοτεχνολογία βασίζεται στις τεχνικές της γενετικής οι οποίες είναι πολλά υποσχόμενες, παρόλο αυτά όμως δεν μπορούν να εξελιχθούν αν δεν υπάρξει καλή κατανόηση της φυσιολογίας των κυττάρων του γαλακτικού οξέος (Khalid, 2011).

Η ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων ξεκίνησε από την Orla-Jensen η οποία χρησιμοποίησε την μορφολογία (κόκκοι, ράβδοι, σχηματισμός τετραέδρων), τον τρόπο της ζυμωτικής διεργασίας της γλυκόζης (ομοζυμωτική – ετεροζυμωτική), την ανάπτυξη σε ορισμένες κρίσιμες συνθήκες (χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες 10°C και 45°C) και την μορφή του παραγόμενου γαλακτικού οξέος (D και L στερεοϊσομέρεια) για να πραγματοποιήσει την ταξινόμηση. Τα συγκεκριμένα κριτήρια ταξινόμησης συνεχίζουν να υφίστανται μέχρι και σήμερα, αν και μετά την μελέτη της Orla-Jensen προσδιορίστηκε ότι ο πυρήνας των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος αποτελείται από τέσσερα γένη. Τα γένη είναι τα *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus*. Η Orla-Jensen θεώρησε ότι τα βακτήρια που αποτελούν την ομάδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι φυλογενετικά συγγενή, και διαφέρουν από άλλες ομάδες. Εκείνη την εποχή μόνο τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μπορούσαν να εξετασθούν και να εκτιμηθούν οι φυλογενετικοί δείκτες, ενώ σήμερα έχουμε ακριβή μέσα έτσι ώστε να μπορέσουμε να εξετάσουμε πιο εμπειριστωμένα τα μακρομόρια του των βακτηριακών κυττάρων, πράγμα που βελτιώνει την κατάταξη τους μέσω του σαφέστερου προσδιορισμού των φυλογενετικών θέσεων, έχοντας εντοπίσει περισσότερα γένη και είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων από τότε μέχρι και σήμερα. Οι διαφορές μεταξύ ειδών και υποειδών μπορούν να προσδιοριστούν με μελέτες ομολογίας DNA-DNA. Για τις διαφορές μεταξύ ειδών και γενών χρησιμοποιείται το ριβοσωμικό RNA (rRNA). Οι συγκρίσεις των αλληλουχιών του RNA αποτελεί την τεχνική με την καλύτερη ακρίβεια για τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων των μικροοργανισμών (Khalid, 2011).

Τα γένη τα οποία κατά βάση, ικανοποιούν την περιγραφή των βασικών χαρακτηριστικών των LAB είναι τα *Aerococcus* (A.), *Lactobacillus* (Lb.), *Leuconostoc* (Ln.), *Pediococcus* (P.) και *Streptococcus* (S.). Κομβική αναθεώρηση της ταξινόμησης των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος έγινε το 1986, όπου το γένος *Streptococcus* διαιρέθηκε στα τρία γένη: *Enterococcus* (E.), *Lactococcus* (L.) και *Streptococcus sensu stricto*. Έπειτα άλλο ένα γένος ήρθε να προστεθεί στην κατηγορία των οξυγαλακτικών το *Vagococcus* (V.), στο οποίο ανήκουν ορισμένοι κινητικοί τύποι βακτηρίων τα οποία μοιάζουν πολύ με τους λακτόκοκκους (Khalid, 2011).

Έχουν μελετηθεί περισσότερα από 19 πλήρη γονιδιώματα στρεπτόκοκκων τα οποία είναι διαθέσιμα και καλύπτουν διάφορα στελέχη των πέντε ειδών. Οι γαλακτοβάκιλλοι έχουν μικρά γονιδιώματα για τα μη υποχρεωτικά βακτηριακά παράσιτα (χαρακτηριστικό μέγεθος γονιδιώματος 2.000 γονίδια), ο αριθμός γονιδίων τους κυμαίνεται από 1.600 έως 3.000. Αυτό το εύρος στον αριθμό των γονιδίων δείχνει ότι η εξέλιξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων σχετίζεται με ενεργές διαδικασίες απώλειας γονιδίων, διπλασιασμού και απόκτησης. Η ύπαρξη της συλλογής των γονιδιωμάτων των οξυγαλακτικών βακτηρίων, βοηθά κατά πολύ στην περεταίρω ταξινόμηση των βακτηρίων, μέσω της αξιολόγησης των πολλαπλών συγγενικών γονιδιωμάτων και με διαβάθμιση της απόκλισης στις αλληλουχίες της γονιδιωματικής οργάνωσης (Khalid, 2011).

Το γένος *Lactobacillus* προτάθηκε από τον Beijerinck το 1901 και περιλαμβάνει θετικούς κατά Gram ζυμωτικούς, προαιρετικά αναερόβιους και μη σπορογόνους μικροοργανισμούς. Το γένος κατατάσσεται στο φύλο *Firmicutes*, τάξη *Bacilli*, σειρά *Lactobacillales*, οικογένεια *Lactobacillaceae* η οποία περιλαμβάνει τα γένη *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*. Ο πλησιέστερος συγγενής σε επίπεδο οικογένειας είναι η οικογένεια *Leuconostocaceae*, που περιλαμβάνει τα γένη *Convivina*, *Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* και *Weissella*. Έχει αναγνωριστεί ότι το γένος *Lactobacillus*, όπως ορίζεται σήμερα, εμφανίζει ένα επίπεδο γενετικής ποικιλομορφίας που υπερβαίνει κατά πολύ αυτό που συνίσταται γενικά στα βακτηριακά γένη ή και στις βακτηριακές οικογένειες, για αυτό το λόγω τα τελευταία χρόνια το γένος *Lactobacillus* έχει διαιρεθεί σε πολλά επιμέρους γένη, και περιλαμβάνει και το γένος *Pediococcus* ως αναπόσπαστο τμήμα. Τα είδη του γένους *Lactobacillus* με την προηγούμενη ταξινόμηση η οποία αναφέρετε παραπάνω περιλάμβανε 262 είδη, τα οποία είναι εξαιρετικά ποικίλα σε φαινοτυπικό, οικολογικό και γονοτυπικό επίπεδο. Οι μελέτες και περιγραφές των τελευταίων ετών έχουν ανεβάσει τον αριθμό των έγκυρα κατονομαζόμενων ειδών των *Lactobacillus* και *Pediococcus* στα 273, αυξάνοντας έτσι και την ποικιλομορφία που σχετίζεται με το γένος *Lactobacillus*. Στην εκ νέου ταξινόμηση του γένους αξιολογούνται οι παράμετροι της φυλογένεσης του κεντρικού γονιδιώματος, κατά ζεύγη ταυτότητα αμινοξέων, τα γονίδια, τα οποία είναι το κυριότερο χαρακτηριστικό της κάθε ομάδας,

τα φυσιολογικά κριτήρια και η οικολογία των μικροοργανισμών. Εντός των *Lactobacillaceae*, εντοπίστηκαν 26 γενεαλογικές γραμμές που διαχωρίζονται αξιόπιστα και χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένους φαινοτύπους και χαρακτηριστικά γονίδια που είναι ειδικά για τις γενεαλογικές ομάδες. Η επαναταξινόμηση του γένους έγινε σε 25 νέα γένη, στα οποία συμπεριλαμβάνεται και το γένος *Lactobacillus* αναδιαρθρωμένο, το οποίο περιλαμβάνει οργανισμούς προσαρμοσμένους σε ξενιστές που έχουν αναφερθεί ως *L.delbrueckii* group, *Paralactobacillus* και 23 ακόμη νέα γένη με τις ονομασίες *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* και *Lentilactobacillus*. Με τα νέα αυτά δεδομένα η οικογένεια *Lactobacillaceae* μετονομάστηκε σε *Lactobacilli* και θα συμπεριλαμβάνει όλα τα γένη που προηγουμένως ανήκαν στις οικογένειες *Lactobacillaceae* και *Leuconostocaceae*. Ο εκ νέου προσδιορισμός του γένους αντικατοπτρίζει τη φυλογενετική θέση των μικροοργανισμών και ομαδοποιεί του γαλακτοβάκιλλους σε ισχυρές κλάσεις με κοινές οικολογικές και μεταβολικές ιδιότητες, όπως για παράδειγμα για το διορθωμένο είδος *Lactobacillus* που περιλαμβάνει είδη προσαρμοσμένα στα σπονδυλωτά, όπως *L.delbrueckii*, *L.iners*, *L.crispatus*, *L.jensensii*, *L.johnsonii* και *L.acidophilus* ή στα ασπόνδυλα όπως *L.apis* και *L.bombicola* (Zheng , et al., 2020).

Πίνακας 4: Ταξινόμηση των γενεών των οξυγαλακτικών βακτηρίων (König & Fröhlich, 2017) (Zheng , et al., 2020).

Οικογένεια	Γένος
	<i>Abiotrophia</i>
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>
	<i>Dolosicoccus</i>
	<i>Eremococcus</i>

	<i>Facklamia</i>
	<i>Globicatella</i>
	<i>Ignavigranum</i>
	<i>Alkalibacterium</i>
	<i>Allofustis</i>
	<i>Alloiococcus</i>
	<i>Atopobacter</i>
	<i>Atopococcus</i>
	<i>Atopostipes</i>
Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium</i>
	<i>Desemzia</i>
	<i>Dolosigranulum</i>
	<i>Granulicatella</i>
	<i>Isobaculum</i>
	<i>Marinilactibacillus</i>
	<i>Trichococcus</i>
	<i>Enterococcus</i>
Enterococcaceae	<i>Melissococcus</i>
	<i>Tetragenococcus</i>
	<i>Vagococcus</i>
	<i>Lactobacillus</i>
	<i>Paralactobacillus</i>
	<i>Holzapfelia</i>
	<i>Amylolactobacillus</i>
	<i>Lapidilactobacillus</i>
Lactobacillaceae	<i>Latilactobacillus</i>
	<i>Lactiplantibacillus</i>
	<i>Agrilactobacillus</i>
	<i>Schleiferilactobacillus</i>
	<i>Loigolactobacillus</i>
	<i>Lacticaseibacillus</i>

	<i>Liquorilactobacillus</i>
	<i>Ligilactobacillus</i>
	<i>Furfurilactobacillus</i>
	<i>Paucilactobacillus</i>
	<i>Limosilactobacillus</i>
	<i>Fructilactobacillus</i>
	<i>Acetilactobacillus</i>
	<i>Apilactobacillus</i>
	<i>Levilactobacillus</i>
	<i>Secundilactobacillus</i>
	<i>Lentilactobacillus</i>
	<i>Dellaglioia</i>
	<i>Bombilactobacillus</i>
	<i>Companilactobacillus</i>
	<i>Pediococcus</i>
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>
	<i>Oenococcus</i>
	<i>Weissella</i>
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>
	<i>Lactovum</i>
	<i>Streptococcus</i>

3.5 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Με την κατηγορία των οξυγαλακτικών βακτηρίων, αναφερόμαστε σε πολλά είδη μικροοργανισμών. Συνεπώς δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο υπόστρωμα το οποίο να είναι ιδανικό για την αρίθμηση όλων των ειδών των οξυγαλακτικών βακτηρίων που μπορεί να υπάρχουν σε ένα τρόφιμο. Με αυτόν τον περιοριστικό παράγοντα, ειδικά υποστρώματα έχουν δημιουργηθεί τα οποία να μπορούν να αναπτύσσουν ως

επί το πλείστων τους λακτοβάκκιλους, και σε μικρότερο ποσοστό, τα γένη *Leuconostoc*, *Micrococcus* και *Streptococcus*.

Μέθοδοι εμβολιασμού

Μέθοδος ενσωμάτωσης

Εφόσον έχουν πραγματοποιηθεί οι απαραίτητες δεκαδικές αραιώσεις από την αρχική σύσταση του δείγματος, εμβολιάζουμε σε διπλή σειρά τρυβλίων. Έπειτα προσθέτουμε περίπου 15 ml ρευστού θρεπτικού υλικού (MRS Agar), και το αφήνουμε να στερεοποιηθεί. Τέλος προσθέτουμε μια ακόμη ποσότητα περίπου 5ml του θρεπτικού υλικού, έτσι ώστε να δημιουργήσουμε διπλή στιβάδα επικάλυψης και να μην δημιουργηθούν επιφανειακές αποικίες. Επωάζουμε στους 37°C για 3 ημέρες ή στους 30°C για 5 ημέρες. Μια ευνοϊκή συνθήκη για την ανάπτυξη των λακτοβάκκιλων είναι η ύπαρξη CO₂ στο περιβάλλον σε αναλογία 5% (Τυμπής , Πετράκης , & Κοντελής , 2016).

Μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης

Τοποθετούμε το ρευστό υπόστρωμα που πρόκειται να στερεοποιηθεί, το αφήνουμε να πήξει, και έπειτα εμβολιάζουμε επιφανειακά με περίπου 0,1-0,2ml από κάθε δεκαδική αραιώση. Αποστειρώνουμε μία γυάλινη ράβδο στον λύχνο, και με αυτήν εξαπλώνουμε την αραιώση του δείγματος σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος. Στην συνέχεια, όταν στεγνώσει καλά, προσθέτουμε άλλη μια στιβάδα επικάλυψης με το ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα. Επωάζουμε στους 37°C για 3 ημέρες, ή στους 30°C για 5 ημέρες (Τυμπής , Πετράκης , & Κοντελής , 2016).

Χρησιμοποιούμενα θρεπτικά υποστρώματα

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούμε για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι κατά βάση τα MRS Agar (γάλα και γαλακτοκομικά), Rogosa Agar, Tomato Juice Agar, APT Agar (κρέας και πουλερικά), ενώ για όλες τις αραιώσεις χρησιμοποιούμε αραιωτικό υγρό.

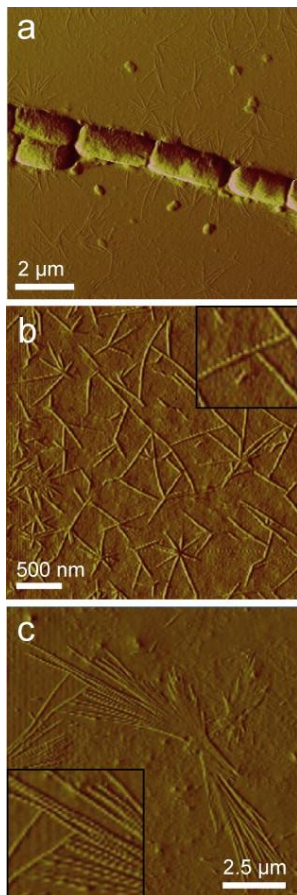
MRS Agar: 10,0g Peptone, 10,0g Beef Extract, 4,0g Yeast Extract, 20,0g Dextrose, 1,0ml Tween 80, 2,0g Di-potassium Hydrogen Phosphate, 5,0g Sodium Acetate (3H₂O), 2,0g Di-ammonium Hydrogen Citrate, 0,2g Magnesium Sulfate (7H₂O), 0,04g Maganese

Sulfate (4H₂O), 14,0g Agar, 1000,0ml D.W.q.s.p./ pH: 5,7 και αποστείρωση στους 118°C για 15 λεπτά (Τυμπής , Πετράκης , & Κοντελής , 2016).

Rogosa Agar: 10,0g Peptone, 5,0g Yeast Extract, 20,0g Glucose, 1,0ml Tween 80, 6,0g Potassium Di-hydrogen Phosphate, 2,0g Ammonium Citrate, 15,0g Sodium Acetate, 1,32ml Glacial Acetic Acid, 0,575g Magnesium Sulfate, 0,12 g Manganese Sulfate, 0,034g Iron (II) Sulfate, 15,0g Agar, 1000,0ml D.W.q.s.p./ pH: 5,5 και δεν εφαρμόζεται αποστείρωση (Τυμπής , Πετράκης , & Κοντελής , 2016).

Tomato Juice Agar: 20,0g Tomato Juice (solids from 400ml), 10,0g Peptone, 10,0g Peptonized Milk, 12,0g Agar, 1000,0ml D.W.q.s.p / pH: 6,1 και αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά (Τυμπής , Πετράκης , & Κοντελής , 2016).

ATP Agar: 12,5g peptone, 7,5g Yeast Extract, 10,0g Glucose, 5,0g Sodium Chloride, 5,0g Tri-Sodium Citrate, 5,0g Di-Potassium Hydrogen Phosphate, 0,2ml Tween 80, 0,8g Magnesium Sulfate, 0,14g Manganese Chloride, 0,04g Iron (II) Sulfate, 0,001g Thiamonium Di-chloride, 13,5g Agar, 1000,0ml D.W.q.s.p. / pH: 6,7 και αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά (Τυμπής , Πετράκης , & Κοντελής , 2016).



Εικόνα 5: Στις εικόνες μέσω της δυναμικής ατομικής μικροσκοπίας φαίνεται η δισδιάστατη συναρμολόγηση των βακτηριακών πυρήνων. α) εικόνα στον αέρα από εκθετικά αναπτυσσόμενα κύτταρα του *Lactobacillus rhamnosus* GG, β) εικόνα απομονωμένων αποικιών οξυγαλακτικών στον αέρα η οποία λαμβάνεται με την επαφή εναιωρήματος κυττάρων με μαρμαρυγία, γ) οι αποικίες υποβλήθηκαν σε διπλή φυγοκέντριση και σχημάτισαν δισδιάστατες δέσμες. Τα β) και γ) αντιπροσωπεύουν μεγεθυμένες όψεις των αποικιών που δείχνουν ελικοειδή μορφή που μοιάζει με ελατήριο (Tripathi, et al., 2012).

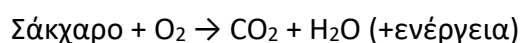
3.6 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Βιοχημική υπόσταση της διαδικασίας της ζύμωσης

Όλη η βάση της ζύμωσης στηρίζεται στην βιοχημική ύπαρξη της οξείδωσης, και στο γεγονός πως όταν μια ένωση οξειδώνεται, χάνει δηλαδή ένα ηλεκτρόνιο, απελευθερώνει ενέργεια. Η διαδικασία της ζύμωσης, δεν φέρνει απαραίτητα τα προϊόντα στο τελικό στάδιο της οξείδωσης τους, για παράδειγμα η αλκοόλη που είναι

ζυμώμενο προϊόν φτάνει στην τελική οξειδωμένη του μορφή όχι μέσω της διαδικασίας της ζύμωσης, αλλά με καύση, όπου εκλύει και το μέγιστο ποσό ενέργειας προς το κύτταρο. Συνεπώς στην διαδικασία της ζύμωσης το οξυγόνο είναι ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων, ο οποίος ανάγεται, και τα σάκχαρα είναι εκείνα τα οποία οξειδώνονται. Στην περίπτωση των γαλακτοκομικών οξειδώνεται το σάκχαρο της λακτόζης προς γαλακτικό οξύ (Montville & Matthews, 2010).

Αντίδραση ζύμωσης:



Η συγκεκριμένη οξειδωτική ενέργεια προσφέρει στο κύτταρο μεγάλα ποσά ενέργειας τα οποία αποθηκεύονται με την μορφή φωσφοριλιωμένων ενώσεων. Κυριότερη αποταμιευτική μορφή ενέργειας αποτελεί η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Όλη η ουσία στην μεταφορά και παραλαβή της ενέργειας από και προς άλλα μόρια κρύβεται μέσα στις φωσφορικές ομάδες, οι οποίες αποσπώνται και μεταφέρουν ενέργεια. Αν ένα μόριο γλυκόζης οξειδωθεί πλήρως, τότε παράγονται 34 μόρια ATP. Παρόλα αυτά στα ζυμώμενα τρόφιμα δεν υπάρχει διαθέσιμο οξυγόνο, έτσι ώστε το σύστημα να το εκμεταλλευτεί σαν τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων, συνεπώς ο τελικός αποδέκτης είναι ένα μέρος του ίδιου του σακχάρου, με αποτέλεσμα να μην υφίσταται πλήρης οξείδωση σε κανένα σάκχαρο αλλά να έχουμε ατελή οξείδωση, η οποία θα επιφέρει μερικώς οξειδωμένες ενώσεις. Τα τελικά προϊόντα είναι ενώσεις όπως η αιθανόλη, το οξικό και το γαλακτικό οξύ τα οποία δεν αποφέρουν μεγάλα ποσά ενέργειας στο κύτταρο, και παρέχουν μεταξύ 1-2 μόρια ATP για κάθε μόριο γλυκόζης (Montville & Matthews, 2010).

Καταβολικά μονοπάτια των ζυμώσεων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούν διάφορα καταβολικά μονοπάτια προκειμένου να μετατρέψουν τους υδατάνθρακες σε ενέργεια. Υπάρχουν διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια που χρησιμοποιεί το κάθε βακτήριο προκειμένου να πραγματοποιήσει τον στόχο του. Τρία πολύ γνωστά καταβολικά

μονοπάτια είναι τα Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), το Entner-Doudoroff, το ομοζυμωτικό μονοπάτι και το ετεροζυμωτικό μονοπάτι. Το ποια μεταβολική οδό θα χρησιμοποιήσει κάποιος μικροοργανισμός εξαρτάται από παράγοντες όπως την ύπαρξη γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν εξειδικευμένα ένζυμα, τον τρόπο και τον ρυθμό λειτουργείας τους, καθώς σημαντικό ρόλο παίζουν και τα παρεχόμενα στους μικροοργανισμούς σάκχαρα που περιλαμβάνονται στο υπόστρωμα του τροφίμου. Τα γένη *Lactococcus* και *Pediococcus* είναι ομοζυμωτικά και παράγουν μόνο γαλακτικό οξύ. Στο γένος *Lactobacillus* υπάρχουν είδη τα οποία είναι ομοζυμωτικά και είδη τα οποία είναι ετεροζυμωτικά, ενώ υπάρχουν και κάποια τα οποία μπορούν να αξιοποιούν και τα δύο μονοπάτια (Montville & Matthews, 2010).

Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)

Η συγκεκριμένη μεταβολική οδός αποτελεί την πιο συνηθισμένη οδό για τον καταβολισμό της γλυκόζης, και την μεταβολίζει σε πυροσταφυλικό οξύ. Ένα μόριο γλυκόζης μετατρέπεται σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Όταν ο καταβολισμός έχει φτάσει σε αυτό το σημείο, το σύστημα δεν βρίσκεται σε κατάσταση ισορροπίας. Για να επέλθει η επιθυμητή ισορροπία χρειάζεται το πυροσταφυλικό οξύ να οξειδωθεί περαιτέρω σε γαλακτικό οξύ ή αιθανόλη. Ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα που λειτουργεί ως εκκινήτης και καθορίζει τον ρυθμό του μεταβολισμού είναι η φωσφοφρουκτοκινάση. Έχει την ικανότητα να μετατρέπει την 6-φωσφορική φρουκτόζη σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη. Η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη ενεργοποιεί την αφυδρογονάση του γαλακτικού, πράγμα που κάνει την ροή των ανθράκων προς το πυροσταφυλικό, να σχετίζεται με την αναγέννηση του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NAD), κάτι που συμβαίνει όταν το πυροσταφυλικό οξύ ανάγεται σε γαλακτικό οξύ. Παράγονται δύο μόρια ATP ανά ένα μόριο γλυκόζης, από σάκχαρα με έξι άτομα άνθρακα, και είναι είδος ομογαλακτικής ζύμωσης, παράγεται δηλαδή από αυτόν μόνο γαλακτικό οξύ, και συνεπώς το πραγματοποιούν οι ομογαλακτικοί μικροοργανισμοί (Montville & Matthews, 2010).

Entner-Doudoroff

Το συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τις ζυμώσεις των γαλακτοκομικών, ζυμώνει σάκχαρα με πέντε άτομα άνθρακα, δηλαδή πεντόζες.

Είναι και αυτό ένα γλυκολυτικό μονοπάτι, και παράγει ένα μόριο ATP ανά μόριο γλυκόζης. Αυτή η μεταβολική οδός χρησιμοποιείται κυρίως από αερόβιους μικροοργανισμούς όπως είναι τα είδη *Pseudomonas*. Η λακτόζη είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από γλυκόζη και γαλακτόζη, υφίσταται διεργασία διάσπασης κατά την ζύμωση και μας δίνει τους δύο μονοσακχαρίτες που έχει σαν δομικές μονάδες. Εδώ η γλυκόζη μετατρέπεται αρχικά σε 2-κετο-δεόξυ-6-φωσφογλουκονικό οξύ. Έπειτα το ένζυμο κετο-δεοξυ-φωσφογλουκονική αλδολάση το διασπά σε ένα μόριο πυροσταφυλικού οξέος και ένα μόριο 3-φωσφογλυκεραλδεΐδης. Η 3-φωσφογλυκεριναλδεΐδη συνεχίζει το μονοπάτι του EMP καταβολισμού (Montville & Matthews, 2010).

Ομοζυμωτικός Καταβολισμός

Τα ομογαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούν το μονοπάτι EMP και παράγουν αποκλειστικά γαλακτικό οξύ. Κάποια από τα γένη που περιλαμβάνονται σε αυτή την κατηγορία είναι τα *Lactococcus*, *Pediococcus* και μερικά είδη του γένους *Lactobacillus*. Κατά την διάρκεια της μεταβολικής διαδρομής παράγεται πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο στην συνέχεια ανάγεται από την αφυδρογονάση του γαλακτικού, παράγοντας γαλακτικό οξύ και αναγεννώντας το νικοτιναμιδο-αδενινω-δινουκλεοτιδίου (NAD) (Montville & Matthews, 2010).

Ετεροζυμωτικός Καταβολισμός

Αυτό το μονοπάτι καταβολισμού το πραγματοποιούν τα είδη του γένους *Leuconostoc*, καθώς και κάποιοι γαλακτοβάκκιλοι. Καταβολίζει σάκχαρα τα οποία έχουν πέντε άτομα άνθρακα, είναι δηλαδή πεντόζες. Σε περίπτωση που το σάκχαρο που πρόκειται να καταναλωθεί για παραγωγή ενέργειας αποτελείται από έξι άτομα άνθρακα, τότε μπορεί να πραγματοποιηθεί αποκαρβοξυλίωση των εξοζών προς σχηματισμό πεντοζών. Η πεντόζη μετατρέπεται σε 5-φωσφορική ξυλουλόζη με ενδιάμεσο την 5-φωσφορική ριβουλόζη. Η 5-φωσφορική ξυλουλόζη διασπάται στην 3-φωσφογλυκεραλδεΐδη και με ένα μόριο με δύο άνθρακες. Το μόριο με τους δύο άνθρακες μπορεί να μετατραπεί σε ακεταλδεΐδη, οξικό οξύ ή αιθανόλη. Μπορεί το συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι να προσδίδει ένα μόνο μόριο ATP, είναι όμως πολύ μεγάλης σημασίας διότι προσφέρει στα βακτήρια των ετερογαλακτικών

ζυμώσεων ένα προβάδιμα όσον αφορά την ανταγωνιστικότητα, το οποίο σχετίζεται με την ικανότητα τους να αξιοποιούν τις πεντόζες, οι οποίες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τους ομογαλακτικούς μικροοργανισμούς. Επομένως στα υπόστρωμα το οποίο δεν περιλαμβάνει πολλές εξοχές, αλλά κυρίως πεντόζες, οι ετεροζυμωτική μικροοργανισμοί είναι ευνοημένοι (Montville & Matthews, 2010).

3.7 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΥΡΙΩΝ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Κατά την παραγωγή των τυριών είναι απαραίτητη η χρήση οξυγαλακτικών βακτηρίων για την διαδικασία πρωτίστως της ζύμωσης, και έπειτα της ωρίμανσης του. Οι καλλιέργειες που προστίθενται στα τυριά προκυμμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της ζύμωσης ονομάζονται καλλιέργειες εκκίνησης. Η διαδικασία είναι η εξής, αρχικά το νωπό γάλα τυποποιείτε και υφίσταται παστερίωση. Αφού το γάλα παστεριωθεί, τότε έρχεται το σημείο στο οποίο προσθέτουμε τις καλλιέργειες εκκίνησης (starters). Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την παρασκευή των τυριών μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι μικροοργανισμοί εκτός από τα οξυγαλακτικά, τα οποία προσδίδουν συγκεκριμένα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στα τυριά, π.χ. τα προπιονικά βακτήρια (*Propionibacterium shermanii*) τα οποία σχηματίζουν την ανοιχτή δομή σε τυριά όπως το Emmental, ορισμένοι μύκητες οι οποίοι προσδίδουν στα τυριά συγκεκριμένη υφή και δομή μέσω των ενζύμων, όπως είναι τα *Penicillium roqueforti* και *Penicillium Camemberti* για τα τυριά ροκφόρ και Camembert, ενώ υπάρχουν και βακτήρια όπως το *Brevibacterium linens* το οποίο δημιουργεί ένα χαρακτηριστικό επίχρισμα στην επιφάνεια των τυριών, το οποίο επιδρά θετικά στην οργανοληπτική τους αξιολόγηση, π.χ. Limburger Brick (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017). Αφού λοιπόν το γάλα έχει παστεριωθεί, προστίθενται οι καλλιέργειες εκκίνησης όταν το γάλα έχει ήδη ψυχθεί και έχει φτάσει στην θερμοκρασία της πήξης, και πριν την προσθήκη της πυτιάς. Σημαντικό ρόλο για την σταθερότητα του προϊόντος, την παραγωγή των επιθυμητών αρωμάτων και γεύσεων, αλλά και τον αξιόπιστο έλεγχο του προϊόντος έχει η ποσότητα των καλλιεργειών που θα προστεθεί. Οι ποσότητες κυμαίνονται περίπου στο 0,5-3% ανάλογα το είδος της καλλιέργειας, αλλά και του τελικού προϊόντος. Οι καλλιέργειες, λοιπόν, είναι υπεύθυνες για την διαδικασία της ζύμωσης της λακτόζης προς γαλακτικό οξύ, όπως έχει ήδη αναφερθεί, και εν συνεχεία

οι μικροοργανισμοί που έχουν αναπτυχθεί απελευθερώνουν ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για την διαμόρφωση των χαρακτηριστικών οσμών και γεύσεων που απαρτίζει το κάθε τυρί. Ένα πολύ βοηθητικό στοιχείο που προσδίδει η παραγωγή του γαλακτικού οξέος, είναι ότι εμποδίζει την ανάπτυξη ανεπιθύμητων και παθογόνων μικροοργανισμών, π.χ. ανταγωνιστική δράση με την *L.monocytogenes*. Ακόμη συμβάλει στην χαρακτηριστική όξινη γεύση που έχει το τυρόπηγμα, βοηθά τον σχηματισμό του, επιταχύνει την δράση της πυτιάς, βοηθά στο φαινόμενο της συναίρεσης του τυροπήγματος, στην αποβολή ορού και επηρεάζει και την υφή του τυριού. Συνεπώς κατανοούμε ότι η παρακολούθηση της παραγωγής του γαλακτικού οξέος συμβάλει αρκετά στην επίτευξη της ποιοτικής ομοιομορφίας του τυριού (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

3.8 ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΥΝΗΘΩΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΥΡΙΩΝ

Δεν υπάρχει ένας μοναδικός συνδυασμός βακτηρίων που να αποτελούν την απόλυτη καλλιέργεια η οποία θα βρίσκει εφαρμογή σε κάθε είδος τυριού. Παρόλο αυτό η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη καλλιέργεια, είναι ένα μίγμα από μεσόφιλους οξυγαλακτικούς μικροοργανισμούς που αποτελείται από τον *Lactococcus lactis subsp. cremoris* και *Lactococcus lactis subsp. lactis*. Μπορεί να πρωταγωνιστούν στην αρχή την ζύμωσης οι εκκινητές, αλλά με την πάροδο της ωρίμανσης αναπτύσσονται και άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία μπορεί και κάποιες φορές να υπερτερήσουν των εκκινητών, είναι και αυτά μεσόφιλα, και παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση των χαρακτηριστικών που έχει ένα τυρί. Σε τυριά τα οποία διατηρούνται σε άλμη έχουν βρεθεί σε υψηλά ποσοστά τα είδη *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis subsp. lactis* καθώς και κάποια είδη του γένους *Enterococcus* (*E.durans*, *E.faecalis*) (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

Πίνακας 5: Βασικά χαρακτηριστικά των πιο σημαντικών οξυγαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

Είδη μικροοργανισμών		Αναγωγή του Litmus γάλακτος πριν το πήξιμο	Παραγωγή γαλακτικού οξέος στο γάλα (%)	Μορφή ισομερούς γαλακτικού οξέος
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Κόκκος	-	0,6	L
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Ράβδος	-	2,0	DL
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i>	Ράβδος	-	1,8	D
<i>Lactobacillus lactis subsp. Lactis</i>	Ράβδος	-	1,8	D
<i>Lactobacillus lactis subsp. Cremoris</i>	Κόκκος	+	0,8	L
<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	Κόκκος	+	0,8	L
<i>Leuconostoc lactis</i>	Κόκκος	-	<0,5	D
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris</i>	Κόκκος	-	0,2	D

Είδη μικροοργανισμ ών	Μεταβολισμό ς κιτρικών	Παραγωγή αμμωνίας αργινίνη	Ανάπτυξη στους			Ζύμωση		
			από 10°C	40°C	45°C	γλυκόζ η	Γαλακτ όζη	λακτόζ η
<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Lactobacillus helveticus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i>	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Lactobacillus lactis subsp. Lactis</i>	-	-/+	-	+	+	+	+/-	+

<i>Lactobacillus</i>									
<i>lactis</i>	<i>subsp.</i>	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>Cremonis</i>									
<i>Lactococcus</i>									
<i>lactis</i>	<i>subsp.</i>	+/-	+	+	+	-	+	+	+
<i>Lactis</i>									
<i>Leuconostoc</i>									
<i>lactis</i>		+	-	+	-	-	+	+	+
<i>Leuconostoc</i>									
<i>mesenteroides</i>		+	-	+	-	-	+	+	+
<i>subsp. cremoris</i>									

Ανάλογα με το είδος του τυριού που θέλουμε να παρασκευάσουμε, καθορίζεται και η διαδικασία παρασκευής, στάδια και μέθοδοι θέρμανσης, προσθήκη διάφορων ουσιών, π.χ. NaCl, κ.α. Έτσι λοιπόν παίζουν ρόλο και τα βακτήρια τα οποία θα επιλέξουμε να χρησιμοποιήσουμε ως εκκινητές. Για παράδειγμα, αν θέλουμε να παρασκευάσουμε ένα τυρί στο οποίο χρειαζόμαστε άμεση πτώση του pH, τότε θα χρειαστούμε μικροοργανισμούς με δυνατότητα μεγάλης παραγωγής γαλακτικού οξέος. Επομένως είναι ωφέλιμη η παρατήρηση και ο σχολιασμός των χαρακτηριστικών που έχει το κάθε ξεχωριστό είδος, και υποείδος του κάθε γένους. Οι παράγοντες δηλαδή που ευνοούν το την ανάπτυξη τους, τα προϊόντα που παράγονται ανάλογα το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται, όπως ο μικροοργανισμός *Streptococcus thermophiles* ο οποίος λόγω του θερμόφιλου χαρακτήρα του χρησιμοποιείται σε τυριά στα οποία πραγματοποιούμε αναθέρμανση, ή και κάποια είδη των *Streptococcus* και *Leuconostoc* τα οποία έχουν την δυνατότητα παραγωγής αρωματικών ουσιών (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία βοηθούν στην επιλογή της κατάλληλης καλλιέργειας (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

Ιδιότητες	Είδη μικροοργανισμών
-----------	----------------------

Ποικιλία στελεχών τους οποίους αποφεύγουμε εκεί που παράγουν νισίνη	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Streptococcus diacetylactis</i>
Χρήση στα τυριά στα οποία γίνεται αναθέρμανση	<i>Streptococcus thermophiles</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i>
Αναπτύσσεται σε υψηλότερη θερμοκρασία από αρκετούς μεσόφιλους	<i>Streptococcus durans</i>
Χρησιμοποιείται στην παραγωγή αρώματος και αναπτύσσεται σε υψηλότερη θερμοκρασία από αρκετούς μεσόφιλους	<i>Streptococcus faecalis</i>
Χρησιμοποιείται στην παραγωγή αρώματος	<i>Streptococcus citrovorus</i> , <i>Streptococcus paracitrovorus</i> , <i>Leuconostoc citrovorum</i> , <i>Leuconostoc dextranicum</i>
Χρησιμοποιείται στην παραγωγή αερίων και αρώματος σε διάφορα τυριά (Emmental)	<i>Propionibacterium shermanii</i>

Συνδυασμοί καλλιιεργειών

Η πιο αποτελεσματική επιλογή έτσι ώστε να έχουμε πληθώρα χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων, που θα προσδώσει στο τυρί ιδιαιτερότητες οι οποίες θα ανεβάσουν την οργανοληπτική του αξία, είναι να χρησιμοποιήσουμε συνδυασμούς καλλιιεργειών. Αν πάρουμε ως παράδειγμα την διαδικασία παρασκευής της φέτας θα δούμε ότι χρειάζεται ένας συνδυασμός από μεσόφιλες καλλιέργειες, οι οποίες μπορούν και συνεχίζουν την βιοχημική τους δραστηριότητα σε χαμηλές σχετικά θερμοκρασίες, μαζί με θερμόφιλες καλλιέργειες, οι οποίες παρουσιάζουν εντονότερη πρωτεολυτική δραστηριότητα, π.χ. *L.delbrueckii subsp. bulgaricus* (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

Ένα μίγμα καλλιέργειας που χρησιμοποιείται συχνά είναι η μίξη καθαρών στελεχών μικροοργανισμών, αναμιγνύοντας όμως ένα μόνο στέλεχος από το κάθε είδος, όπως *Streptococcus lactis*, *S.cremoris*, *S.diacetilactis*, *S.citronovor*, *S.paracitronovor*. Η ίδια μίξη μπορεί να γίνει και με την παραλλαγή, του να περιλαμβάνονται περισσότερα από ένα στελέχη από το κάθε είδος μικροοργανισμού. Ακόμη ένας καλός συνδυασμός είναι η χρήση ενός μόνο είδους, με παράλληλη ανάμιξη δύο ή τριών διαφορετικών στελεχών του συγκεκριμένου είδους. Αρκετά χρησιμοποιούνται επίσης και μίγματα από διάφορα στελέχη μικροοργανισμών, και το κάθε στέλεχος να προέρχεται από διαφορετικό είδος, όπως για παράδειγμα, στελέχη του *S.lactis* και στελέχη του *S.cremoris*, στελέχη του *S.lactis* μαζί με στελέχη του *S.cremoris* και στελέχη του *Leuconostoc citronorum*, είτε ακόμη και στελέχη του *S.lactis* με στελέχη *S.cremoris* και στελέχη του *Lactobacillus spp*. Τέλος, μια ακόμη μίξη μικροοργανισμών που χρησιμοποιείται είναι η ανάμιξη διάφορων οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία μπορούν να παράγουν αέρια και να δημιουργούν χαρακτηριστικά ανοίγματα στα τυριά, όπως το Emmental, τέτοιες είναι η προσθήκη στελεχών του *S.lactis* μαζί με στελέχη των *S.thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. helveticus* και *Propionibacterium shermanii* (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

3.9 ΤΡΟΦΙΜΑ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΕΙΝΑΙ Η ΚΥΡΙΑΡΧΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ

Όπως είδαμε και προηγουμένως, τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μια αρκετά μεγάλη κατηγορία βακτηρίων η οποία περιλαμβάνει πολλές οικογένειες βακτηρίων. Συνεπώς δεν απαντώνται μόνο σε μία κατηγορία τροφίμων. Ως μικροοργανισμοί μπορεί να προϋπάρχουν σαν τυχαία μικροχλωρίδα σε ένα τρόφιμο, να προστεθούν ως καλλιέργεια εκκίνησης ή κάποια είδη μπορεί και να λειτουργήσουν ως πρόσθετο για τα οφέλη που προσδίδουν στον ανθρώπινο οργανισμό (προβιοτικά). Από το γένος των *Streptococcus* ο *S.thermophilus* είναι σημαντικό μη παθογόνο βακτήριο που υπάρχει στη γιαούρτη και σε πολλά τυριά. Από τα γένη των οξυγαλακτικών το μεγαλύτερο κίνδυνο φέρει η οικογένεια των *Enterococcus* διότι έχει συσχετισθεί με αρκετές ανθρώπινες ασθένειες, αποτελεί τη φυσιολογική μικροχλωρίδα των θηλαστικών και ενδεχομένως κυριαρχούν και στην μικροχλωρίδα των τροφίμων. Τα

υπόλοιπα γένη θεωρούνται, κατά βάση μη παθογόνα. Σε μια Ευρωπαϊκή εργαστηριακή μελέτη που διεξήχθη για την ασφάλεια των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, διεξήχθη το συμπέρασμα ότι ο κίνδυνος μόλυνσης του ανθρώπινου οργανισμού από τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι πολύ χαμηλός, ειδικά υπό το πρίσμα της τόσο πυκνής παρουσίας τους στο περιβάλλον. Με την ζύμωση του γάλακτος σχετίζονται κυρίως τα υποείδη του *Lactococcus lactis*. Οι *Lactobacillus* και οι *Leuconostoc* έχουν επίσης μεγάλη συσχέτιση με τα ζυμώμενα γαλακτοκομικά προϊόντα. Στα σκληρά τυριά, οι *Lactococcus* χρησιμοποιούνται επιπρόσθετα, αλλά οι *Lactobacillus* όπως οι *L.casei* παίζουν σημαντικό ρόλο στην διεργασία της ωρίμανσης. Στα τυριά ελβετικού τύπου, οι *Lactobacillus* όπως οι *L.helveticus* και *L.delbrueckii subsp bulgaricus* προστίθενται ως μέρος της καλλιέργειας εκκίνησης. Οι *Lactobacillus* είναι σημαντικό μέρος της εντερικής χλωρίδας και πολλά είδη όπως οι *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.reuteri* χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά για τις ευεργετικές τους ιδιότητες. Οι *Leuconostoc mesenteroides subsp cremoris* και *Leuconostoc lactis* είναι σημαντικοί για την παραγωγή διακετυλίου από το κιτρικό άλας σε ζυμώμενα γαλακτοκομικά προϊόντα, αν και η χρήση τους έχει αντικατασταθεί από στελέχη του *Lactococcus lactis*, έκτος και αν η ζύμωση απαιτεί παράλληλη παραγωγή CO₂ όπως στην επεξεργασία του τυριού Gouda. Οι *Leuconostoc* δεν βρίσκουν εφαρμογή μόνο στα γαλακτοκομικά, αλλά και σε άλλα είδη ζυμώσεων όπως στα ζυμώμενα λαχανικά, στα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στο στάδιο της αρχικής ζύμωσης. Το *Leuconostoc oenos* είναι υπεύθυνο για την ζύμωση του μήλου στους μηλίτες, στην οποία μπορεί να επιφέρει δυσμενείς ή ευμενείς επιπτώσεις ανάλογα, για παράδειγμα ο *Leuconostoc spp.* μπορεί να προκαλέσει σημαντική αλλοίωση στα τρόφιμα. Τα *Leuconostoc carnosum* και *gelidum* έχουν ταυτοποιηθεί στην μικροχλωρίδα οξυγαλακτικών βακτηρίων του συσκευασμένου κρέατος. Οι μικροχλωρίδα των κρεάτων εξαρτάται άμεσα από την επεξεργασία και τις συνθήκες συντήρησής τους. Τα νωπά αλλαντικά τα οποία αποθηκεύονται στο ψυγείο σε συσκευασία υπό κενό ή σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, έχουν αυξημένα επίπεδα CO₂, η κυρίαρχη μικροχλωρίδα τους είναι τα ψυχρότροφα οξυγαλακτικά βακτήρια. Τα ίδια είδη επίσης κυριαρχούν γενικά σε κρέατα τα οποία αποθηκεύονται σε ψύξη σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, όπως είναι οι φέτες ψητού βοδινού. Τέτοια είδη βακτηρίων είναι τα *Carnobacterium spp.*, *Lactobacillus sake*, *Leuconostoc*

mesenteroides subsp mesenteroides, *Leuconostoc gelidum* και *Leuconostoc carnosum*. Η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών σε όλα τα είδη που έχουν αναφερθεί πρέπει να είναι συγκεκριμένη, διαφορετικά μπορεί να προκληθεί αλλοίωση του προϊόντος με δυσμενείς οργανοληπτικές συνθήκες. Σε κρέατα τα οποία δεν αποθηκεύονται σε περιβάλλον τροποποιημένης ατμόσφαιρας ένα πολύ σημαντικό στέλεχος ζύμωσης είναι ο *P.acidilactici*, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως, ενδεχομένως και λόγω της ισχυρής βακτηριοσίνης που παράγει. Τα οξυγαλακτικά μπορούν επίσης να εμφανισθούν και στα θαλασσινά, ιδίως σε έντερα ψαριών και σε καπνιστά μαριναρισμένα ψάρια, εκεί έχουμε παρουσία στελεχών από *Camobacteria*, *Lactococcus* και *Enterococcus*. Μια ακόμη κατηγορία είναι τα ζυμώμενα λαχανικά. Η τοποθέτηση λάχανου, αγγουριού και ελιών σε άλμη ευνοείται υπό ταυτόχρονη παρουσία οξυγαλακτικών. Ο *P.pentosaceus* είναι σημαντικό στέλεχος για τις ζυμώσεις των λαχανικών. Τελευταία σημαντική κατηγορία τροφίμου που χρησιμοποιεί τα οξυγαλακτικά για τις διεργασίες της ζύμωσης είναι η ζύμωση δημητριακών, όπως τα αφρικανικά προϊόντα αραβόσιτου, το κεχρί και το σόργο. Σε ένα προϊόν ζύμωσης στην Γκάνα υπάρχουν τρία περιβάλλοντα στα οποία αναπτύσσονται τα οξυγαλακτικά, κατά την άλεση του αφυδατωμένου σιταριού, και για δύο ημέρες κατά το στάδιο της ζύμωσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των σιτηρών δεν υφίστανται εισαγωγές με καλλιέργειες εκκινητών (Stiles, 1996).

3.10 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Είναι γνωστό ότι το κύριο προϊόν των γαλακτικών ζυμώσεων είναι το γαλακτικό οξύ. Προσδίδει στο ζυμώμενο προϊόν χαρακτηριστική όξινη γεύση, αλλά δεν συμβάλει στο άρωμα. Τα οξέα τα οποία είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό χαρακτηριστικών αρωμάτων είναι το οξικό οξύ, η ακεταλδεΐδη και το διακετύλιο. Στα συγκεκριμένα οξέα στην παρασκευή της γιαούρτης παράγονται από τους *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*. Άλλα είδη, όπως είναι του *Leuconostoc* και του *Lactococcus lactis subsp.lactis* τα οποία παράγουν κιτρικό, προστίθενται για την παραγωγή αρωματικών ενώσεων στο βουτυρόγαλα και σε κάποια τυριά. Ακόμη το CO₂ προκαλεί τρύπες στα τυριά Gouda και Edam παράγεται από τα ίδια είδη μικροοργανισμών. Η παραγωγή οργανικών ενώσεων όμως είναι

επιθυμητή σε ένα καθορισμένο πλαίσιο, διότι σε μεγάλες ποσότητες μπορεί να φέρει ανεπιθύμητα αποτελέσματα, όπως όταν η αναλογία διακετυλίου προς ακεταλδεύδη είναι αρκετά υψηλή, έχουμε μια άσχημη γεύση γιαουρτιού ή και πράσινου μήλου, στα ζυμώμενα γάλατα. Η επιπτώσεις αυτές προέρχονται από υπερβολική και μη ελεγχόμενη ζύμωση, και σηματοδοτεί μεγάλη περιεκτικότητα σε οξέα. Το συγκεκριμένο γεγονός μπορεί να προληφθεί με ταχεία ψύξη και αποθήκευση στο ψυγείο. Ένας ακόμη παράγοντας ο οποίος αυξάνει την γεύση στα ώριμα τυριά είναι η πρωτεόλυση. Τα πεπτίδια και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που περιλαμβάνονται στο τυρί δεν έχουν μόνο θετικές αλλά και αρνητικές επιδράσεις. Μια από τις αρνητικές επιδράσεις είναι η επίγευση της πικρίλας που μπορεί να δημιουργήσει η πρωτεόλυση της καζεΐνης σε υδρόφοβα πεπτίδια. Δεν είναι όμως η πρωτεόλυση της καζεΐνης νομοτελειακό γεγονός μιας έντονα πικρής γεύσης, καθώς τα πεπτίδια μπορούν να υδρολυθούν περαιτέρω σε αμινοξέα τα οποία δεν είναι πικρά (Montville & Matthews, 2010).

3.11 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΣΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Παρά την έντονη δραστηριότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων υπάρχουν διάφοροι ανασταλτικοί παράγοντες οι οποίοι λειτουργούν ως εμπόδιο για την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους. Πέρα από τις γνωστές αιτίες που είναι μέρος της επεξεργασίας και μπορεί να δράσουν καταστρεπτικά στα βακτήρια, όπως π.χ. η υψηλή θερμοκρασία αναθέρμανσης, η ποσότητα του προστιθέμενου αλατιού, το υψηλό ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων οι πιο συνηθισμένοι παράγοντες που μπορούν να αδρανοποιούν τις καλλιέργειες είναι τα αντιβιοτικά, οι βακτηριοφάγοι, φυσικοί ανασταλτικοί παράγοντες του γάλακτος, καθώς και άλλες ουσίες με αντιμικροβιακή δράση, όπως τα απολυμαντικά (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

Φυσικοί ανασταλτικοί παράγοντες του γάλακτος - Αντιβιοτικά

Στο κομμάτι των αντιβιοτικών-αντιμικροβιακών ουσιών έχουμε τις φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες του γάλακτος, αλλά και την προσθήκη αντιβιοτικών από προηγούμενη χορήγηση τους στα ζώα. Ως αντιμικροβιακές ουσίες του γάλακτος μπορούμε να θεωρήσουμε τις ανοσογλοβουλίνες, τα λευκοκύτταρα, την

γαλακτοφερίνη και την τρανσφερίνη, καθώς και το σύστημα της γαλακτοϋπεροξειδάσης. Αυτοί όμως οι φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες παρόλο που αναστέλλουν την λειτουργία των οξυγαλακτικών, δεν δημιουργούν ιδιαίτερο πρόβλημα, διότι θανατώνονται με την θερμική επεξεργασία του γάλακτος. Αυτό βέβαια μπορεί να αλλάξει αν το γάλα χρησιμοποιηθεί απευθείας μετά την άλμεξη όπου η δραστηριότητα των αντιμικροβιακών ουσιών είναι μεγαλύτερη. Αντιθέτως στα αντιβιοτικά που παρέχονται στα ζώα είναι ανθεκτικά στην θερμική επεξεργασία, παραμένουν στο γάλα και δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, για αυτό γάλα στο οποίο έχουν ανιχνευθεί αντιβιοτικά είναι ακατάλληλο για χρήση (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

Απολυμαντικά

Ένας σημαντικός παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η έκθεση τους σε υπολείμματα απορρυπαντικών και απολυμαντικών. Οι ενώσεις του χλωρίου και του ιωδίου που περιλαμβάνονται στα απολυμαντικά μπορούν να δεσμεύονται από τις πρωτεΐνες και να μην έχουν άμεση επίπτωση στις καλλιέργειες. Αυτό που δημιουργεί το πρόβλημα στα κύτταρα των οξυγαλακτικών είναι οι τεταρτογενείς ενώσεις του αμμωνίου, οι οποίες δημιουργούν θέματα αντίστοιχα με αυτά των αντιβιοτικών. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή τυριών είναι πιο ευαίσθητες στα απολυμαντικά, από αυτές που χρησιμοποιούνται σε άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

Βακτηριοφάγοι

Οι βακτηριοφάγοι είναι μία κατηγορία ιών η οποία προσβάλλει και καταστρέφει τις δομές των βακτηρίων. Με την προσβολή των βακτηρίων από τους βακτηριοφάγους έχουμε διακοπή του μεταβολισμού της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ, από τις οξυγαλακτικές καλλιέργειες. Παρ'όλα αυτά, δεν έχουν όλες οι καλλιέργειες την ίδια ευαισθησία στους βακτηριοφάγους καθώς κάποιες από αυτές είναι ικανές να ανθίστανται και να τους καταπολεμούν. Όσον αφορά την ευαισθησία τους οι καλλιέργειες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες, τις ευαίσθητες, των οποίων τα βακτηριακά κύτταρα καταστρέφονται με λύση, τις ανθεκτικές, οι οποίες

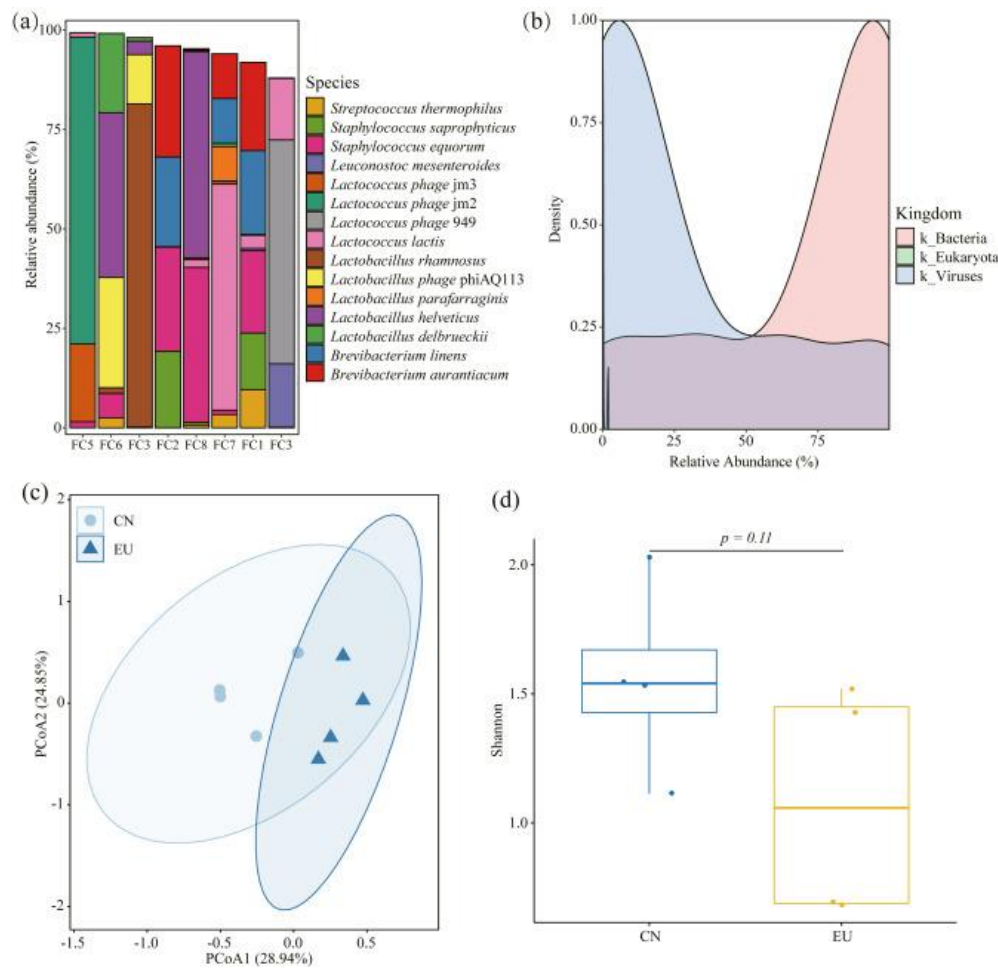
δεν προσβάλλονται, και τους μεταφορείς των βακτηριοφάγων, οι οποίοι αν και προσβάλλονται παρουσιάζουν μόνο μια μικρή μείωση στην παραγωγή του γαλακτικού οξέος, και απλά πολλαπλασιάζονται μεταφέροντας στους απογόνους τους βακτηριοφάγους. Οι δύο πιο ευαίσθητες κατηγορίες μικροοργανισμών είναι οι *Streptococci* και οι *Lactobacilli*. Η επιμόλυνση με βακτηριοφάγους μπορεί να γίνει καλλιέργεια η οποία έχει ήδη προσβληθεί και προστίθεται στο προς ζύμωση προϊόν (μεταφορείς βακτηριοφάγων), είτε από μη σωστή υγιεινή και απολύμανση των εγκαταστάσεων (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

Οι ιοί ως μικροοργανισμοί έχουν εξειδικευμένους τρόπους εισβολής, για να προσβάλλουν τον ξενιστή τους, είναι δηλαδή εξειδικευμένοι ως προς τον ξενιστή τους και αναπαράγονται μόνο σε αυτόν, αφού γίνει η εισβολή ο ιός έχει την ικανότητα να ελέγξει το μεταβολικό μηχανισμό του ξενιστή του, και να του δημιουργήσει ανεπανόρθωτη βλάβη. Οι ιοί οι οποίοι επιτίθενται στοχευμένα στα βακτήρια, ονομάζονται βακτηριοφάγοι ή απλώς φάγοι. Ο γενικός μηχανισμός των βακτηριοφάγων είναι να μολύνουν βακτήρια, να προκαλούν κυτταρική διάρρηξη επιφέροντας έτσι τον θάνατο των βακτηρίων, και επομένως να σταματούν την διαδικασία της ζύμωσης. Δεν έχουν όλοι η βακτηριοφάγοι την ίδια επιθετικότητα, μπορεί να είναι λυτικοί ή ήπιοι. Ο μηχανισμός προσβολής των λυτικών βακτηριοφάγων είναι να προσκολλούν στην επιφάνεια ενός ευαίσθητου κυττάρου να εναποθέτουν το δικό τους RNA, έτσι ώστε ο κυτταρικός μηχανισμός να ξεκινήσει την διαδικασία αντιγραφής με βάση το δικό τους γενετικό υλικό, καταλήγοντας να σχηματιστεί ένα ιϊκό DNA, το οποίο θα κωδικοποιήσει τις πρωτεΐνες που χρειάζεται ο ιός για να συνθέσει ολόκληρη την δομή του και έπειτα προκαλούν λύση του ξενιστή και απελευθερώνονται μολύνοντας περισσότερα βακτήρια. Οι ήπιοι βακτηριοφάγοι δεν είναι τόσο δραστικοί, και θα μπορούσαμε να πούμε ότι δρουν λίγο πιο έμμεσα στην καταστροφή των βακτηρίων. Αρχικά προσκολλάνε πάνω σε ένα ευαίσθητο κύτταρο και εναποθέτουν το γενετικό τους υλικό. Το ιϊκό DNA εδώ γίνεται μέρος του βακτηριακού χρωμοσώματος, και μαζί με το βακτηριακό DNA αρχίζει να μεταφέρεται σε όλους του απογόνους του ξενιστή. Τελικά, καταφέρνουν να μπουν σε έναν λυτικό κύκλο, από τον οποίο λαμβάνουν τον έλεγχο του κυτταρικού μηχανισμού του ξενιστή, έτσι ώστε να μπορούν να αντιγράψουν το ιϊκό DNA, να παράξουν τις πρωτεΐνες που

χρειάζονται για την ολοκλήρωση της δομής τους και εν τέλει να καταστρέψουν τα κύτταρα του ξενιστή προκαλώντας την λύση του. Και στις δύο περιπτώσεις η ζύμωση διακόπτεται (Montville & Matthews, 2010).

3.12 ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΥ ΤΟΥ ΤΥΡΙΟΥ

Οι (Yang, και συν., 2021) έκαναν πείραμα στο οποίο αναλύθηκε η σύνθεση και η ποικιλομορφία του μικροβιώματος στα τυριά. Στην μελέτη αυτήν ανέλυσαν οκτώ δείγματα τυριών, εκ των οποίων τα τέσσερα ήταν κινέζικα και τα άλλα τέσσερα ευρωπαϊκά. Μέσω ειδικών προγραμμάτων ανέλυσαν και απεικόνισαν το προφίλ του μικροβιώματος του τυριού. Ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες οι οποίες αντιπροσώπευαν συνολικά 183 είδη μικροοργανισμών, τα οποία ανήκαν σε οκτώ φύλα και 36 οικογένειες. Τα κυρίαρχα είδη ήταν 15 εκ των οποίων 11 ήταν βακτήρια και 4 ήταν βακτηριοφάγοι. Στα βακτήρια εντοπίστηκαν τα *S.thermophilus*, *S.saprophyticus*, *S.equorum*, *L.mesenteroides*, *L.lactis*, *L.rhamnosus*, *L.parafarraginis*, *L.helveticus*, *L.delbrueckii*, *B.linens* και *B.aurantiacum*, και στους βακτηριοφάγους εντοπίστηκαν οι *Lactococcus phage jm3*, *Lactococcus phage jm2*, *Lactococcus phage 949* και *Lactococcus phage phiAQ113*. Συνολικά η σχετική αφθονία μεταξύ βακτηρίων, βακτηριοφάγων και ευκαρυωτών ήταν στο 73.66%, 26,06% και 0,28% αντίστοιχα. Στα περισσότερα δείγματα τυριών επικρατούσαν τα βακτήρια και όχι οι βακτηριοφάγοι, ενώ τα 9 από τα 11 κυρίαρχα είδη βακτηρίων ήταν οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB). Παρόλο που τα κυρίαρχα είδη των βακτηριοφάγων ήταν μόνο 4 αποτελούσαν ένα ικανοποιητικό ποσοστό της συνολικής αλληλουχίας, εφόσον 5 από τα 8 δείγματα βρέθηκαν να περιέχουν βακτηριοφάγους, ποσοστό δηλαδή 62,5% (Yang, και συν., 2021).

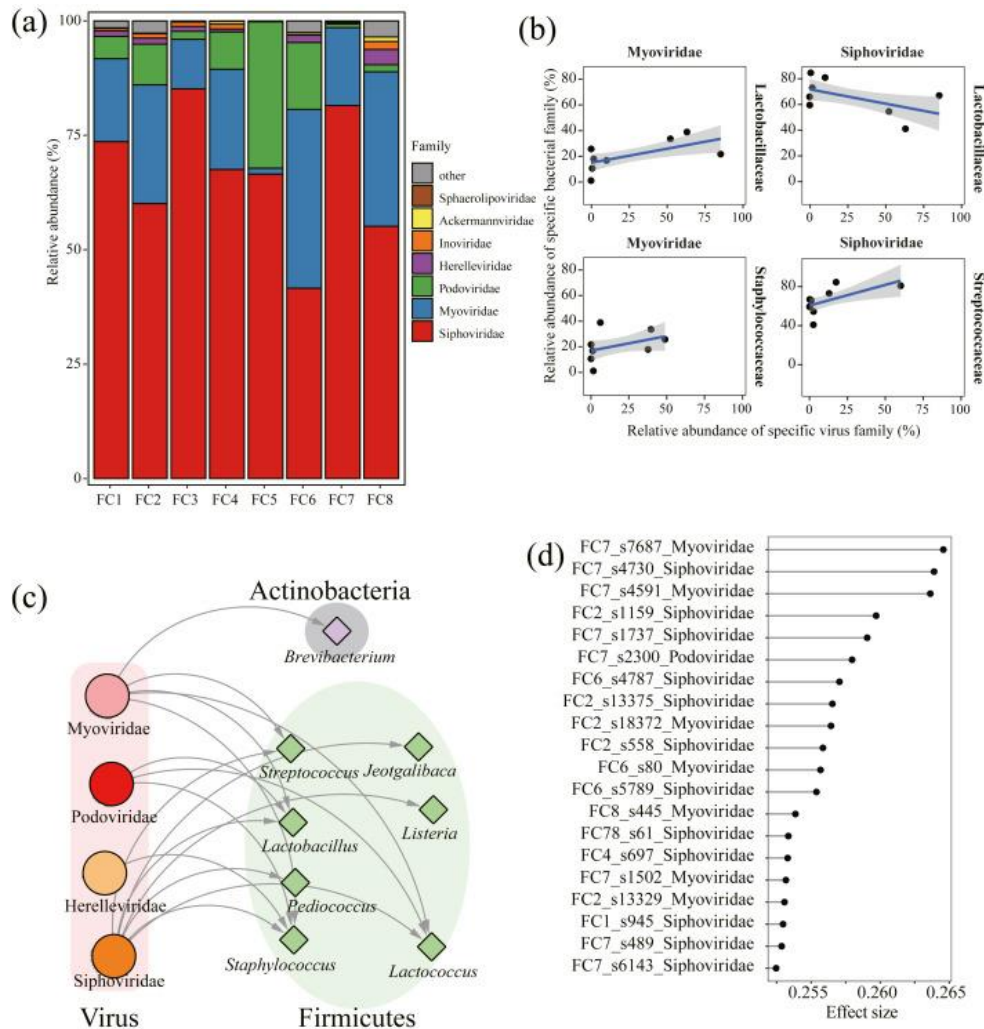


Εικόνα 6: Η σύνθεση του μικροβιώματος των τυριών και η ποικιλομορφία του. (α) Αναπαράσταση της αφθονίας των κυρίαρχων ειδών (>0,1%) ως προς τις συνολικές αλληλουχίες, (β) διάγραμμα συχνότητας κατανομής των βακτηρίων, βακτηριοφάγων και μυκήτων στα δείγματα, (γ) Ανάλυση κύριων συντεταγμένων που υπολογίζεται με βάση την απόσταση Bray-Curtis, (δ) Βοχplots που δείχνουν τις τιμές του δείκτη Shannon μεταξύ δύο δειγμάτων. CN: κινέζικα τυριά, EU: ευρωπαϊκά τυριά. (Πηγή: (Yang, και συν., 2021))

3.13 ΕΠΙΚΡΑΤΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΤΟΥ ΤΥΡΙΟΥ

Όπως προαναφέρθηκε στο πείραμα των (Yang, και συν., 2021) μπορεί τα είδη των βακτηριοφάγων που εντοπίζονται στα συγκεκριμένα είδη τυριών να είναι μόλις τέσσερα, αλλά το ποσοστό στο οποίο ανιχνεύθηκαν ήταν υψηλό. Λόγω της έντονης καταστροφικής δράσης που έχουν οι βακτηριοφάγοι στις δομές των βακτηρίων, και κατ' επέκτασιν στις διαδικασίες της ζύμωσης, οι ερευνητές ανέλυσαν την αλληλουχία και την ποικιλομορφία των βακτηριοφάγων στα δείγματα. Η ταξινόμηση που έγινε έδειξε ότι οι αλληλουχίες των βακτηριοφάγων των τυριών ανήκαν κυρίως σε έξι

οικογένειες, τις *Siphoviridae* σε ποσοστό 66,39%, *Myoviridae* σε ποσοστό 21,00%, *Podoviridae* σε ποσοστό 9,08%, *Herelleviridae* σε ποσοστό 1,19%, *Inoviridae* σε ποσοστό 0,71% και *Ackermannviridae* σε ποσοστό 0,31%. Σε ένα γενικότερο πλαίσιο φάνηκε πως τα κινέζικα τυριά είχαν μεγαλύτερο ποσοστό βακτηριοφάγων αλλά μικρότερο εύρος ποικιλομορφίας σε σύγκριση με τα ευρωπαϊκά τυριά (Yang, και συν., 2021).



Εικόνα 7: Απεικόνιση των αλληλουχιών των βακτηριοφάγων στο μικροβίωμα του τυριού. (α) Σύνθεση των κυριότερων οικογενειών των βακτηριοφάγων στα τυριά, (β) Συσχέτιση μεταξύ τεσσάρων οικογενειών βακτηρίων και δύο οικογενειών βακτηριοφάγων που βρέθηκαν στο μικροβίωμα του τυριού. (γ) Πιθανή μόλυνση από φάγο των βακτηρίων που σχετίζεται με το τυρί, (δ) Επίδραση των οικογενειών των φάγων στο μικροβίωμα του τυριού (Πηγή: (Yang, και συν., 2021)).

3.14 ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΓΙΑ ΑΠΟΦΥΓΗ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΥΣ

Πρώτο κριτήριο είναι η παρασκευή και προετοιμασία των καλλιεργειών κάτω από ασηπτικές συνθήκες, ο χώρος της προετοιμασίας τους πρέπει σίγουρα να βρίσκεται μακριά από χώρο όπου γίνεται η επεξεργασία των τυριών, και ειδικά από τους χώρους επεξεργασίας του τυρογάλακτος, προκειμένου να μην δημιουργούνται επιμολύνσεις. Ακόμη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και εναλλακτική χρήση των καλλιεργειών, εναλλάσσοντας συνεχώς τα στελέχη των βακτηρίων τα οποία δεν θα είναι όλα ευνοϊκά για την δράση των βακτηριοφάγων. Καλό είναι επίσης να αποφεύγεται η χρήση καλλιεργειών οι οποίες είναι ευαίσθητες στους βακτηριοφάγους, ή η χρήση καλλιεργειών που αποτελούνται τουλάχιστον από δύο είδη βακτηρίων. Μπορούμε ακόμη να φροντίσουμε για ανάπτυξη καλλιεργειών οι οποίες είναι ανθεκτικές στους βακτηριοφάγους. Και τέλος η σωστές πρακτικές υγιεινής, όπως τα απαραίτητα μέτρα για την απολύμανση του χώρου, το φιλτράρισμα του αέρα και η τήρηση των κανόνων υγιεινής από το εργατικό δυναμικό της παραγωγής είναι προαπαιτούμενο (Κεχαγιάς & Τσάκαλη, 2017).

3.15 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟ STRESS

Οι καλλιέργειες των οξυγαλακτικών βακτηρίων, δεν βρίσκονται πάντα σε εύκρατες συνθήκες επιβίωσης. Αν αναλογιστούμε ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια μέσω της τροφής έχουν να αντιμετωπίσουν το όξινο περιβάλλον του πεπτικού σωλήνα, την εντερική φυσιολογική χλωρίδα του οργανισμού και όλα αυτά συνδυαστικά με την χλωρίδα που προϋπάρχει, και ενδεχομένως να δρα ανταγωνιστικά, στο εσωτερικό του υποστρώματος του τροφίμου. Οι συγκεκριμένες συγκυρίες είναι εκείνες που επηρεάζουν άμεσα την ικανότητα και την φάση ανάπτυξης των οξυγαλακτικών ανάλογα το περιβάλλον, όπως για παράδειγμα όταν δημιουργούνται αποικίες των βακτηρίων στον πεπτικό σωλήνα, από την δυσκολία στην αντίσταση της εντερικής χλωρίδας, εκφράζουν καταστάσεις όπως είναι η στατική φάση. Η παρατήρηση για το πώς αντιδρούν και ανθίστανται τα οξυγαλακτικά βακτήρια στις δυσμενείς συνθήκες είναι κάτι που αφορά αρκετά την βιομηχανία καθώς επηρεάζει άμεσα την δυναμική της παραγωγής. Το γεγονός της αδρανοποίησης της ζυμωτικής λειτουργίας επιφέρει οικονομικές επιπτώσεις στην βιομηχανία, καθώς δεν βοηθούν στην παραγωγή

σταθερού ποιοτικά προϊόντος, και υποβαθμίζουν αρκετά την οργανοληπτική του αξία. Όλοι η παραπάνω λόγοι έχουν αυξήσει σημαντικά την οικονομική σημασία των LAB, και επομένως την σημασία της παρακολούθησης των αντιδράσεων τους σε δυσμενή περιβάλλοντα (Guchte, και συν., 2002).

Τα οξυγαλακτικά όπως και πολλά άλλα βακτήρια έχει αποδειχτεί ότι έχουν πολλούς μηχανισμούς άμυνας κατά του στρες, και μπορούν να ανθίστανται σε αρκετά δύσκολες και ξαφνικές αλλαγές περιβάλλοντος. Τα γονίδια που εμπλέκονται στις αποκρίσεις των βακτηρίων στο στρες είναι πολυάριθμα, επομένως σημαντικό ρόλο έχει το είδος του βακτηρίου το οποίο εκτίθεται σε στρεσογόνο περιβάλλον, και υπάρχει μεγάλη διαφορά στην απόκριση μεταξύ των ειδών (Guchte, και συν., 2002).

Αντίδραση στο όξινο περιβάλλον

Ο τρόπος ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων αποτελεί από μόνος του ένα μηχανισμό μείωσης του pH του υποστρώματος. Τα όξινα τελικά προϊόντα που παράγονται κατά την διαδικασία της ζύμωσης συσσωρεύονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, το γεγονός αυτό είναι που δημιουργεί προβλήματα ανάπτυξης και στα υπόλοιπα βακτήρια του υποστρώματος, τα οποία ενδεχομένως να είναι και παθογόνα, και έτσι η διαδικασία της ζύμωσης είναι κατά μια έννοια και μία μέθοδος συντήρησης των τροφίμων. Ένα άλλο στάδιο στο οποίο τα βακτήρια έρχονται αντιμέτωπα με όξινες συνθήκες, είναι κατά την παραμονή τους στο στομάχι έπειτα από την κατανάλωση, είναι όμως τα οξυγαλακτικά αρκετά ανθεκτικά στο συγκεκριμένο περιβάλλον και καταφέρνουν να επιβιώνουν μέσα σε αυτό. Ενώ η τεχνολογία που φέρνει την προσθήκη προβιοτικών και την συνύπαρξη τους με τα οξυγαλακτικά στον πεπτικό σωλήνα, είναι κάτι που βοηθά την βιοσυντήρηση των οξυγαλακτικών. Τα περισσότερα οξυγαλακτικά είναι ουδετερόφιλα, έχουν δηλαδή βέλτιστο pH ανάπτυξης από 5 έως 9, εκτός ορισμένων εξαιρέσεων που είναι κάποια είδη των γενών *Lactobacillus*, *Leuconostoc* και *Oenococcus*. Τα οξέα μπορούν να διαχέονται παθητικά μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και έπειτα να εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα, μετά την εισαγωγή τους διαχωρίζονται ταχέως σε πρωτόνια και φορτισμένα παράγωγα τα οποία δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη (PRESSER, RATKOWSKY, & ROSS, 1997). Η ενδοκυτταρική συσσώρευση των πρωτονίων προκαλεί μείωση στο ενδοκυτταρικό pH και συνεπώς επηρεάζει το

διαμεμβρανικό pH, το οποίο με την σειρά του συμβάλει στην κινητήρια δύναμη των πρωτονίων, η οποία παρέχει ενέργεια σε πολλές διαμεμβρανικές διαδικασίες μεταφοράς. Η εσωτερική οξίνιση του κυττάρου μειώνει επίσης και την δραστηριότητα των ενζύμων, προκαλώντας έτσι βλάβες και στις πρωτεΐνες και στο DNA. Ακόμη η αύξηση ανιόντων στο εσωτερικό του κυττάρου έχει και καταστροφικές επιπτώσεις στη φυσιολογία του κυττάρου, το οποίο ενδεχομένως να οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις που προκαλούνται με βασικά στοιχεία του κυττάρου (PRESSER, RATKOWSKY, & ROSS, 1997). Όσον αφορά την προσαρμοστικότητα των βακτηρίων υπάρχουν δύο ξεχωριστές φάσεις στις οποίες η ανοχή στα οξέα αυξάνεται. Η πρώτη είναι κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των βακτηρίων, κατά την οποία πραγματοποιείται απόκριση ενός παράγοντα, του L-ATR, και μπορεί να προκληθεί έπειτα από επώαση σε όξινες αλλά μη θανατηφόρες συνθήκες. Η επαγωγή του L-ART έχει την ικανότητα να προστατεύει τα βακτήρια και από άλλα είδη καταπονήσεων όπως είναι το θερμικό, το οσμωτικό και το οξειδωτικό στρες. Η δεύτερη φάση είναι με την πάροδο των βακτηρίων στην στατική φάση ανάπτυξης, η ανοχή στα οξέα αυξάνεται ως αποτέλεσμα επαγωγής της απόκρισης στο δυσμενές όξινο περιβάλλον. Η επόμενη προσαρμοστική απόκριση είναι συνήθως ανεξάρτητη από το εξωτερικό pH, με εξαίρεση τον *L.acidophilus CRL639* ο οποίος απαιτεί την ύπαρξη χαμηλού εξωτερικού pH, για να πραγματοποιήσει την διαδικασία της τελικής προσαρμογής (Lorca & Valdez, 2000). Δεν είναι απόλυτα βέβαιο αν όλες οι αποκρίσεις που προαναφέρθηκαν είναι ανεξάρτητες ή εξαρτώνται από άλλους παράγοντες. Μια ακόμη δυνατότητα αύξησης της ανοχής στα οξέα μπορεί να προκληθεί και από την ανάπτυξη των βακτηρίων σε βιοϋμένια, αν και δεν είναι σαφώς τεκμηριωμένο. Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί οι οποίες έδειξαν ότι υπάρχει αυξημένη παραγωγή πρωτεϊνών κατά την προσαρμογή των βακτηρίων στα οξέα (Champomier-Vergès, Maguin, Mistou, Anglade, & Chich, 2002). Εν κατακλείδι βιοχημικές, πρωτεομικές και γενετικές αναλύσεις δείχνουν ότι οι αποκρίσεις των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα οξέα είναι αρκετά πολύπλοκες και περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση αρκετών μηχανισμών και πρωτεϊνών (Guchte, και συν., 2002).

Αντοχή στο οξειδωτικό στρες

Όπως αναφέρθηκε και πριν, στο κομμάτι του μεταβολισμού, τα γαλακτικά βακτήρια των τροφίμων είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί οι οποίοι προκειμένου να αναγεννήσουν το NAD⁺ από το NADH που σχηματίζεται κατά το μεταβολισμό της γλυκόλυσης, παράγουν γαλακτικό οξύ σε σημαντική ποσότητα από ένα μεγάλο μέρος του παραγόμενου πυροσταφυλικού. Δεν είναι επομένως απαραίτητη η ύπαρξη οξυγόνου για την ανάπτυξη τους, ενώ κάποιες φορές έχει παρατηρηθεί ότι η ύπαρξη οξυγόνου στο περιβάλλον μπορεί να φέρει και αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη τους. Γενικά υπάρχει η πεποίθηση ότι δεν είναι πιθανό τα βακτήρια να χρησιμοποιήσουν το οξυγόνο ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων κατά την οξείδωση, με μόνη εξαίρεση τον *Lactococcus lactis* για τον οποίο παλαιότερα έχει αναφερθεί πως όταν υπάρχει ομάδα αίμης στο μέσο της καλλιέργειας, μπορεί να αναπτυχθεί και παρουσία οξυγόνου. Γενικότερα όμως, παρατηρήσεις από ερευνητές δείχνουν ότι το οξυγόνο γενικά συνδέεται με αρνητικές επιδράσεις στα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, συμπεριλαμβανομένου και του *L.lactis*. Η τοξικότητα του οξυγόνου αποδίδεται γενικά σε συγκεκριμένα μόρια οξυγόνου όπως το O₂⁻ (υπεροξειδίο), τη ρίζα του υδροξυλίου OH, τα οποία επιτίθενται στις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα, προκαλώντας έτσι κυτταρικό θάνατο. Υπάρχει ποικιλία κυττάρων (προκαρυωτών και ευκαρυωτών) οι οποίοι έχουν αναπτύξει αποτελεσματικές και λιγότερο αποτελεσματικές μεθόδους αντιμετώπισης της τοξικότητας του οξυγόνου. Για τα οξυγαλακτικά βακτήρια υπάρχει μεγάλη διάκριση στις αντιδράσεις μεταξύ των ειδών, και είναι δύσκολο να περιγραφεί ένας γενικός μηχανισμός απόκρισης στην οξείδωση, για αυτό θα αναφερθούν μηχανισμοί απόκρισης συγκεκριμένων ειδών (Guchte, και συν., 2002).

Πρόληψη του σχηματισμού αντιδραστικών ειδών οξυγόνου

Ένας τρόπος περιορισμού του σχηματισμού των μορίων που προκαλούν το πρόβλημα είναι η εξάλειψη του οξυγόνου από άλλους παράγοντες όσο το δυνατόν περισσότερο. Σε πείραμα οι (Guerzoni, Lanciotti, & Cocconcelli, 2001) παρατήρησαν ότι η σύνθεση των λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη του *L.helveticus* μπορεί να λειτουργήσει ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι τα λιπαρά οξέα έχουν την τάση να οξειδώνονται, καταναλώνοντας έτσι το διαθέσιμο οξυγόνο και μειώνοντας τις ελεύθερες ρίζες του κυττάρου. Ο

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus παρουσιάζει διαφορετικό μηχανισμό και αποβάλλει οξυγόνο σε μία αντίδραση η οποία καταλύεται από μια οξειδάση του NADH. Παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχει ουσιαστική συμβολή της συγκεκριμένης αντίδρασης και επομένως θεωρήθηκε ότι ο κύριος λόγος της αντίδρασης είναι η εξάλειψη του οξυγόνου (Marty-Teysset, Torre, & Garel, 2000). Το παράδοξο σε αυτή την παρατήρηση είναι ότι ένα από τα προϊόντα της αντίδρασης είναι και το H₂O₂ το οποίο από μόνο του είναι τοξικό για τα κύτταρα, και ο *L.bulgaricus* δεν διαθέτει καταλάση η οποία θα μπορούσε να καταστήσει το H₂O₂ αβλαβές, επομένως υπάρχει θέμα στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου είδους, και ο μηχανισμός αυτός είναι λειτουργικός μόνο σε βακτήρια τα οποία μπορούν σε συγκεκριμένες συνθήκες να παράξουν ένα είδος ψευδοκαταλάσης (Guchte, και συν., 2002).

Αποκατάσταση της οξειδωτικής βλάβης

Η αποκατάσταση των βλαβών που προκύπτουν από το οξειδωτικό στρες φαίνεται να είναι ο τελικός μηχανισμός της αντίστασης κατά των οξειδωτικών καταπονήσεων. Η αποκατάσταση των βλαβών είναι μία σύνθετη διαδικασία η οποία είναι διαφορετική για το κάθε στέλεχος και έχει να κάνει κατά βάση με το γονιδίωμα του κάθε βακτηρίου. Υπάρχει ολόκληρος μηχανισμός ενεργοποίησης από εξειδικευμένα ένζυμα, πρωτεΐνες και πρωτεϊνικούς μεταφορείς, οι οποίοι δρουν συνεργατικά, τόσο μεταξύ τους όσο και με τους γενικούς μηχανισμούς αντίστασης στο οξειδωτικό στρες, προκειμένου να αποκαταστήσουν το κύτταρο (Guchte, και συν., 2002).

Ψυχρό στρες στα βακτήρια γαλακτικού οξέος

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος είναι είτε μεσόφιλα, είτε θεرمόφιλα. Η παραμονή του όμως σε ψυχρές θερμοκρασίες είναι δεδομένη λόγω των μεθόδων παρασκευής των τυριών, ενώ υπάρχουν και τεχνικές αποθήκευσης καλλιεργειών οξυγαλακτικών βακτηρίων οι οποίες βασίζονται στην κατάψυξη. Η μελέτη της απόκρισης επομένως των βακτηρίων στο ψυχρό στρες είναι αναπόφευκτη. Όταν τα ζωντανά κύτταρα εκτίθενται σε μείωση της θερμοκρασίας, υφίστανται σημαντικές αλλαγές, όπως για παράδειγμα τη μείωση της ρευστότητας των κυτταρικών μεμβρανών και τη σταθεροποίηση των δευτερογενών δομών του RNA και DNA, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των διαδικασιών της αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης.

Προκειμένου να ξεπεραστούν αυτές οι δυσκολίες, τα βακτήρια έχουν αναπτύξει έναν προσαρμοστικό μηχανισμό, που ονομάζεται απόκριση ψυχρού σοκ. Στην συγκεκριμένη διαδικασία απόκρισης, τα βακτήρια ενεργοποιούν έναν αριθμό πρωτεϊνών τα οποία προκαλούνται από το κρύο (CIPs), και βοηθούν στο να διατηρηθεί η ρευστότητα της μεμβράνης με την αύξηση της αναλογίας των βραχύτερων και ακόρεστων λιπαρών οξέων στα λιπίδια, βοηθούν στην υπερσυσπείρωση του DNA και τέλος βοηθούν στην όσο το δυνατόν ομαλότερη λειτουργία των διαδικασιών αντιγραφής μεταγραφής και μετάφρασης (Guchte, και συν., 2002).

Αντοχή στο οσμωτικό στρες

Προκειμένου να λάβει χώρα ο μεταβολισμός του κυττάρου, οι ενδοκυτταρικές συνθήκες πρέπει να μένουν σχετικά σταθερές, ως προς την ιοντική τους σύνθεση, το pH και τα επίπεδα των μεταβολιτών τους. Η βακτηριακή κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι διαπερατή στο νερό, αλλά μπορεί και σχηματίζει έναν αποτελεσματικό φραγμό για τις περισσότερες διαλυμένες ουσίες που υπάρχουν στο κύτταρο. Μια μεταβολή στην οσμωτικότητα του περιβάλλοντος θα μπορούσε να δημιουργήσει πρόβλημα σε βασικές λειτουργίες του κυττάρου, επομένως πρέπει να υπάρξει προσαρμογή των κυττάρων προκειμένου να επιβιώσουν. Ένας μηχανισμός απόκρισης είναι η συσώρευση συμβατών διαλυτών ουσιών από τα κύτταρα, είτε μέσω πρόσληψης είτε μέσω σύνθεσης, σε συνθήκες υπερόσμωσης, και η χρησιμοποίηση τους υπό υποοσμωτικές συνθήκες. Εκτός από την οσμωτική ισορροπία οι συμβατές διαλυτές ουσίες μπορούν να επιφέρουν προστασία στην οσμωτική καταπόνηση, την υψηλή θερμοκρασία, την απόψυξη και την ξήρανση. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος μπορεί να εκτεθούν σε οσμωτικό στρες όταν προστίθενται σημαντικές ποσότητες αλατιού ή ζάχαρης στο προϊόν που υπάρχουν και οι καλλιέργειες (Guchte, και συν., 2002).

Απόκριση στην πείνα και ανοχή στο στρες

Τα βακτήρια λόγω αποθήκευσης περνούν το μεγαλύτερο μέρος του κύκλου ζωής τους στην στάσιμη φάση ανάπτυξης. Η διακοπή της εκθετικής φάσης και η είσοδος στην στατική φάση μπορεί να προκληθεί από πολλά διαφορετικά είδη στρες, όπως είναι

το όξινο, το οξειδωτικό, το οσμωτικό κ.α. Μέσα στους παράγοντες λοιπόν που φέρνουν τα βακτήρια στην στάσιμη φάση είναι η πείνα. Η έλλειψη θρεπτικών συστατικών είναι μία συχνή κατάσταση πρόκλησης στρες, λόγω των υψηλών απαιτήσεων σε θρεπτικά συστατικά που έχει η εκθετική φάση ανάπτυξης. Δεν είναι μόνο η εκθετική φάση όμως που μπορεί να καταναλώσει τα αποθέματα των θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος, αλλά μεγάλο ρόλο παίζει και η συνύπαρξη άλλων ειδών στρες, συνθήκη που επιφέρει ενεργειακή εξάντληση ανεξάρτητα από την εξωκυτταρική ποσότητα του υποστρώματος. Παρόλα αυτά ορισμένα βακτήρια μπορούν να προσαρμόζονται και να επιβιώνουν σε μακροχρόνια ασιτία. Κάποια βακτήρια αποκτούν την μορφή σπορίων, άλλα πάλι τα οποία δεν έχουν αυτήν την δυνατότητα μπορούν να τροποποιούν την μορφολογία των κυττάρων τους κατά την κυτταρική διαίρεση και να μειώνουν το μέγεθος των νεοσύστατων κυττάρων, έτσι ώστε να μην έχουν τόσο υψηλές απαιτήσεις σε θρεπτικά υλικά. Οι πηγές τις ασιτίας ποικίλουν ανάλογα την περίπτωση το υπόστρωμα και το είδος του μικροοργανισμού, μπορεί να έχουμε ασιτία από παροχή σακχάρων, φωσφορικών, αζώτου κ.α. στις οποίες περιπτώσεις ο κάθε μικροοργανισμός έχει ξεχωριστό προσαρμοστικό μηχανισμό αντιμετώπισης (Guchte, και συν., 2002).

3.16 ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ

Όπως έχει αναφερθεί και αναλυθεί σε αυτό το κεφάλαιο η παραγωγή οργανικών οξέων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την συντήρηση των τροφίμων. Δεν είναι όμως ο μοναδικός τρόπος με τον οποίο μπορούν αυτά τα βακτήρια να αυξήσουν την συντηρησιμότητα των τροφών, αλλά παράγουν επίσης και έναν αριθμό αντιμικροβιακών ενώσεων, στις οποίες περιλαμβάνονται το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το CO₂, το διακετύλιο, η ακεταλδεΐδη, τα D-ισομερή των αμινοξέων, η ρεουτερίνη και οι βακτηριοσίνες. Οι βακτηριοσίνες είναι μια ετερογενής ομάδα ριβοσωμικών πεπτιδίων ή πρωτεϊνών, οι οποίες παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι άλλων βακτηρίων. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει εκτεταμένες έρευνες σχετικά με τις βακτηριοσίνες των γαλακτικών οξέων, λόγω της δυνατότητας εφαρμογής τους ως βιοσυντηρητικά σε τρόφιμα, για την αναστολή την ανάπτυξης τροφογενών παθογόνων βακτηρίων, ιδίως της *Listeria monocytogenes*.

Έχει ταυτοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός βακτηριοσινών και έχουν γίνει αρκετές μελέτες όσον αφορά την βιοχημεία και την γενετική των συγκεκριμένων ουσιών. Οι βακτηριοσίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοσυντηρητικά, ως βιοενεργά συστατικά τροφίμων σε σκόνη, καθαρισμένα ή ημίκαθαρισμένα πεπτίδια, είτε ως ένα σύνολο βακτηριογόνων καλλιεργειών. Οι χρήση των βακτηριοσινών, όμως, από οικονομικής πλευράς, μπορεί να απαιτεί μία σχετικά δυσπρόσιτη προσέγγιση, διότι η λειτουργία της δρα συνεργατικά με παραδοσιακές (παστερίωση, συντηρητικά κ.τ.λ) και νέες (τροποποιημένη ατμόσφαιρα, παλμικά πεδία, υπερυψηλή πίεση κ.λπ.) τεχνικές συντήρησης, οι οποίες προκαλούν υποθανάτιο τραυματισμό στα βακτήρια. Ακόμη η χρήση μιγμάτων από διαφορετικές βακτηριοσίνες μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα και την διάρκεια ζωής του τροφίμου (Cintas, Casaus, Herranz, Nes, & Hernández, 2001).

Ταξινόμηση βακτηριοσινών των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Υπάρχουν τρεις καλά καθορισμένες κατηγορίες για την ταξινόμηση των βακτηριοσινών. Στην πρώτη κλάση I ανήκουν τα *lantibiotics*, τα οποία είναι μικρά θερμοσταθερά πολυκυκλικά πεπτίδια (<5kDa) που περιέχουν ασυνήθιστα και μεταφραστικά τροποποιημένα αμινοξέα. Η κλάση δύο II αποτελείται από τα μικρά θερμοσταθερά *non-lantibiotics* (<10kDa) τα οποία είναι υποδιαιρεμένα σε τέσσερις υποομάδες, τις IIa, IIb, IIc, IId. Οι IIa είναι βακτηριοσίνες με ισχυρή δράση κατά της *listeria*. Οι IIb είναι βακτηριοσίνες δύο πεπτιδίων, οι IIc είναι χρονικά-εξαρτώμενες βακτηριοσίνες και οι IId είναι οι βακτηριοσίνες της κατηγορίας II που δεν περιλαμβάνονται στις προηγούμενες ομάδες. Και τέλος έχουμε την τρίτη κλάση III, έχουμε τις μεγάλες βακτηριοσίνες (>30kDa), οι οποίες είναι ανθεκτικές στην θερμότητα. Τα *lantibiotics* και τα περισσότερα *non-lantibiotics* είναι ριβοσωμικά συντίθενται ως πρόδρομα πεπτίδια και έχουν ένα αμινικό άκρο, το οποίο αποκόπτεται ταυτόχρονα με εξαγωγή από ειδικού μεταφορείς δέσμευσης ATP και τις βοηθητικές τους πρωτεΐνες. Η πιο σημαντική βακτηριοσίνη της κλάσης I είναι η νισίνη, παράγεται από στελέχη του *Lactococcus lactis subsp. lactis* που απομονώνονται από γάλα και προϊόντα φυτικής προέλευσης, και από στελέχη του *L.lactis BB24* που απομονώνεται από ξηρά ζυμώμενα λουκάνικα. Η νισίνη έχει ευρύ φάσμα βακτηριοκτόνου δράσης, και ανταγωνίζεται τον *Staphylococcus aureus* και την

Listeria monocytogenes. Επιπλέον, εμποδίζει τον σχηματισμό σπορίων και αναστέλλει τα βλαστικά κύτταρα των *Bacillus spp.* και *Clostridium spp.*. Η νισίνη είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη βακτηριοσίνη, και η μόνη που είναι διεθνώς αποδεκτή ως βιοσυντηρητικό των τροφίμων σε τυριά, γαλακτοκομικά και κονσερβοποιημένα προϊόντα. Στις βακτηριοσίνες της κλάσης II (*non-lantibiotics*), έχουμε μια ετερογενή ομάδα βακτηριοσινών, παρά τις διαφορές των πρωτοταγών δομών τους, οι περισσότερες είναι μικρά θερμοσταθερά πεπτίδια με υψηλή περιεκτικότητα σε αμινοξέα όπως η γλυκίνη. Είναι κατιονικά και συχνά αμφίφιλα, γεγονός που τους δίνει την δυνατότητα να σκοτώνουν κύτταρα στόχους μέσω της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Οι βακτηριοσίνες της κλάσης III είναι υψηλού μοριακού βάρους και ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Enterococcus*. Οι βακτηριοσίνες της κλάσης III σε αντίθεση με τις βακτηριοσίνες των κλάσεων I και II, αδρανοποιούνται κατά την θερμική επεξεργασία, όταν παραμένουν σε θερμοκρασίες άνω των 60°C για 10 με 15 λεπτά, και δεν δρουν σε ευαίσθητα κύτταρα προκαλώντας διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης. Το 1993 ο Klaenhammer ανέφερε μία τέταρτη κατηγορία βακτηριοσινών, που να περιλαμβάνει όλες τις βακτηριοσίνες των οποίων η βιολογική δραστηριότητα να απαιτεί την παρουσία γλυκιδικών ή και λιπιδικών τμημάτων εκτός του πρωτεϊνικού κλάσματος (Klaenhammer, 1993). Τέτοιες βακτηριοσίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες όπως η λευκοσίνη S και η λακτοσίνη 27, λιποπρωτεΐνες μεσεντεροσίνη 52 και γλυκολιποπρωτεΐνες όπως η φερμεντισίνη. Βέβαια αυτή η κατηγορία είναι αβέβαιη (Cintas, Casaus, Herranz, Nes, & Hernández, 2001).

Φυσικοχημικές ιδιότητες των βακτηριοσινών

Οι LAB βακτηριοσίνες περιέχουν ένα πρωτεϊνικό λειτουργικό μοτίβο, και με την απουσία αυτού χάνουν την ικανότητα τους στην ανταγωνιστικότητα. Τα *lantibiotics* είναι πολυκυκλικές βακτηριοσίνες που παράγονται από Gram-θετικά βακτήρια και παρέχουν ασυνήθιστα μετα-μεταφραστικά τροποποιημένα αμινοξέα όπως είναι τα α,β-διϋδροαλανίνη (Dha), α,β-διϋδροβουτυρίνη (Dhb), μεσο-λανθιονίνη (Lan) και β-μεθυλο-λανθιονίνη (MeLan). Έγινε διαχωρισμός των *lantibiotics* και υποδιαιρέθηκαν σε τύπου A και B για να διαχωριστούν οι σημαντικές δομικές και λειτουργικές διαφορές μεταξύ των πεπτιδίων. Τα *lantibiotics* τύπου A είναι επιμήκη μόρια που

δρούν διαπερνώντας την κυτταροπλασματική μεμβράνη των ευαίσθητων κυττάρων, ενώ τα *lantibiotics* τύπου Β συντίθενται από Gram-θετικά βακτήρια με υψηλή περιεκτικότητα στις αζωτούχες ενώσεις G+C, δεν απαντώνται ιδιαίτερα στα οξυγαλακτικά βακτήρια. Τα *lantibiotics* είναι μικρά πεπτίδια, 19-37 κατάλοιπα αμινοξέων. Τα *non-lantibiotics* διακρίνονται σε δύο ομάδες, τα μικρά πεπτίδια, με 37-59 αμινοξικά κατάλοιπα και M.B.<10.000, και τις μεγαλύτερες πρωτεΐνες με M.B.>30.000, όπως είναι η ελβετική J, η καζεϊκίνη 80 και η εντερολυσίνη. Οι πιο πολλές βακτηριοσίνες που έχουν χαμηλό μοριακό βάρος είναι κατιονικές, pH 7,0, και αυτό φαίνεται να αποτελεί ένα κοινό χαρακτηριστικό για τα *lantibiotics* και τα *non-lantibiotics*. Άλλα κοινά χαρακτηριστικά που έχουν είναι τα υψηλά ισοηλεκτρικά τους σημεία και η παρουσία υδρόφοβων και υδρόφιλων περιοχών, οι οποίες σχετίζονται με την δραστηριότητά τους σε επίπεδο κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η βακτηριοσίνες έχουν επίσης και επίπεδο προσαρμοστικότητας, εφόσον μπορούν να είναι δραστικές τόσο σε όξινες όσο και σε φυσιολογικές τιμές pH. Εξάιρεση σε αυτό το γεγονός αποτελεί η νισίνη και οι λακτοστρεπίνες, διότι οι αντιμικροβιακές τους ιδιότητες εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από αυτήν την παράμετρο. Η νισίνη διατηρεί την διαλυτότητα και την σταθερότητα της στο βέλτιστό pH 2,0, και μειώνεται όσο το pH ανεβαίνει προς το 6,0, ενώ υφίσταται μη αναστρέψιμη αδρανοποίηση σε pH:7,0. Οι λακτοστρεπίνες είναι δραστικές και σταθερές σε ένα εύρος pH 4,2 έως 5,0 και υφίστανται μη αντιστρεπτή αδρανοποίηση σε pH 7,0 με 8,0. (Cintas, Casaus, Herranz, Nes, & Hernández, 2001).

Οι οξυγαλακτικές βακτηριοσίνες εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως το στάδιο καθαρισμού της βακτηριοσίνης, η παρουσία θερμικών προστατευτικών και το pH. Έχει δοκιμαστεί για την λακτασίνη Β, την καρνοσίνη U-149 και την σακακίνη Ρ ότι σε περίπτωση που δεν είναι καθαρισμένες με ομοιογένεια ή είναι μερικώς καθαρισμένες έχουν μειωμένη θερμική σταθερότητα. Ωστόσο, οι ενώσεις αυτές δεν είναι από την φύση τους τόσο ισχυρές όσο η νισίνη για παράδειγμα, η οποία όταν είναι καθαρισμένη μένει ενεργή μετά από θέρμανση στους 100°C για 10 λεπτά σε pH 2,0 (Cintas, Casaus, Herranz, Nes, & Hernández, 2001).

Αντιμικροβιακό φάσμα των βακτηριοσινών

Σύμφωνα με μελέτες οι βακτηριοσίνες είναι βακτηριοκτόνες έναντι σε συγγενικά βακτήρια. Σε γενικό πλαίσιο, υπάρχουν διάφορες παρατηρήσεις σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση των βακτηριοσινών χαμηλού μοριακού βάρους, αφ' ενός ορισμένα στελέχη ενός συγκεκριμένου είδους μπορεί να είναι ευαίσθητα, ενώ άλλα μπορεί να είναι ανθεκτικά σε μια συγκεκριμένη βακτηριοσίνη, αφ' ετέρου ένα στέλεχος το οποίο έχει δείξει ότι έχει ευαισθησία στις βακτηριοσίνες μπορεί να περιλαμβάνει είδη στον πληθυσμό του τα οποία να είναι ανθεκτικά σε αυτήν, και επιπροσθέτως ένα στέλεχος μπορεί να είναι ευαίσθητο σε μία βακτηριοσίνη και παράλληλα να παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε έναν πολύ παρόμοιο τύπο βακτηριοσίνης. Ακόμη, τα κύτταρα που παράγουν μία συγκεκριμένη βακτηριοσίνη, μπορεί να είναι και τα ίδια ευάλωτα, αν ανταγωνιστούν μια άλλη βακτηριοσίνη, ενώ αν ένα στέλεχος δημιουργεί σπόρια προκειμένου να υπάρχει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε μία βακτηριοσίνη, τότε σε ενδεχόμενη βλάστηση του σπορίου, ξαναεμφανίζει την ευαισθησία του. Τέλος τα Gram-αρνητικά βακτήρια δεν παρουσιάζουν ευαισθησία στις βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Η μοναδική περίπτωση εξασθένισης ενός Gram-αρνητικού βακτηρίου από LAB βακτηριοσίνη είναι να πλήττεται ταυτόχρονα και από άλλα είδη στρες, όπως για παράδειγμα την παρουσία οργανικών οξέων (Cintas, Casaus, Herranz, Nes, & Hernández, 2001).

Αυτοπροστασία της παραγωγής και αντίσταση των βακτηριοσινών

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια πέρα από την παραγωγή βακτηριοσινών, διαθέτουν και έναν ειδικό μηχανισμό, ο οποίος προσφέρει αυτοπροστασία, σε περίπτωση που εκείνες πλήττονται. Αυτός ο μηχανισμός εξαρτάται από μία ειδική πρωτεΐνη ανοσίας η οποία εκφράζεται σε ταυτόχρονο σημείο με την βακτηριοσίνη, ενώ δεν απαιτεί την διεργασία επεξεργασίας και μεταφοράς στο εξωκυττάριο μέσο. Οι πρωτεΐνες ανοσίας είναι μικρά πεπτίδια μεγέθους, 51-154 αμινοξικά κατάλοιπα, υψηλές τιμές ισοηλεκτρικού σημείου (7-10) και διαμεμβρανικές α-έλικες, οι οποίες υποδηλώνουν την ενσωμάτωσή τους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη της βακτηριοσίνης. Παρά την περιορισμένη ταυτοποίηση των πρωτεϊνών ανοσίας, έχουν ταυτοποιηθεί οι πρωτεΐνες ανοσίας που σχετίζονται με τα *non-lantibiotics*, είναι αυτές της λακτοκοκκίνης A(LciA) και της καρνοβακτηριοσίνης B2. Ένας μηχανισμός

ανοσολογικής απόκρισης από τις βακτηριοσίνες είναι ο εξής, η LciA αποτελείται από 98 αμινοξέα, είναι μη μεταφραστικά τροποποιημένα και βρίσκονται στο κυτταρικό κλάσμα του κυττάρου που παράγει τις βακτηριοσίνες, και σχετίζεται με ένα μικρότερο κλάσμα που συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη. Αποδείχθηκε ότι μία περιοχή της LciA είναι ιδιαίτερα υδρόφοβη και μπορεί να υιοθετήσει διαμόρφωση διαμεμβρανικής α-έλικας. Οι (Venema,, et al., 1994) πρότειναν ότι η συγκεκριμένη δομή αλληλεπιδρά με μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία πιθανώς να είναι και ο υποδοχέας της λακτοκοκκίνης A, και παρεμβάλλεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, η οποία βρίσκεται στο N-τελικό και Γ-τελικό άκρο της LciA. Ο εγκλωβισμός της LciA στον υποδοχέα εμποδίζει την εισαγωγή της λακτοκοκκίνης A στη μεμβράνη και συνεπώς την βακτηριοκτόνο δράση της. Το περιεχόμενο του κυττάρου της LciA θα αποτελούσε μια δεξαμενή στην οποία τα μόρια κατευθύνονται προς την μεμβράνη, ενώ παράλληλα θα δημιουργούνταν νέα μόρια υποδοχέα (Venema,, και συν., 1994). Άλλα μοντέλα προτείνουν πως οι πρωτεΐνες ανοσίας αλληλοεπιδρούν με μόρια βακτηριοσίνης που ενσωματώνονται στους πόρους οι οποίοι στην συνέχεια αποσταθεροποιούνται. Γενικότερα, η διαπίστωση ότι οι πρωτεΐνες ανοσίας των συγγενών βακτηριοσινών δεν έχουν ιδιαίτερη ομοιότητα δείχνει πως δεν υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηριοσινών και των πρωτεϊνών ανοσίας τους. Η έννοια της ανοσίας της βακτηριοσίνης ως μία μέθοδος που επιτρέπει την επιβίωση των παραγωγών βακτηριοσινών διαφέρει από εκείνη της αντοχής ενός βακτηριακού στελέχους σε μία συγκεκριμένη βακτηριοσίνη. Ο μηχανισμός της βακτηριακής αντοχής στην τοξικότητα που τους προκαλούν οι βακτηριοσίνες ενδεχομένως να μπορεί να συμβεί με την τροποποίηση των υποδοχέων των βακτηριοσινών, με τροποποιήσεις στην ρευστότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ή της σύνθεσης μιας πρωτεΐνης που προσδίδει αντίσταση κατά των βακτηριοσινών. Με αυτή την βάση οι μεταλλάξεις της *L.monocytogenes* που έχουν καταστεί ανθεκτικές στην νισίνη, διαθέτουν υψηλό ποσοστό γραμμικών υδρογονανθρακικών αλυσίδων με λίγες διακλαδώσεις και έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση της ρευστότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Το συγκεκριμένο γεγονός είναι αυτό που θα επιφέρει μειωμένη αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα της βακτηριοσίνης (Cintas, Casaus, Herranz, Nes, & Hernández, 2001).

4. Ανταγωνιστικότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων με την *Listeria monocytogenes* σε μαλακά τυριά

4.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΜΑΛΑΚΩΝ ΤΥΡΙΩΝ

Μια από τις σημαντικότερες και πιο ολοκληρωμένες πηγές διατροφής είναι το γάλα. Αποτελεί ένα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, βιταμίνες και απαραίτητα ιχνοστοιχεία υπόστρωμα. Το βασικότερο εμπόδιο που εμφανίζει είναι η μικρή διάρκεια ζωής του, λόγω της ανάπτυξης σε αυτό παθογόνων μικροοργανισμών οι οποίοι προκαλούν σημαντικά προβλήματα στην υγεία των καταναλωτών. Αυτό το πρόβλημα λοιπόν ήταν η κινητήριος αφορμή για να βρεθούν εναλλακτικές πρακτικές οι οποίες θα κάνουν το γάλα πιο εύκολα συντηρήσιμο. Θεωρείται ότι η ανακάλυψη του τυριού συνέβη τυχαία, όταν ένας έμπορος ο οποίος ταξίδευε μέσα στην έρημο τοποθέτησε το γάλα σε ένα ασκί από στομάχι προβάτου. Το γεγονός ότι στην έρημο έχουμε αυξημένη θερμοκρασία συνδυαστικά με την πυτιά που υπήρχε στο εσωτερικό του ασκού, επέφερε την πήξη του γάλακτος, και τον διαχωρισμό του πηγματος από τον ορό. Έπειτα από την κατανάλωση του πηγματος, ο έμπορος παρατήρησε ότι είχε μια ευχάριστη όξινη γεύση και ένα ελαφρύ αίσθημα κορεσμού. Σύμφωνα λοιπόν με την φήμη έτσι ανακαλύφθηκε το τυρί. Παρά όμως αυτό τον μύθο για τον τρόπο με τον οποίο ανακαλύφθηκε η παρασκευή του τυριού, υπάρχει μια ακόμη εκδοχή η οποία υποστηρίζει ότι ανακαλύφθηκε από ερευνητές στην προσπάθειά τους να βρουν τρόπους για την επιμήκυνση της ζωής του, μέσω της ξήρανσης. (Πυροβόλου, 2019).

4.2 ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΜΑΛΑΚΩΝ ΤΥΡΙΩΝ

Τα μαλακά τυριά έχουν συγκεκριμένη περιεκτικότητα υγρασίας η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει το 58%, σε γενικό πλαίσιο κυμαίνεται από 46-58%, ενώ πιο συγκεκριμένα έχουμε για τα τυριά τα οποία περιλαμβάνονται στην εξαιρετική ποιότητα η υγρασία δεν πρέπει να υπερβαίνει το 54%, στα προϊόντα πρώτης ποιότητας το 56% και στα προϊόντα δεύτερης ποιότητας το 58%.

Η χρήση μικροοργανισμών για την ωρίμανση των τυριών είναι εξειδικευμένη ανά είδος τυριού. Για παράδειγμα ο τελεμές ωριμάζει με βακτήρια, η φέτα ωριμάζει με βακτήρια και μικροοργανισμούς επιφάνειας, το τυρί Camembert ωριμάζει με μύκητες στο εσωτερικό του, ενώ τα τυριά Μυζήθρα, Μανούρι, Cottage και τα τυριά κρέμα είναι νωπά (Χριστοδούλου, 2016).

4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ 1: ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΚΑΙ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟ ΚΑΤΙΚΙ ΔΟΜΟΚΟΥ (ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ (Kagkli, Iliopoulos, Stergiou, Lazaridou, & Nychas, 2009))

Το νομοθετικό πλαίσιο για τα όρια ανοχής της ύπαρξης της *Listeria monocytogenes* στα τρόφιμα έχει αναφερθεί στο πρώτο κεφάλαιο, και είναι μέγιστο όριο ανοχής 100 cfu/g για τα μαλακά τυριά. Σχετικά με τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα (ΕΠΚ), η παρουσία της *L.monocytogenes* είναι μεγάλης σημασίας, διότι ευνοούν πολύ την ανάπτυξη της. Είναι από τις λίγες περιπτώσεις όπου τα νομοθετικά κριτήρια που αφορούν ένα τρόφιμο τροποποιούνται ανάλογα με την ομάδα καταναλωτή στην οποία απευθύνονται. Έχουν δηλαδή διαφορετικά όρια αν προορίζονται για βρέφη, για ηλικιωμένους, ή για άλλους υποπληθυσμούς στόχους. Υπάρχουν ακόμη ταξινομήσεις στα ΕΠΚ τρόφιμα με βάση την βιοχημική τους σύσταση, και την δυνατότητα τους να αναπτύσσουν την *L.monocytogenes* ή όχι. Τα προϊόντα τα οποία έχουν pH 5 και ενεργότητα νερού 0,94, και έχουν παράλληλα διάρκεια ζωής μικρότερη από 5 ημερών, ανήκουν αυτόματα στην κατηγορία των ΕΠΚ προϊόντων τα οποία δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *L.monocytogenes*. Το pH και η ενεργότητα νερού στο κατίκι Δομοκού, ένα τυρί το οποίο είναι έτοιμο προς κατανάλωση, έχει όρια τα οποία συμφωνούν με τον γενικό κανόνα της Ε.Ε. Παράγεται από κατσικίσιο γάλα, ή από μίγμα κατσικίσιου με πρόβειου γάλακτος, και είναι λευκό τυρί με κρεμώδη υφή. Αποτελεί ΠΟΠ προϊόν, και η κατανάλωση του τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί ραγδαία. Κατά την παρασκευή του, έχουμε αρχικά παστερίωση του γάλακτος και ψύξη του στους 27-28°C. Αφήνεται να πήξει, είτε με πυτιά είτε χωρίς, και έπειτα αφήνεται να φτάσει στους 20-22°C. Το τυρόπηγμα που έχει προκύψει, πολτοποιείται, τοποθετείται σε ειδικούς σάκους για την αποστράγγιση, και υψηλή τελική υγρασία (\cong 75%), χαμηλή περιεκτικότητα σε αλάτι (1%) και pH από 4,3 έως 4,5. Αποθηκεύεται

στους 4-5°C. Η εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων που σχετίζονται με την ανάπτυξη, την επιβίωση και τον θάνατο της *L.monocytogenes* μελετάται αρκετά συχνά, και ένας από τους λόγους είναι ότι συχνά δεν τηρούνται οι απαιτούμενες προδιαγραφές που έχουν να κάνουν με την θερμοκρασία (Kagkli, Iliopoulos, Stergiou, Lazaridou, & Nychas, 2009).

Σε πειραματική μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους (Kagkli, Iliopoulos, Stergiou, Lazaridou, & Nychas, 2009) μελετήθηκε η επιβίωση πέντε στελεχών της *L.monocytogenes* τα οποία εμβολιάστηκαν σε τυρί Κατίκι Δομοκού, είτε μεμονωμένα, είτε αναμεμιγμένα σε μορφή κοκτέιλ. Το τυρί το στο οποίο εμβολιάστηκαν τα στελέχη, αποθηκεύτηκε σε 5,10,15 και 20°C για ένα μήνα. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική PFGE για την παρακολούθηση της επιβίωσης των στελεχών. Τα στελέχη που χρησιμοποίησαν ήταν δύο στελέχη με ορότυπο 4b και τρία στελέχη τα οποία είχαν απομονωθεί από μαλακά τυριά και τον ιμάντα μεταφοράς των ΕΠΚ τροφίμων. Παρακολούθησαν την ποιοτική και ποσοτική εξέλιξη του πληθυσμού καθ' όλη την διάρκεια της αποθήκευσης, έτσι ώστε να υπάρχει ολοκληρωμένη εικόνα της ανάπτυξης (Kagkli, Iliopoulos, Stergiou, Lazaridou, & Nychas, 2009).

Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, και ως μίγματα εμβολιασμού, και ως απομονωμένες καλλιέργειες, ήταν κωδικοποιημένα ως TS125, TS124, TS128, TS131 και TS133. Δύο από τα στελέχη, τα TS124 και TS125 ήταν στελέχη του οροτύπου 4b. Οι συγκεκριμένοι κωδικοί αντιστοιχούσαν στα στελέχη NCTC 10527 (TS124) και Scott A (TS125). Τα στελέχη TS128 και TS133 ανακτήθηκαν και καλλιεργήθηκαν από μαλακά τυριά, ενώ το στέλεχος TS131 απομονώθηκε από τον ιμάντα μεταφοράς τροφίμων των ΕΠΚ προϊόντων.

Συνθήκες αποθήκευσης του τυριού Κατίκι Δομοκού

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις φορές, για κάθε επανάληψη χρησιμοποιήθηκαν οκτώ εμπορικά διαθέσιμα τυριά κατίκι Δομοκού 250 γραμμαρίων. Τα δείγματα αντιστοιχούσαν σε ποσότητες των 10g. Όσον αφορά την επιμόλυνση, 4 συσκευασίες ανοίχτηκαν εμβολιάστηκαν και επανασφραγίστηκαν, και έπειτα τοποθετήθηκαν για αποθήκευση στις απαιτούμενες θερμοκρασίες. Χρησιμοποιήθηκαν άλλες τέσσερις

συσκευασίες οι οποίες δεν εμβολιάστηκαν αλλά ακολούθησαν την ίδια πορεία προς την αποθήκευση, δηλαδή ανοίχτηκαν και επανασφραγίστηκαν, έτσι ώστε να είναι αντικειμενικά τα αποτελέσματα ως προς τα ποσοστά επιμόλυνσης.

Δειγματοληψία τυριού και διαδικασία απομόνωσης

Η διερεύνηση της ανάπτυξης των στελεχών της *L.monocytogenes* και για τα απομονωμένα στελέχη, αλλά και για τα στελέχη στα οποία είχε γίνει μίξη, έγινε στην αρχή, στην μέση (ημέρες: 3^η, 4^η, 5^η, 6^η, 8^η, 10^η, 12^η, 18^η και 30^η), καθώς και στο τελικό στάδιο αποθήκευσης (30^η ημέρα) για όλες τις διαφορετικές θερμοκρασίες 5°C, 10°C, 15°C, 20°C

Αποτελέσματα του πειράματος

Για αρχή, πρέπει να αναφερθεί ότι ελέγχθηκαν όλα τα δείγματα, και δεν ήταν επιμολυσμένα με *L.monocytogenes* στην αρχή του πειράματος. Ένα δείγμα παρέμεινε ανεμβολίαστο, προκειμένου να μπορούν να διεξαχθούν συγκρίσιμα αποτελέσματα, και καθ' όλη την διάρκεια της αποθήκευσης δεν παρουσίασε ανάπτυξη της *L.monocytogenes*. Στην αρχική φάση του εμβολιασμού με μίγματα στελεχών *L.monocytogenes* τα εμβολιασμένα δείγματα είχαν πληθυσμό περίπου στα 6 log cfu/g. Η ανάπτυξη των πληθυσμών ήταν διαφορετική, ανάλογα με την θερμοκρασία αποθήκευσης. Την υψηλότερη βιωσιμότητα του παθογόνου εμφάνισε η αποθήκευση του δείγματος στις χαμηλότερες θερμοκρασίες, όπου και ανιχνεύθηκαν έως και 18^η, για τον εμβολιασμό με κοκτέιλ στελεχών, και 30^η για τον εμβολιασμό με απομονωμένο στέλεχος του παθογόνου. Την χαμηλότερη βιωσιμότητα εμφάνισαν οι 20 °C στους οποίους η ανίχνευση στελεχών ήταν δυνατή μέχρι και την 5^η ημέρα, για τα δείγματα τα οποία ήταν εμβολιασμένα με κοκτέιλ στελεχών, και 10^η ημέρα για τα δείγματα τα οποία ήταν εμβολιασμένα με απομονωμένα στελέχη του παθογόνου. Παράλληλα η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων ακολούθησε αυξητική στάση, με σταθερή άνοδο από 6,2 έως 6,5 log cfu/g σε 8,0 έως 8,2 log cfu/g. Όσον αφορά το pH, παρατηρήθηκε μείωση από αρχικές τιμές 4,5 έως 4,6 σε επίπεδα 4,2 έως 4,3, καθ' όλη την διάρκεια της αποθήκευσης. Οι διαφορές του pH που παρατηρήθηκαν μεταξύ διαφορετικών θερμοκρασιών δεν ήταν σημαντικές. Στην παρατήρηση της ανάπτυξης των δειγμάτων τα οποία είχαν εμβολιαστεί με απομονωμένα στελέχη

παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των υψηλών και χαμηλών θερμοκρασιών. Το κοινό στοιχείο σε όλες τις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν ήταν ότι υπήρξε ένα συγκεκριμένο στέλεχος (TS125), το οποίο ήταν αυτό που είχε την μεγαλύτερη επιβίωση σε όλες τις θερμοκρασίες. Για τα υπόλοιπα στελέχη, η ανάπτυξη δεν είχε μεγάλες διαφορές μεταξύ των 5 και των 10°C, παρόλο που στους 5 °C ανιχνεύθηκε ποσότητα βακτηρίων και την 30^η ημέρα ενώ στους 10°C δεν ανιχνεύθηκε. Στους 15 και 20°C, δεν εντοπίστηκαν ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ των διαφορετικών στελεχών, τα οποία ήταν όμως απομονωμένα στελέχη, μέχρι το σημείο όπου το συγκεκριμένο στέλεχος που προαναφέρθηκε (TS125) να κυριαρχήσει της επιβίωσης. Από τις 215 αποικίες που αναπτύχθηκαν, οι 159 ήταν πιθανές απομονώσεις της *L.monocytogenes*, και υποβλήθηκαν σε PFGE για την ανίχνευση της επιβίωσης συγκεκριμένων στελεχών της, κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Μεταξύ των διαδοχικών επαναλήψεων του πειράματος ανακτήθηκαν δεκαπέντε απομονώσεις στις επαναλήψεις 1 και 2 και 20 απομονώσεις στην επανάληψη 3. Το εμβόλιο με την μίξη των διαφορετικών στελεχών ήταν σχεδιασμένο έτσι ώστε να είναι ίδια τα επίπεδα από το κάθε στέλεχος, για ίσες πιθανότητες ανάπτυξης, παρόλα αυτά η PFGE έδειξε ότι τα τελικά επίπεδα των στελεχών δεν ήταν αντιστοίχως στα ίδια επίπεδα. Το στέλεχος το οποίο επικράτησε έναντι των υπολοίπων ήταν το TS125, σε ποσοστό 40%, ενώ άλλα στελέχη επικράτησαν σε μικρότερα ποσοστά. Ακόμη μέσω ταυτοποίησης της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη της *Listeria monocytogenes*. Ακόμη η PFGE έδειξε ότι στους 5°C μόνο το στέλεχος TS131 κατάφερε να επιβιώσει έπειτα από 18 ημέρες επώαση, δείχνοντας ότι τα υπόλοιπα δεν ήταν ικανά για επιβίωση για μεγάλη διάρκεια σε τόσο χαμηλή θερμοκρασία. Κανένα στέλεχος της *Listeria* δεν επέζησε μέχρι και την 30^η ημέρα στους 5°C, ενώ είκοσι ένα στελέχη *L.monocytogenes* τα οποία είχαν εμβολιασθεί απομονωμένα ανακτήθηκαν την 30^η ημέρα στους 10°C, και ανήκαν στα στελέχη TS133 σε ποσοστό 5% και TS125 σε ποσοστό 95%. Στους 15 °C την 30^η ημέρα ανακτήθηκαν 8 απομονώσεις και ανήκαν στα στελέχη TS125, TS124, και TS131, με ποσοστά μεταξύ 12,5-62,5%. Το TS125 ήταν αυτό που επικράτησε των υπολοίπων, ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η πλειονότητα των απομονωμένων στελεχών ανήκε σε στελέχη του *Bacillus spp.* και *Lactobacillus spp.* τα οποία ξεπέρασαν τα ποσοστά της *Listeria monocytogenes*. Τέλος, στους 20°C ανακτήθηκαν συνολικά 15 απομονώσεις. Υπήρξε

μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των επαναλήψεων όσον αφορά την ανάκτηση των στελεχών. Το TS125, το TS128 και το TS131 ανιχνεύθηκαν την 30^η ημέρα, ενώ το TS124 δεν ήταν παρόν σε κανένα στάδιο της αποθήκευσης. Το TS133 εντοπίστηκε στα μέσα της αποθήκευσης αλλά έως την 30^η ημέρα δεν είχε επιβιώσει. Τα υπόλοιπα στελέχη που ταυτοποιήθηκαν δεν ανήκαν στο γένος της *Listeria* (Kagkli, Iliopoulos, Stergiou, Lazaridou, & Nychas, 2009).

Συμπεράσματα του πειράματος

Η PFGE είναι μια μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την παρακολούθηση και ανίχνευση της *L.monocytogenes* στα γαλακτοκομικά προϊόντα τα οποία παρασκευάζονται από νωπό γάλα, η συγκεκριμένη εφαρμογή αποτελεί μια ακόμη επιβεβαίωση για το πως μπορεί το νωπό γάλα και τα προϊόντα του να αποτελέσουν δυνητικό κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή. Το κατίκι Δομοκού, δεν παράγεται από νωπό γάλα αλλά κινδυνεύει από ενδεχόμενη επιμόλυνση, λόγω κακών πρακτικών υγιεινής. Από την συγκεκριμένη πειραματική ανάλυση βλέπουμε ότι οι συνθήκες αποθήκευσης μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την ποικιλομορφία του μικροβιώματος του τυριού. Επηρεάζουν δηλαδή την επιβίωση της *Listeria monocytogenes* μέσα στο υπόστρωμα του τροφίμου. Κάτι που παρατηρήθηκε ακόμη, ήταν πως τα ίδια στελέχη που επιβίωσαν ως απομονωμένα στελέχη *listeria*, υπερίσχυσαν και όταν συνυπήρξαν με άλλα στελέχη *listeria* σε κοκτέιλ. Το κυρίαρχο στέλεχος ήταν το TS125 στους εμβολιασμούς απομονωμένων στελεχών, και ταυτόχρονα η παρουσία του μέσα στο κοκτέιλ εμβολιασμού, παρότι η ανάπτυξη των στελεχών είχε διαφορές ανάλογα με την θερμοκρασία αποθήκευσης, συνέχιζε να έχει την υπεροχή. Το συγκεκριμένο γεγονός είναι απόλυτα φυσιολογικό δεδομένου ότι ανάλογα την θερμοκρασία αποθήκευσης έχουμε ιδανική ανάπτυξη για διαφορετικά στελέχη, ενώ ταυτόχρονα επηρεάζεται και η μικροχλωρίδα που φυσικά υπάρχει μέσα στο προϊόν (οξυγαλακτικά βακτήρια), το οποίο έχει επιρροή στην επιβίωση της *L.monocytogenes*. Οι απομονώσεις των στελεχών της *listeria* είχαν υψηλότερο βαθμό ανάκτησης στις χαμηλότερες θερμοκρασίες αποθήκευσης, το οποίο ίσχυσε και για τις δύο περιπτώσεις εμβολιασμού. Το συγκεκριμένο γεγονός, μαζί με την παρατήρηση ότι τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος είχαν μεγαλύτερο ποσοστό ανάπτυξης όσο μεγαλύτερη ήταν και η θερμοκρασία, μας οδηγεί στο ότι πιθανώς να υπήρχε

μικρότερος ανταγωνισμός για κατανάλωση θρεπτικών συστατικών του τροφίμου όσο μικρότερη ήταν και η θερμοκρασία του. Μια ακόμη παρατήρηση είναι πως στελέχη τα οποία ανιχνεύθηκαν σε χαμηλά επίπεδα στο αρχικό κοκτέιλ κατάφεραν να επιβιώσουν, ενώ κάτι τέτοιο τους ήταν αδύνατο όταν εμβολιάστηκαν ως απομονωμένα στελέχη. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να λάβει μια εξήγηση υπό το πρίσμα της προσαρμοστικότητας, μπορεί δηλαδή να μην κατάφερε να προσαρμοστεί εύκολα στα περιβαλλοντικά δεδομένα του υποστρώματος του τυριού, το στέλεχος TS131 για παράδειγμα είναι μια τέτοια περίπτωση, κάτι το οποίο είναι φυσιολογικό αν λάβουμε υπόψιν ότι το συγκεκριμένο δείγμα είχε απομονωθεί από τον ιμάντα μεταφοράς των ΕΠΚ προϊόντων, πράγμα που εξηγεί γιατί δεν ήταν ομαλή η προσαρμογή του στο υπόστρωμα του τυριού σε σχέση με τα άλλα στελέχη. Οι τιμές pH του τυριού είναι οριακές για ανάπτυξη της *L.monocytogenes* και πολλές φορές προκαλεί αναστολή του παθογόνου σε μαλακά τυριά γενικότερα. Η επίτευξη της τελικής ανάπτυξης ή μη, πιθανότατα να σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά του κάθε στελέχους, την παθογένεια του, τον ορότυπο κ.α. Θα ήταν λογικό να περιμένουμε η μικροχλωρίδα του τροφίμου σε παρόμοιες θερμοκρασίες να είναι παρόμοια, αντιστοίχως. Θα ήταν λογικό λόγω της παρουσίας των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, οι οποίοι στις θερμοκρασίες 15 και 20°C θα είχαν ισχυρή ανάπτυξη. Παρόλο που δεν αναλύθηκαν τα διαφορετικά στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, αλλά η παρατήρηση έγινε στο σύνολο του πληθυσμού τους, το γεγονός ότι η *listeria* είχε επιβιώσει για μικρότερο διάστημα στους 20°C από ότι στους 15°C δείχνει ότι ο ανταγωνισμός των οξυγαλακτικών όσο ανεβαίνει η θερμοκρασία γίνεται υψηλότερος. Ακόμη η ύπαρξη των βακτηριοκτόνων και βακτηριοστατικών ενώσεων μπορεί να εξαλείφει ορισμένα ευαίσθητα στελέχη. Η συγκεκριμένη εργασία, μας παρέχει το δεδομένο της διαφορετικής επιβίωσης των στελεχών εντός του τροφίμου, αποδεικνύοντας ότι η ανικανότητα επιβίωσης κάποιου στελέχους σε συγκεκριμένη θερμοκρασία δεν σημαίνει την απουσία ανάπτυξης όλων των στελεχών της *listeria* γενικά. Ακόμη διεξήχθη το συμπέρασμα ότι ορισμένα στελέχη έχουν διαφορετική ικανότητα επιβίωσης αν εμβολιασθούν απομονωμένα ή σε κοκτέιλ στελεχών. Σε όλες τις περιπτώσεις το ποιο ανθεκτικό στέλεχος, με την μεγαλύτερη ικανότητα ανάπτυξης ήταν το TS125 του οροτύπου 4b, το οποίο όπως έχει αναφερθεί και στο 1^ο κεφάλαιο έχει συσχετιστεί με την τροφογενή ασθένεια της λιστερίωσης. Το συγκεκριμένο

γεγονός δείχνει ότι όταν διεξάγεται ανάλυση εκτίμησης κινδύνου, υπάρχουν στελέχη στα οποία πρέπει να δίνεται μεγαλύτερη βάση (Kagkli, Iliopoulos, Stergiou, Lazaridou, & Nychas, 2009).

4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ 2: ΠΕΙΡΑΜΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΗΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ *LACTOCOCCUS LACTIS* subsp. *LACTIS* ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΣΤΟ ΜΑΡΟΚΙΝΟ ΤΥΡΙ JBEN (ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ (Benkerroum, Oubel, Zahar, Dlia, & Filali-Maltouf, 2003))

Το Jben είναι ένα φρέσκο μαλακό μαροκινό τυρί, το οποίο είναι πολύ δημοφιλές και παρασκευάζεται από αγελαδινό ή κατσικίσιο νωπό γάλα. Η παρασκευή του έχει δύο σημαντικά στάδια, το ένα είναι η πήξη, η οποία βασίζεται στην φυσική χλωρίδα του γάλακτος ή σε καλλιέργεια η οποία χρησιμοποιείται ως εκκινήτης μαζί με την πυτιά, και το άλλο είναι η αποστράγγιση του ορού. Όπως έχει αναφερθεί η μη ελεγχόμενη ζύμωση μπορεί να επιφέρει προβλήματα στο τυρί, το οποίο ενδεχομένως να αποτελέσει φορέα παθογόνων και να κατηγορηθεί για ασθένειες όπως η λιστερίωση. Ο παράγοντας που καθιστά το συγκεκριμένο τυρί να είναι ακόμη πιο επικίνδυνος φορέας για παθογόνα όπως η *L.monocytogenes*, είναι ότι πωλείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, η οποία συνήθως υπερβαίνει τους 25°C. Ακόμη η χρήση μη παστεριωμένου γάλακτος στην παραδοσιακή επεξεργασία μαλακών τυριών, η οποία λαμβάνει χώρα σε χώρες με ανεπτυγμένα συστήματα διασφάλισης ποιότητας, για καλύτερη διατήρηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους, καθιστά τον κίνδυνο ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* κατά την διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης, εντονότερο. Η ανασταλτική δράση των βακτηριοσινών τα οποία παράγονται από γαλακτικά βακτήρια, και η δυνατότητες τους να λειτουργούν ως βιοσυντηρητικά, είναι στην ουσία οι παράγοντες που τα κάνουν ανταγωνιστικά έναντι στην *L.monocytogenes* και μπορούν να παρέχουν έλεγχο στην παρασκευή των μαλακών τυριών. Οι δύο κύριες μέθοδοι βιοσυντήρησης είναι η χρήση προσθέτων στα τρόφιμα τα οποία μπορούν να αναστείλουν τον μικροοργανισμό, όπως η νισίνη και η πεδιοσίνη, και η χρήση καλλιεργειών εκκίνησης που παράγουν βακτηριοσίνες κατά την ζύμωση (Benkerroum, Oubel, Zahar, Dlia, & Filali-Maltouf, 2003).

Στην συγκεκριμένη πειραματική μελέτη ένα στέλεχος *Lactococcus lactis* απομονώθηκε από το μαροκινό τυρί Jben, και ελέγχθηκε πως παράγει μια βακτηριοσίνη η οποία διαφέρει από την νισίνη και έχει έντονη ανασταλτική δράση έναντι της *Listeria monocytogenes*. Το τυρί από το οποίο απομονώθηκε το στέλεχος είχε παρασκευαστεί από νωπό αγελαδινό γάλα το οποίο ζυμώθηκε από το στέλεχος *Lactococcus lactis subsp. lactis*, που είναι και ο παραγωγός οργανισμός της βακτηριοσίνης, και μολύνθηκε με 10^4 και 10^7 cfu/ml. Τα κύτταρα της *L.monocytogenes* παρακολούθηθηκαν καθ' όλη την διάρκεια της παρασκευής και συντήρησης του τυριού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κύτταρα της *L.monocytogenes* μειώθηκαν κατά 2-7 λογαριθμικές μονάδες μετά από 30 ώρες επεξεργασίας του Jben όταν η αρχική ποσότητα εμβολιασμού ήταν 10^7 cfu/ml, ενώ για την ποσότητα 10^4 cfu/ml τα κύτταρα εξαλείφθηκαν πλήρως στις 24 ώρες. Ακόμη η χρήση της καλλιέργειας που παράγει την συγκεκριμένη βακτηριοσίνη, παράτεινε την διάρκεια ζωής του προϊόντος κατά 5 ημέρες. Το συγκεκριμένο φαινόμενο είναι αρκετά σημαντικό, διότι μέσω της συγκεκριμένης βακτηριοσίνης, μπορούμε να αποκτήσουμε καλύτερο έλεγχο για την ανάπτυξη της *L.monocytogenes* στο συγκεκριμένο τυρί (Benkerroum, Oubel, Zahar, Dlia, & Filali-Maltouf, 2003).

Παρασκευή του τυριού Jben για την διεξαγωγή του πειράματος

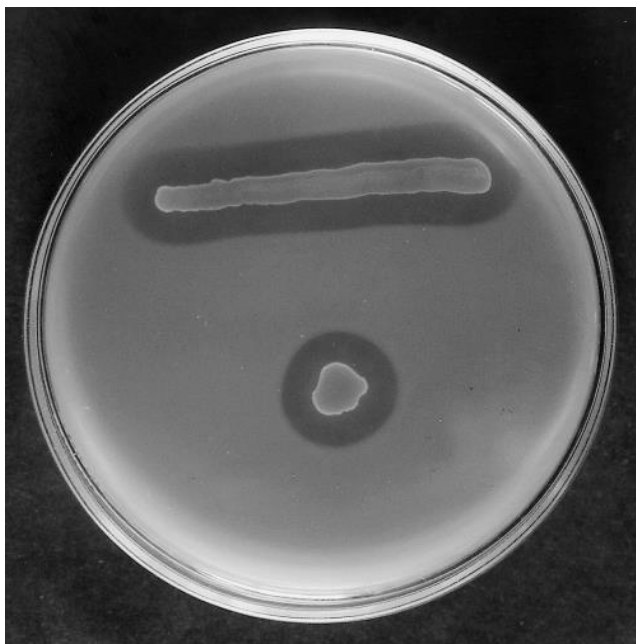
Αρχικά απομονώθηκε ένα στέλεχος του *Lactococcus lactis* το *Lactococcus lactis* CCMM/IAV/BK2 το οποίο παράγει βακτηριοσίνη, και χρησιμοποιήθηκε ως εκκινητής στην παρασκευή του τυριού προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση της παραγωγής βακτηριοσίνης στην *L.monocytogenes*. Χρησιμοποιήθηκε παράλληλα και δείγμα τυριού εμπορίου, με μη παραγωγό *Lactococcus lactis* J, προκειμένου να υπάρχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα. Και για τα δύο δείγματα πραγματοποιήθηκε έλεγχος για απουσία κυττάρων της *Listeria* στο αρχικό στάδιο. Για τις καλλιέργειες εκκίνησης, τα δύο στελέχη (*Lc lactis subsp. lactis* CCMM/IAV/BK2 (Bac+) και J (Bac-) πολλαπλασιάστηκαν σε M17 Broth στους 30°C για 24 ώρες. Σε φιάλες που περιείχαν 90ml αποστειρωμένου γάλακτος, εμβολιάστηκαν με 1% του προεμποτισμένου Bac+ ή Bac-. Το εμβολιασμένο γάλα επώαστηκε για μία νύχτα. Για την παρασκευή των τυριών στη συνέχεια, το γάλα διηθήθηκε με σουρωτήρι για την απομάκρυνση υπολειμμάτων και παστεριώθηκε στους 70°C για 30 λεπτά, ενώ στην συνέχεια

ψύχθηκε στους 30°C. Το παστεριωμένο γάλα χωρίστηκε σε τρεις παρτίδες των 3 λίτρων. Η πρώτη εμβολιάστηκε με την καλλιέργεια εκκίνησης Bac+ (3%), ενώ η δεύτερη και η τρίτη εμβολιάστηκαν με Bac-. Για κάθε μια από τις δοκιμές της πρώτης και της δεύτερης παρτίδας μολύνθηκε με 10 ή 0-5ml καλλιέργειας *L.monocytogenes* έτσι ώστε να προκύψει αρχικό εμβόλιο 10⁷ και 10⁴ cfu/ml, αντίστοιχα. Η τρίτη παρτίδα χρησιμοποιήθηκε ως λευκός προσδιορισμός, και επομένως δεν μολύνθηκε. Μετά τον εμβολιασμό και ανάμιξη, όλες οι δοκιμές παρέμειναν στους 30°C, προκειμένου να προκληθεί οξίνιση. Υπήρχε συχνή παρακολούθηση του pH και όταν η τιμή του έπιασε το 6,2, προστέθηκε αραιωμένη χυμοσίνη 1:19 με κρύο νερό από 0-44ml στο αραιωμένο διάλυμα γάλακτος. Το pH μεταβλήθηκε στο 4,8-5,0, μεταφέρθηκε το τυρόπηγμα σε διάτρητες πλαστικές φόρμες και αφέθηκε να στραγγίξει για 30 ώρες στους 30°C. Το τυρί που προέκυψε χωρίστηκε σε δύο μερίδες των 125g, τοποθετήθηκε σε πλαστικά κουτιά, σκεπάστηκε με αλουμινόχαρτο και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου (22°C) ή σε θερμοκρασία ψύξης (7°C). Για την ανάλυση, και την ανίχνευση των βακτηριακών κυττάρων λαμβάνονταν δείγματα γάλακτος τυροπήγματος και τυριού, και πραγματοποιούταν προσδιορισμός των πληθυσμών της *L.monocytogenes* και των *Lactococcus*. Η καταμέτρηση της *Listeria monocytogenes* έγινε σε άγαρ ASLM μετά από επώαση στους 37 °C για 48-72 ώρες, ενώ των *Lactococcus* σε άγαρ M17 στους 30°C, έπειτα από επώαση 24-48 ωρών (Benkerroum, Oubel, Zahar, Dlia, & Filali-Maltouf, 2003).

Αποτελέσματα του πειράματος

Αρχικά ανιχνεύθηκαν οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία δρουν ανασταλτικά για την *listeria monocytogenes*. Συγκεκριμένα εννέα στελέχη *Lactococcus* απομονώθηκαν από διάφορα προϊόντα, ταυτοποιήθηκαν και παρουσίασαν αντιλιστεριακή δράση. Το ένα από τα στελέχη είχε την κυριότερη ανασταλτική δράση, και παράλληλα ήταν κατάλληλο για χρήση ως καλλιέργεια εκκίνησης για την παρασκευή του τυριού jben, και είχε ονομασία *Lactococcus lactis CCMM/IAV/BK2*. Η ουσία που παρήγαγε το συγκεκριμένο στέλεχος δεν ήταν ούτε υπεροξειδίο του υδρογόνου, ούτε οργανικό οξύ. Η ανασταλτική δράση δεν επηρεάστηκε από την καταλάση και διατηρήθηκε στο εξουδετερωμένο υπερκείμενο υγρό. Η δραστηριότητα της αναστολής ήταν ευαίσθητη στις πρωτεάσες. Το πρότυπο της ευαισθησίας διέφερε από αυτό της νισίνης, καθώς

ήταν ευαίσθητη στην α-κυμοθρυψίνη, ενώ παράλληλα η ανασταλτική ουσία είχε βακτηριοκτόνο τρόπο δράσης. Συνεπώς χαρακτηρίστηκε ως βακτηριοσίνη και συγκρίθηκε με την νισίνη και άλλες βακτηριοσίνες που παράγονται από το γένος *Lactococcus* (Benkerroum, Oubel, Zahar, Dlia, & Filali-Maltouf, 2003).



Εικόνα 8: Επίδειξη του βακτηριοκτόνου τρόπου δράσης του *Lactococcus lactis* CCMM/IAV/BK2, όπως αποδεικνύεται από τον σχηματισμό διαυγούς ζώνης γύρω από τη ράβδωση και την κηλίδα του γαλακτοκοκκικού στελέχους σε προεπωασμένο υπόστρωμα *Listeria monocytogenes*

[J of Applied Microbiology, Volume: 89, Issue: 6, Pages: 960-968, First published: 20 June 2003, DOI: \(10.1046/j.1365-2672.2000.01199.x\)](#)

(Benkerroum, Oubel, Zahar, Dlia, & Filali-Maltouf, 2003)

Η επίδραση της *in situ* παραγωγής βακτηριοσίνης στην ανάπτυξη της *L.monocytogenes*

Καταμετρήθηκε ο πληθυσμός των *lactococcus* σε δείγματα Bac+ και Bac-. Κατά την διαδικασία της ζύμωσης δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των *lactococcus* σε δείγματα που ζυμώθηκαν με καλλιέργειες εκκίνησης Bac+ και Bac-. Αυξήθηκαν φτάνοντας τα $2,8 \times 10^9$ cfu/g μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Αντιθέτως η *L.monocytogenes* ανάλογα το αρχικό επίπεδο μόλυνσης αλλά και ανάλογα τον εκκινητή Bac+ ή Bac-, είχε διαφορετική συμπεριφορά κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Με την χρήση του εκκινητή Bac+ είχαμε ως αποτέλεσμα την μείωση του αριθμού των κυττάρων της *Listeria monocytogenes* κατά 2-7 λογαριθμικές μονάδες στην

υψηλότερη ποσότητα εμβολιασμού (10^7 cfu/ml), ενώ στα δείγματα που είχαν εμβολιαστεί με Bac- ο αριθμός των κυττάρων παρέμεινε πρακτικά σταθερός. Σε δείγματα τα οποία είχαν ζυμωθεί με καλλιέργεια εκκίνησης Bac+ αλλά ήταν εμβολιασμένα με την χαμηλότερη ποσότητα κυττάρων *listeria* (10^4 cfu/ml), το βακτήριο δεν ανιχνεύθηκε έπειτα από 24 ώρες ζύμωσης. Για τα τυριά που παρασκευάστηκαν με καλλιέργεια εκκίνησης Bac- και είχαν εμβολιαστεί με 10^4 cfu/ml παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση του αριθμού των κυττάρων της *L.monocytogenes*, περίπου 0-5 λογαριθμικές μονάδες. Τα αποτελέσματα της επιβίωσης της *Listeria* έδειξαν ότι τα δείγματα με καλλιέργεια Bac+ τα οποία είχαν μολυνθεί με 10^4 cfu/ml δεν ανέπτυξαν κύτταρα *Listeria* σε καμία από τις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης, ενώ στα δείγματα με καλλιέργειες Bac- η ανάπτυξη του παθογόνου ήταν απλά σε μειωμένο επίπεδο. Για την ποσότητα μόλυνσης 10^7 cfu/ml, η *L.monocytogenes* επιβίωσε και δεν εξαλείφθηκε από τα δείγματα έπειτα από 15 με 20 ημέρες αποθήκευσης, τόσο για τα τυριά με Bac+ καλλιέργειες, όσο και για τα τυριά με Bac- καλλιέργειες. Το γεγονός είναι ότι οι βακτηριακοί πληθυσμοί της *listeria* μειώθηκαν εντός των 10 πρώτων ημερών αποθήκευσης σε όλα τα δείγματα, και ο ρυθμός καταστροφής ήταν υψηλότερος στα δείγματα Bac+ από ότι στα δείγματα Bac-, ενώ παρατηρήθηκε ανάπτυξη εκ νέου στα τυριά τα οποία είχαν επιμολυνθεί με 10^7 cfu/ml και είχαν αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου (Benkerroum, Oubel, Zahar, Dlia, & Filali-Maltouf, 2003).

Συμπεράσματα του πειράματος

Η συνολική ενασχόληση για παρατήρηση της συγκεκριμένης μελέτης έγινε από το γεγονός της παραγωγής μιας ανασταλτικής ουσίας, η οποία ενδεχομένως να αποτελούσε μια βακτηριοσίνη. Η συγκεκριμένη ουσία είχε αρκετές παρόμοιες ιδιότητες με την νισίνη, αλλά διάφερε από αυτήν σε κάποια χαρακτηριστικά. Με την μελέτη που πραγματοποιήθηκε αποδείχθηκε ότι η ανασταλτική δράση της συγκεκριμένης ουσίας, η οποία προσδιορίστηκε ως βακτηριοσίνη και παράγεται από τον *Lactococcus lactis subsp. lactis CMM/IAV/BK2*, κατά της *L.monocytogenes* στο τυρί Jben εξαρτάται από το επίπεδο αρχικής επιμόλυνσης. Το παθογόνο καταστράφηκε σε λιγότερο από 24 ώρες σε δείγματα τα οποία είχαν καλλιέργειες εκκίνησης Bac+ τα οποία είχαν αρχικά επιμολυνθεί με 10^4 cfu/ml, ενώ σε δείγματα

που είχαν επιμολυνθεί με υψηλότερο επίπεδο αρχικής επιμόλυνσης 10^7 cfu/ml, επιβίωσε καθ' όλη την διάρκεια της αποθήκευσης. Παρόλο που σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε μείωση των βακτηριακών κυττάρων σε όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν, δεν είναι παρ' όλα αυτά σίγουρο ότι το παθογόνο θα εξαφανιστεί τελικά, διότι μπορεί κάλλιστα να αναζωογονηθεί και να αναπτυχθεί εκ νέου. Το συγκεκριμένο φαινόμενο μπορεί να αιτιολογηθεί λόγω του σχηματισμού ανθεκτικών στελεχών, ή στην αδρανοποίηση της βακτηριοσίνης από τα πρωτεολυτικά ένζυμα. Το γεγονός την ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών της *Listeria* έχει αναφερθεί ότι συμβαίνει για την πεδιοσίνη (PUCCI,, VEDAMUTHU,, KUNKA, , & VANDENBERGH, 1988) και την καρνοσίνη (Mathieu, Michel, Lebrihi, & Lefebvre, 1993). Τα ανθεκτικά στην νισίνη στελέχη εμφανίζονται σε συχνότητες 10^{-6} - 10^{-8} (HARRIS, FLEMING, & KLAENHAMMER, 1991). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων μετά από παρατεταμένη περίοδο επώασης, όταν έχουν χρησιμοποιηθεί υψηλά επίπεδα εμβολιασμού. Ακόμη η ανάπτυξη πρωτεολυτικών προσμίξεων στα δείγματα, και η αύξηση του pH από την 10^η ημέρα αποθήκευσης, μπορεί να ευθύνεται για την εν λόγω αδρανοποίηση της βακτηριοσίνης που παράγεται από τον *Lactococcus lactis* CCMM/IAV/BK2. Το επίπεδο εμβολιασμού που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την μελέτη είναι σχετικά υψηλό σε σχέση με την πραγματική παρουσία των κυττάρων της *Listeria* στα γαλακτοκομικά προϊόντα, όταν έρευνες έχουν δείξει ότι το επίπεδο της *L.monocytogenes* στο νωπό γάλα είναι μικρότερο του 1 cfu/ml. Επομένως η πλήρης εξάλειψη των κυττάρων του παθογόνου, με αρχικό επίπεδο μόλυνσης 10^4 cfu/ml εντός 24 ωρών μπορεί να σχολιαστεί ως μια πολύ καλή απόδοση της βακτηριοσίνης ως προ της βακτηριοκτόνου δράσης της κατά της *Listeria*. Η μείωση των κυττάρων της *listeria* στα δείγματα με καλλιέργειες εκκίνησης Bac- θα μπορούσε να αποδοθεί στην παραγωγή οξέος. Ένα βασικό πλεονέκτημα της χρήσης Bac+ ως καλλιέργεια εκκίνησης, ήταν ότι η παραγωγή της συνδυαστικά με τα υπόλοιπα τελικά προϊόντα της ζύμωσης, αυξάνει την αναστολή της ανάπτυξης της *L.monocytogenes*. Η διαφορά που παρουσιάζεται στην ανάκτηση μεταξύ των Bac+ και Bac- καλλιεργειών εκκίνησης σχετίζεται με την συνεργατική δράση του γαλακτικού οξέος και της βακτηριοσίνης στο παθογόνο. Όταν χρησιμοποιήθηκε ως εκκινητής η καλλιέργεια Bac+, παρατάθηκε η διάρκεια ζωής του τυριού κατά 5 ημέρες και στην παραμονή του στο ψυγείο, αλλά και στην παραμονή

του σε θερμοκρασία δωματίου. Συμπερασματικά λοιπόν, κατανοούμε ότι η παραγωγή βακτηριοσινών *in situ*, παρέχει προστασία στο τρόφιμο, έναντι του παθογόνου *L.monocytogenes*, ενώ είναι πιθανό και το να αποτρέψει την μόλυνση των τυριών *1ben* μετά το στάδιο της επεξεργασίας, και ειδικά κατά τις πρώτες μέρες αποθήκευσης. Η συγκεκριμένη διαπίστωση μπορεί να ωφελήσει στην παρασκευή ελάχιστα επεξεργασμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, ή προϊόντων που παρασκευάζονται με νωπό γάλα. Μπορούν, δηλαδή, τέτοιου τύπου βακτηριοσίνες να χρησιμοποιηθούν σαν πρόσθετος ανασταλτικός παράγοντας μαζί με την οξίνιση, την ψύξη κ.α. (Benkerroum, Oubel, Zahar, Dlia, & Filali-Maltouf, 2003).

4.5 ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ 3: ΠΕΙΡΑΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ (ΒΙΟΦΙΛΜ) ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΧΩΡΙΣ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΣΤΑ ΜΑΛΑΚΑ ΤΥΡΙΑ (ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ (Speranza, Sinigaglia, & Corbo, 2009))

Ο σχηματισμός και η ύπαρξη βιοφίλμ έχει αναλυθεί και στο κεφάλαιο της *Listeria monocytogenes* λόγω της ικανότητας της, να σχηματίζει αυτή την πιο ανθεκτική μορφή μεμβράνης προκειμένου να ανθίσταται σε μη ευνοϊκά περιβάλλοντα. Το βιοφίλμ είναι στην ουσία ένα πολυκυτταρικό στρώμα προσκολλημένων βακτηρίων, το οποίο περιβάλλεται από μια μήτρα εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών, και του οποίου η ανάπτυξη καθώς και η ικανότητα επιβίωσης πλεονεκτεί σε σχέση με αυτή των ελεύθερων πλαγκτονικών κυττάρων. Έχει, αποδεδειγμένα, αυξημένη αντοχή σε αντιμικροβιακές ενώσεις και ανθεκτικότητα στην θερμική καταπόνηση. Ο σχηματισμός βιοφίλμ αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για την βιομηχανία, διότι τα βακτήρια είναι σε θέση να προσκολληθούν πάνω σε επιφάνειες εξοπλισμού ο οποίος χρησιμοποιείται για τον χειρισμό και την επεξεργασία των τροφίμων και να επιβιώνουν μετά από καθαρισμό και απολύμανση, αποτελώντας μια χρόνια πηγή μικροβιακής μόλυνσης, η οποία ενδέχεται να θέσει σε κίνδυνο την ποιότητα των τροφίμων, από άποψη ασφάλειας, και να προκαλέσει προβλήματα υγείας των καταναλωτών. Η χρήση των μικροβιακών βιοφίλμ ως μέσο για την εξασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Υπό το πρίσμα της επικινδυνότητας του παθογόνου *Listeria monocytogenes* καθώς και της ικανότητας

του να σχηματίζει βιοφίλμ, και με την γνώση της βακτηριοκτόνου δράσης των βακτηριοσινών των οξυγαλακτικών βακτηρίων, είναι ενδιαφέρον να μελετηθεί ο σχηματισμός βιομεμβρανών από οξυγαλακτικά βακτήρια στα οποία δεν είχε ενσωματωθεί καλλιέργεια εκκίνησης (Non-starter lactic acid bacteria – NSLAB) ως ωφέλιμες καλλιέργειες για την καθυστέρηση της ανάπτυξης της *L.monocytogenes* σε μαλακά τυριά (Speranza, Sinigaglia, & Corbo, 2009).

Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα στελέχη NSLAB τα οποία ήταν τα εξής, *Lactobacillus plantarum* DSM1055, *Lactobacillus casei* DSM20011, *Lactobacillus curvatus* DSM20019 και *Lactobacillus paracasei* DSM20207. Τα στελέχη ενσωματώθηκαν στους 20°C σε deMan Rogosa Sharpe broth μαζί με 30% γλυκερόλη. Αφέθηκαν σε επώαση 2 φορές σε MRS broth στους 30°C για 24 ώρες. Το στέλεχος της *L.monocytogenes* που χρησιμοποιήθηκε ήταν από ένα Ινστιτούτο Ζωοπροφύλαξης της Απουλίας και της Λουκανίας στην Ιταλία, και απομονώθηκε από τυρί το οποίο είχε συσχετιστεί με αρκετές τροφικές δηλητηριάσεις στην περιοχή της Απουλίας. Τα εμβόλια για τα πειράματα παρασκευάστηκαν με φυγοκέντρηση στα 3000g για 15 λεπτά στους 4°C. Ακόμη παρασκευάστηκε με την ίδια διαδικασία και ένα κοκτέιλ που περιλάμβανε και τα τέσσερα στελέχη *Lactobacillus* ακολουθώντας την ίδια διαδικασία. Στο τέλος της φυγοκέντρωσης, τα συσσωματώματα που ελήφθησαν συστέλλονται σε αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα με θερμοκρασία 4°C, και γίνονται αραιώσεις κατά σειρά, μέχρι να ληφθούν 10^4 cfu/ml για κάθε μικροοργανισμό και για το κοκτέιλ NSLAB (Speranza, Sinigaglia, & Corbo, 2009).

Σχηματισμός βιοφίλμ σε τσιπ από ανοξείδωτο χάλυβα και απαρίθμηση των βακτηρίων του βιοφίλμ

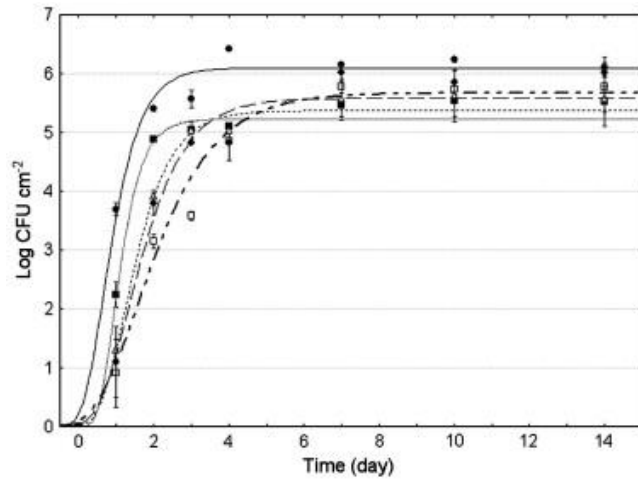
Κομμάτια από ανοξείδωτο χάλυβα τοποθετήθηκαν κάθετα σε βάζα που περιείχαν 20ml αποστειρωμένου αποβουτυρωμένου γάλακτος, και αρχικό εμβόλιο 10^2 cfu/ml. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για κάθε στέλεχος καθώς και για το κοκτέιλ NSLAB. Τα βάζα επώαστηκαν στους 30°C για 14 ημέρες. Η καταμέτρηση των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε την 1^η, 2^η, 3^η, 4^η, 7^η, 10^η και 14^η ημέρα (Speranza, Sinigaglia, & Corbo, 2009).

Παρασκευή του τυριού του πειράματος

Παρασκευάστηκαν μαλακά τυριά μικρού μεγέθους, χρησιμοποιώντας παστεριωμένο, πλήρες και ομογενοποιημένο γάλα. Τα τυριά που παρασκευάστηκαν εμβολιάστηκαν με τα στελέχη της *L.monocytogenes* (10^2 cfu/ml), τοποθετήθηκαν σε σακούλες με συγκεκριμένη διαπερατότητα, και πραγματοποιήθηκε συσκευασία με αέρα και υπό κενό. Εκτός από την παρασκευή των πειραματικών τυριών (ενσωματώθηκαν τα NSLAB βιοφίλμ), παρασκευάστηκαν και τυριά ελέγχου (χωρίς προσθήκη NSLAB βιοφίλμ) προκειμένου να μπορούν να γίνουν οι απαραίτητες συγκρίσεις. Αποθηκεύτηκαν στους 4°C για 28 ημέρες, ενώ πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του pH και της a_w τις ημέρες 0, 3^η, 7^η, 10^η, 14^η, 21^η, και 28^η. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν 2 φορές (Speranza, Sinigaglia, & Corbo, 2009).

Αποτελέσματα του πειράματος

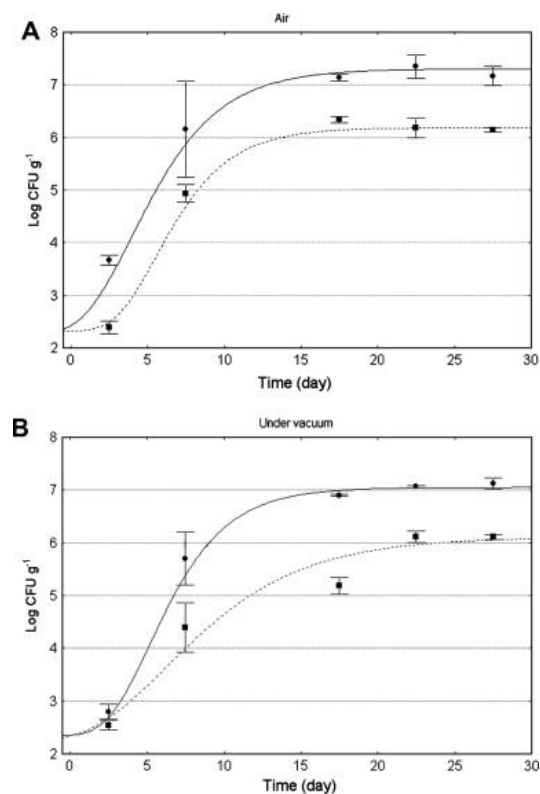
Από την αξιολόγηση του σχηματισμού βιοφίλμ με NSLAB στελέχη που καλλιεργήθηκαν έδειξαν ότι τα εξεταζόμενα στελέχη *Lactobacillus* είχαν την ικανότητα να προσκολλώνται σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα και να σχηματίζουν βιοφίλμ. Βέβαια οι ποσότητες βιοφίλμ που παρήχθησαν από τα εμβολιασμένα με κοκτέιλ στελεχών τυριά, ήταν μεγαλύτερες από ότι τα απομονωμένα στελέχη που εμβολιάστηκαν. Όπως φαίνεται και στο σχήμα ο σχηματισμός βιοφίλμ από τα NSLAB κατά την ανάπτυξη στους 30°C , την υψηλότερη παραγωγή βιοϋμενίου είχαν το κοκτέιλ NSLAB ($6,10 \pm 0,09 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$), έπειτα ο *L.casei* ($5,82 \pm 0,16 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$), στην συνέχεια έχουμε τον *L.plantarum* ($5,73 \pm 0,14 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$) και τελευταίους έχουμε τους *L.paracasei* ($5,49 \pm 0,09 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$) και *L.curvatus* ($5,37 \pm 0,08 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$) (Speranza, Sinigaglia, & Corbo, 2009).



Εικόνα 9 : Σχηματισμός βιοφίλμ σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα από οξυγαλακτικά βακτήρια που δεν διαθέτουν καλλιέργειες εκκίνησης (NSLAB) κατά τη διάρκεια ανάπτυξης στους 30 C σε Skim Milk Medium (SM). □ *L. plantarum*, ◇ *L. casei*, ▪ *L. curvatus*, Δ *L. paracasei*, ● κοκτέιλ. (Speranza, Sinigaglia, & Corbo, 2009)

Ακόμη στον εμβολιασμό του κοκτέιλ των στελεχών NSLAB το βιοφίλμ σχηματίστηκε ταχύτερα, ενώ έφτασε στην στάσιμη φάση ανάπτυξης μέσα σε 2-3 ημέρες, χωρίς να αναπτύσσεται περαιτέρω με την πάροδο του χρόνου. Το 2001 από πείραμα που διεξήχθη από τους (Somers, Johnson, & Wong, 2001), αποδείχθηκε ότι μπορούν να σχηματίζονται βιοφίλμ κατά την διάρκεια της τυροκόμησης όταν το γάλα το οποίο χρησιμοποιείται για την παρασκευή είναι εμβολιασμένο με το στέλεχος *L. curvatus*. Η συγκεκριμένη βέβαια μελέτη δεν παραθέτει δεδομένα για το κατά πόσο μπορεί να είναι ωφέλιμη η χρήση NSLAB για τον έλεγχο της ασφάλειας του τυριού μέσω της ανταγωνιστικότητας τους ως προς την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*. Για να μπορέσει να δοθεί μια προσέγγιση αυτής της εκδοχής, για το αν δηλαδή, τα βιοφίλμ βακτηρίων που είναι προσκολλημένα σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα θα μπορούσαν να περιορίσουν την δράση της *L. monocytogenes*, παρασκευάστηκαν τυριά που περιείχαν τσίπ ανοξειδωτου χάλυβα στα οποία είχε σχηματιστεί βιοφίλμ 7 ημερών, με ποσότητα κυττάρων $6,25 \pm 0,11 \log \text{ cfu/cm}^2$ και εμβολιάστηκαν με χαμηλή συγκέντρωση κυττάρων *L. monocytogenes* $\sim 2 \log \text{ cfu/g}$. Κατά την διάρκεια της αποθήκευσης πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση, για παρακολούθηση του βιώσιμου φορτίου *Lactobacillus* και του βιώσιμου φορτίου της *L. monocytogenes*, καθώς μετρήθηκαν και το pH και η a_w . Το pH ήταν περίπου στο 6,5 για τα πειραματικά

τυριά και για τα δείγματα ελέγχου, και το συγκεκριμένο φαινόμενο δεν μεταβλήθηκε κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Το γεγονός αυτό δεν ωφελεί κατ' ουσίαν διότι η ανάπτυξη της *L.monocytogenes* δεν μπορεί να περιοριστεί από το συγκεκριμένο εύρος pH, δεδομένου ότι το συγκεκριμένο παθογόνο επιβιώνει και αναπτύσσεται σε μαλακά τυριά σε τιμές pH πάνω από 5,5. Όσον αφορά την a_w οι τιμές της ήταν περίπου στο 0,99 κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Για τα αποτελέσματα της ενσωμάτωσης των NSLAB στο υπόστρωμα, επιβεβαιώθηκε ότι τα βιοφίλμ των μεσόφιλων *Lactobacillus*, που υπήρχαν στην επιφάνεια του δοχείου ήταν σε θέση να αποκολληθούν κατά της διαδικασία της τυροκόμησης και να μολύνουν το τυρί. Για τα τυριά που συσκευάστηκαν στον αέρα ο αρχικός αριθμός κυττάρων NSLAB ήταν $5,53 \pm 0,19 \log \text{ cfu/g}$, ενώ τα κύτταρα των δειγμάτων ελέγχου ήταν τα $3,25 \pm 0,20 \log \text{ cfu/g}$. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του μέγιστου φορτίου κυττάρων που μπορεί να υπάρξει στην στάσιμη φάση. Στην εικόνα 3 φαίνεται η καμπύλη που είχε η ανάπτυξη της *L.monocytogenes* στην συσκευασία στον αέρα και υπό κενό, και παρατηρείται ότι μπόρεσε να πολλαπλασιαστεί σε όλα τα δείγματα, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο λόγω της ικανότητας ανάπτυξης της στα μαλακά τυριά σε αποθήκευση στο ψυγείο.



Εικόνα 10: Καμπύλες ανάπτυξης για το *L. monocytogenes* που εμβολιάστηκε σε πειραματικά τυριά εμβολιασμένα με NSLAB και τυριά μη εμβολιασμένα, συσκευασμένα στον αέρα (Α) και υπό κενό (Β). ▪ Πειραματικό τυρί- • τυρί ελέγχου (Speranza, Sinigaglia, & Corbo, 2009).

Ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις συσκευασίας η μέγιστη ποσότητα κυττάρων που ανιχνεύθηκε στην στατική φάση των τυριών που είχαν εμβολιαστεί με NSLAB ήταν χαμηλότερη από ότι στα τυριά ελέγχου, συγκεκριμένα για τα τυριά με NSLAB ήταν περίπου 6 log cfu/g ενώ στα τυριά ελέγχου ήταν 7 log cfu/g. Ο ρυθμός ανάπτυξης του παθογόνου παίζει καθοριστικό ρόλο για τον υπολογισμό του χρόνου του υγειονομικού κινδύνου (SRT). Για τα τυριά υπό κενό που ήταν εμβολιασμένα με NSLAB ο SRT ήταν 6,94 ημέρες, σε αντίθεση με τα τυριά ελέγχου τα οποία θα αποτελούσαν σημαντικό υγειονομικό κίνδυνο, λόγω σημαντικής αύξησης των κυττάρων της *L.monocytogenes* σε μικρό χρονικό διάστημα. Σημαντική διαφορά εντοπίστηκε και μεταξύ των δειγμάτων που είχαν συσκευαστεί στον αέρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα βιοφίλμ NSLAB έχουν την ικανότητα να μειώσουν την ανάπτυξη της *L.monocytogenes* σε μαλακά τυριά (Speranza, Sinigaglia, & Corbo, 2009).

Συμπεράσματα του πειράματος

Από τα αποτελέσματα του πειράματος συμπεραίνουμε ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια στα οποία δεν έχει χρησιμοποιηθεί καλλιέργεια εκκίνησης, και συγκεκριμένα ο *Lactobacillus spp.* είναι σε θέση να προσκολλάται σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα και να σχηματίζει βιοφίλμ, ενώ αν υπάρχει και ταυτόχρονη παρουσία τους στο μέσο. Η δεύτερη πειραματική φάση μας έδειξε ότι τα βιοφίλμ θα μπορούσαν να γίνουν ωφέλιμα ως τρόπος καθυστέρησης για την ανάπτυξη των κυττάρων της *L.monocytogenes* στα μαλακά τυριά. Είναι σημαντική η απόδειξη του ότι δεν αποτελούν όλα τα είδη βιομεμβρανών πρόβλημα για την ασφάλεια του τροφίμου, αλλά πιο συγκεκριμένα τα βιοφίλμ που σχηματίζονται από οξυγαλακτικές καλλιέργειες στις οποίες δεν έχει προστεθεί καλλιέργεια εκκίνησης, μας δίνουν την προοπτική πιθανής μεθόδου για την εξασφάλιση της ασφάλειας του τυριού. Ωστόσο, απαιτούνται πολλά πειράματα και αναλύσεις προκειμένου να γίνει η συγκεκριμένη μελέτη αξιοποιήσιμη και να μπορούν τα NSLAB να προσκολληθούν σε επιφάνειες,

όπως υλικά συσκευασίας, και να μπορούν να ωφελήσουν το τρόφιμο (Speranza, Sinigaglia, & Corbo, 2009).

4.6 ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ 4: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΑ ΙΤΑΛΙΚΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ: ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΕΝΑΝΤΙ ΣΤΗΝ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ ΣΤΑ ΜΑΛΑΚΑ ΤΥΡΙΑ (ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ (Panebianco, και συν., 2020))

Η παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην οικονομία της Ιταλίας, και η παραγωγή της χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποσότητα και ποικιλομορφία σε είδη τυριών. Για την παρασκευή αυτής της μεγάλης γκάμας τυριών, χρησιμοποιείται πληθώρα διαφορετικών στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία προσδίδουν στα προϊόντα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, ξεχωριστά για το κάθε ένα. Έχει αναφερθεί επανειλημμένα σε αυτή την εργασία ότι τα τυριά με παστεριωμένο γάλα δείχνουν να είναι περισσότερο εκτεθειμένα στην ανάπτυξη της *L.monocytogenes*, λόγω της απουσίας του μικροβιώματος του γάλακτος το οποίο μπορεί να επιφέρει ανταγωνιστική δράση στο παθογόνο. Ωστόσο, δεν έχουμε μεγάλες διαφορές στην παρουσία της *L.monocytogenes* μεταξύ των τυριών τα οποία έχουν παρασκευαστεί από παστεριωμένο γάλα και αυτών που έχουν παρασκευαστεί από μη παστεριωμένο γάλα. Η ανταγωνιστικότητα που επικρατεί ανάμεσα σε συμπληρωματικές καλλιέργειες και της *L.monocytogenes* για τα θρεπτικά υλικά, η μείωση του pH από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, καθώς και η ύπαρξη βακτηριοσινών είναι παράγοντες που δρουν ανασταλτικά προ το παθογόνο. Ενώ είναι αποδεδειγμένο ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια γαλακτοκομικής προέλευσης έχουν αντιλειτουργική δράση κατά την διάρκεια της παραγωγής αλλά και κατά την αποθήκευση των προϊόντων. Η επιστήμη της προγνωστικής μικροβιολογίας είναι πολύ σημαντική για την κατανόηση της δυναμικής των μικροβίων στα τρόφιμα, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα μοντέλα για την πρόβλεψη της αλληλεπίδρασης των οξυγαλακτικών βακτηρίων και της *L.monocytogenes*, ένα παράδειγμα είναι η “επίδραση Jameson”, η οποία αξιοποιεί τον ανταγωνισμό για τα θρεπτικά συστατικά και την παραγωγή ανασταλτικών ενώσεων από τα οξυγαλακτικά για να προβλέψει την διακοπή ή μη της ανάπτυξης ενός βακτηριακού πληθυσμού όταν ο κυρίαρχος

πληθυσμός φτάσει στην στατική φάση. Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιείται ευρέως για την πρόβλεψη των μικροβιακών αλληλεπιδράσεων στο τυρί. Μια άλλη προσέγγιση αποτελούν οι εξισώσεις Lotka-Volterra που μοντελοποιούν έναν εξειδικευμένο ανταγωνισμό μεταξύ δύο πληθυσμών ανάλογα με την ανάπτυξή του, περιλαμβάνοντας έναν όρο για την μείωση του ρυθμού ανάπτυξης ενός βακτηριακού πληθυσμού σε σύγκριση με την πυκνότητα του πληθυσμού ανταγωνιστικών βακτηρίων (Panebianco, και συν., 2020).

Πορεία πειράματος

Αρχικά απομονώθηκαν οξυγαλακτικά βακτήρια από τα παραδοσιακά τυριά της Καλάμπρια. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την ζυμωτική ικανότητα των βακτηρίων καθώς και για την πρωτεολυτική τους δραστηριότητα. Ακόμη οι καλλιέργειες οξυγαλακτικών που χαρακτηρίστηκαν ως μη αεριοπαραγωγικές και πρωτεολυτικές δοκιμάστηκαν *in vitro* έναντι της *L.monocytogenes*, και ταξινομήθηκαν βάση την υψηλότερη ανταγωνιστικότητα απέναντι στη *Listeria*. Πραγματοποιήθηκαν τρεις δοκιμές σε μαλακό τυρί και οι αλληλεπιδράσεις των LAB και της *L.monocytogenes* μελετήθηκαν με την μέθοδο μοντελοποίησης που στηρίζεται στις εξισώσεις Lotka-Volterra. Έγινε προεπιλογή 115 στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία απομονώθηκαν από διάφορα τυριά της Καλάμπρια, και ταυτοποιήθηκαν. Τα στελέχη εξετάστηκαν για την χρώση κατά Gram, την αντίδραση καταλάσης, την ανάπτυξη σε εκλεκτικά μέσα και τα βιοχημικά τους χαρακτηριστικά. Ακόμη η επιλογή έγινε και με βάση της ζυμωτικής και πρωτεολυτικής δραστηριότητας των στελεχών. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία παρουσίασαν πρωτεολυτική δραστηριότητα επιλέχθηκαν για το πείραμα (Panebianco, και συν., 2020). Από τα στελέχη της *L.monocytogenes* επιλέχθηκαν οκτώ για την πειραματική ανάλυση, το ATCC (American Type Culture Collection) 7644, το ATCC 19112, το ATCC 13932, το ID (Identification Number) από καπνιστό σολομό, το ID 9 από φρέσκο σολομό, το ID 13 απομονώθηκε από το περιβάλλον, το ID 212 από ρολά τομάτας, που αποτελούν και ένα έτοιμο προς κατανάλωση προϊόν και το ID 222 από γεμιστές αγκινάρες το οποίο αποτελεί ένα επίσης έτοιμο προς κατανάλωση προϊόν. Για την αποπεράτωση του πειράματος πραγματοποιήθηκε αναγνώριση του DNA των οξυγαλακτικών βακτηρίων

τα οποία παρουσίασαν την καλύτερη δραστικότητα κατά της *Listeria*. Αξιολογήθηκε η ικανότητα οξίνισης των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Panebianco, και συν., 2020).

Προκυμμένου να παρατηρηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των οξυγαλακτικών βακτηρίων και της *L.monocytogenes* σε μαλακό τυρί, παρασκευάστηκε μαλακό τυρί σε εργαστήριο της Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου της Messina στην Ιταλία. Το αγελαδινό γάλα παστεριώθηκε στους 72°C για 15 δευτερόλεπτα. Στην συνέχεια η θερμοκρασία του κυμάνθηκε στους 45-50°C και διάλυμα κιτρικού οξέος χρησιμοποιήθηκε προκυμμένου να επιτευχθεί μείωση του pH στο 5,4-5,5. Στην συνέχεια προστέθηκε αραιωμένη πυτιά (1:10), έπειτα από 45 λεπτά είχε επιτευχθεί πλήρης πήξη του τυροπήγματος, το οποίο κόπηκε στραγγίστηκε και προστέθηκε NaCl (2% w/w) (Panebianco, et al., 2020).

Για την ανάμιξη των οξυγαλακτικών με την *L.monocytogenes* χρησιμοποιήθηκαν τρία στελέχη οξυγαλακτικών και τρία στελέχη της *L.monocytogenes*. Στα οξυγαλακτικά ανήκαν τα στελέχη *Lactobacillus sakei* (LAB29), ομάδα *Lactobacillus plantarum* (LAB31) και *Lactobacillus plantarum* (LAB76), ενώ στα στελέχη της *Listeria* ανήκαν τα στελέχη ATCC 7644, ATCC 13932, ATCC 19112. Τα στελέχη των LAB και της *L.monocytogenes* μεταφέρθηκαν από την κατάψυξη (-80°C) σε υπόστρωμα Tryptic Soy Yeast Extract broth και MRS broth και επώαστηκαν στους 25°C για μια νύχτα (Panebianco, και συν., 2020).

Διαδικασία εμβολιασμού

Πραγματοποιήθηκαν τρεις δοκιμές πρόκλησης ανταγωνιστικότητας οι οποίες κωδικοποιήθηκαν ως CT1 (εμβολιάστηκε με LAB31 και *L.monocytogenes*), CT2 (εμβολιάστηκε με LAB76 και *L.monocytogenes*) και CT3 (εμβολιάστηκε με LAB 29 και *L.monocytogenes*). Ο εμβολιασμός του τυριού έγινε με 1% w/w κοκτέιλ όλων των στελεχών της *L.monocytogenes* σε ίση αναλογία και οξυγαλακτικά βακτήρια, σε ποσότητες ώστε να προκύψει συγκέντρωση 3 log cfu/g για τα στελέχη της *L.monocytogenes* και 5 log cfu/g για τα οξυγαλακτικά βακτήρια, προκυμμένου να αποτελεί μια αντιπροσωπευτική αναπαράσταση της βιοχημικής σύστασης του τυριού στο οποίο φυσιολογικά κυριαρχούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Τα τυριά που είχαν παρασκευαστεί εμβολιάστηκαν πρώτα με τα στελέχη της *listeria* και χωρίστηκαν σε

τέσσερις παρτίδες, οι τρεις από αυτές εμβολιάστηκαν με τα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που είχαν επιλεγεί, ενώ η τέταρτη αποτέλεσε το τυφλό δείγμα, ώστε να πραγματοποιηθεί σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων. Τέλος τα τυριά υποδιαιρέθηκαν σε 50g και επώαστηκαν στους 15°C. Για τις μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις γίνονταν δύο αναλύσεις για κάθε 24 ώρες επώασης, μέχρι να επέλθει η *L.monocytogenes* στην στατική φάση (Panebianco, και συν., 2020).

Προγνωστικό Μοντέλο Lotka-Volterra

Για την πρόγνωση των αποτελεσμάτων της δραστηριότητας των LAB στην *L.monocytogenes* δημιουργήθηκε το ακόλουθο προγνωστικό μοντέλο το οποίο βασίστηκε στις εξισώσεις Lotka-Volterra.

$$\frac{dN_{L.mon.}}{dt} = \mu_{maxL.mon.} \cdot N_{L.mon.} \cdot \frac{Q_{L.mon.}}{1+Q_{L.mon.}} \cdot \left(1 - \frac{N_{L.mon.} + \beta_{L.mon./LAB} \cdot N_{LAB}}{N_{maxL.mon.}}\right) \quad (1a)$$

$$\frac{dQ_{L.mon.}}{dt} = \mu_{maxL.mon.} \cdot Q_{L.mon.} \quad (1b)$$

$$\frac{dN_{LAB}}{dt} = \mu_{maxLAB} \cdot N_{LAB} \cdot \frac{Q_{LAB}}{1+Q_{LAB}} \cdot \left(1 - \frac{N_{LAB} + \beta_{LAB/L.mon.} \cdot N_{L.mon.}}{N_{maxLAB}}\right) \quad (2a)$$

$$\frac{dQ_{LAB}}{dt} = \mu_{maxLAB} \cdot Q_{LAB} \quad (2b)$$

Όπου, $N_{L.mon.}$: η συγκέντρωση της *L.monocytogenes* σε log cfu/g σε χρόνο t

N_{LAB} : η συγκέντρωση των LAB σε log cfu/g σε χρόνο t

$\mu_{maxL.mon.}$ και μ_{maxLAB} : οι μέγιστοι αριθμοί ανάπτυξης τους ανά ώρα

$N_{maxL.mon.}$ και N_{maxLAB} : οι μέγιστες πυκνότητες των δύο πληθυσμών σε log cfu/g

$\beta_{L.mon./LAB}$ και $\beta_{LAB/L.mon.}$: παράμετροι ειδικού ανταγωνισμού των LAB προς την *L.monocytogenes*

$Q_{L.mon.}$ και Q_{LAB} : φυσιολογική κατάσταση των δύο πληθυσμών

(Giuffrida, Valenti, Ziino, Spagnolo, & Panebianco, 2008).

Αποτελέσματα πειράματος

Μεταξύ των 7 διαφορετικών στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία είχαν και τα 7 παρουσιάσει πολύ υψηλή δραστικότητα κατά της *listeria* σε δοκιμές που είχαν γίνει *in vitro*, τρεις επιλέχθηκαν για την τελική τους ενσωμάτωση και παρατήρηση στην διαδικασία του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα το στέλεχος που παρουσίασε τη μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι της *listeria* σε δοκιμές *in vitro* ήταν το LAB 31 της ομάδας *Lactobacillus plantarum* και απομονώθηκε από τυρί Pecorino del Poro. Το στέλεχος LAB 76, απομονώθηκε από καπνιστή ρικότα και δοκιμάστηκε σε μαλακό τυρί έτσι ώστε να αξιολογηθεί το αν θα μπορούσαν να υπάρχουν διαφορές στην ανταγωνιστικότητα κατά της *L.monocytogenes* μεταξύ στελεχών που υπάρχουν στην ίδια ομάδα αλλά απομονώθηκαν από διαφορετικά προϊόντα. Ακόμη το LAB 29 που ταυτοποιήθηκε ως *Lactobacillus sakei* απομονώθηκε από το τυρί Pecorino del Poro, προκυμμένου να ελεγχθεί αν στελέχη που ανήκουν σε διαφορετικά είδη αλλά έχουν απομονωθεί από το ίδιο τυρί έχουν διαφορετική ανταγωνιστική δράση έναντι στην *L.monocytogenes*. Στις τρεις δοκιμές η *L.monocytogenes* έφτασε σε συγκεντρώσεις στην δοκιμή CT1: $5,6 \pm 0,3\%$ log cfu/g, στην δοκιμή CT2: $6,0 \pm 0,3\%$ log cfu/g, και στην CT3: $5,8 \pm 0,0$ log cfu/g, έπειτα από επώαση 137,5 ώρες. Στα δείγματα ελέγχου η *L.monocytogenes* έφτασε στις τιμές συγκέντρωσης $6,5 \pm 0,1\%$ log cfu/g στον ίδιο χρόνο επώασης. Στο τέλος της αποθήκευσης παρατηρήθηκε αύξηση του γαλακτικού οξέος σε όλα τα δείγματα η οποία ανερχόταν για το CT1: $0,26 \pm 0,0$ mg/g, για το CT2: $0,52 \pm 0,10$ mg/g, και για το CT3: $0,28 \pm 0,04$ mg/g. Σημαντική διαφορά παρατηρείται μεταξύ CT2 και δειγμάτων ελέγχου. Τα επίπεδα του οξικού οξέος παρέμειναν σχετικά σταθερά σε όλες τις δοκιμές. Όσον αφορά το pH υπήρξε μια μικρή μείωση σε σύγκριση με την αρχική τιμή σε όλες τις δοκιμές μετά το πέρας της αποθήκευσης, με ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων CT1 και δειγμάτων ελέγχου. Για την a_w δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές γενικά, με εξαίρεση τα δείγματα CT2 και δειγμάτων ελέγχου. Οι αρχικές τιμές των Q για τους δύο πληθυσμούς ήταν 0,05 για την *L.monocytogenes* και 0,03 για τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Οι τιμές των N_{max} ήταν $6,51$ log cfu/g για την *L.monocytogenes* και $7,83$ log cfu/g για τα LAB. Στα δείγματα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν προκυμμένου να έχουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα τα οξυγαλακτικά είχαν αναπτυχθεί σε συγκέντρωση $4,3$ log cfu/g αλλά δεν παρατηρήθηκε αναστολή της *L.monocytogenes*. Στο CT1, η ανάπτυξη της *L.monocytogenes* διακόπηκε όταν ο πληθυσμός του LAB 31 απέκτησε την μέγιστη

πυκνότητά του. Αντίστοιχη συμπεριφορά είχαν και τα στελέχη CT2 και CT3 με τα στελέχη LAB 76 και LAB29 αντίστοιχα (Panebianco, και συν., 2020).

Συμπεράσματα του πειράματος

Η λογική της προσθήκης συμπληρωματικών καλλιέργειών για την παραγωγή τυριών θα πρέπει να λαμβάνει υπόψιν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά που θα προκύψουν στο τελικό προϊόν και να χρησιμοποιείται καταλλήλως. Σε ένα γενικότερο πλαίσιο κάποια χαρακτηριστικά είναι πάντα επιθυμητά, όπως για παράδειγμα η χαμηλή παραγωγή CO₂ για την αποφυγή αερίων τα οποία υποβαθμίζουν το προϊόν. Ακόμη οι συμπληρωματικές καλλιέργειες είναι ωφέλιμο να χαρακτηρίζονται από χαμηλή ικανότητα οξίνισης, κυρίως κατά τα πρώτα στάδια της τυροκόμησης, προκειμένου να αποφεύγεται η υπερβολική οξίνιση του προϊόντος, με δεδομένη την αναπόφευκτη οξίνιση που επιφέρουν οι καλλιέργειες εκκίνησης. Αντιθέτως, η ισχυρή πρωτεολυτική δραστηριότητα είναι επιθυμητή κατά την ωρίμανση πολλών ζυμώμενων γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν για την πειραματική μελέτη, πληρούσαν όλες τις παραπάνω προδιαγραφές και ήταν κατάλληλα για χρήση ως συμπληρωματικές καλλιέργειες. Το αποτέλεσμα του πειράματος έδειξε ότι η αναστολή της ανάπτυξης της *L.monocytogenes* μπορεί να προκληθεί από διάφορα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων. Τα επιλεγμένα στελέχη οξυγαλακτικών άσκησαν σχετικά μικρή επίδραση στην ανάπτυξη της *L.monocytogenes* σε υπόστρωμα μαλακού τυριού, σε περιβάλλον ψυχρής αποθήκευσης, με την συγκέντρωση της να μεταβάλλεται κατά 0,5 log cfu/g για το στέλεχος CT2, το οποίο ήρθε σε ανταγωνιστικότητα με το LAB 76, κατά 0,7 log cfu/g για το στέλεχος CT3, το οποίο ήρθε σε ανταγωνιστικότητα με το LAB 29 και τέλος είχαμε πτώση κατά 1 log cfu/g για το στέλεχος CT1, το οποίο ήρθε σε ανταγωνιστικότητα με το LAB 31. Σημαντικό παράγοντα αναστολής αποτελεί και η παραγωγή οργανικών οξέων η οποία, επιφέρει πτώση της τιμής του pH στα τρόφιμα. Στην προκύπτουσα περίπτωση η παραγωγή των οργανικών οξέων από τα οξυγαλακτικά ήταν σε χαμηλά επίπεδα, επομένως η παρατηρούμενη αναστολή δεν προκλήθηκε από τον συγκεκριμένο παράγοντα, ενώ ενδεχόμενη αιτία θα μπορούσε να είναι η παραγωγή βακτηριοσινών από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, αν αναλογιστούμε ότι τα στελέχη *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus sakei* τα

οποία χρησιμοποιήθηκαν, παράγουν βακτηριοσίνες οι οποίες είναι δραστικές έναντι της *L.monocytogenes*. Το προσεγγιστικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε βάση των εξισώσεων Lotka-Volterra λαμβάνει υπόψιν την πολυπλοκότητα του υποστρώματος του τυριού, τις περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της *L.monocytogenes* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, φαίνεται ο ανταγωνισμός του ενός είδους έναντι στο άλλο να σχετίζεται με την αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού που έχει το κάθε ένα. Συμπερασματικά προκύπτει ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια που απομονώθηκαν από τα παραδοσιακά τυριά στην Καλάβρια της Ιταλίας μείωσαν την ανάπτυξη της *L.monocytogenes* σε δοκιμασία *in vitro* σε μαλακό τυρί και είναι ικανές να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματικές καλλιέργειες στην παραγωγή τυριών, με σκοπό τον καλύτερο έλεγχο της ασφάλειας του τροφίμου. Το μοντέλου εξειδικευμένου ανταγωνισμού που στηρίχθηκε στις εξισώσεις Lotka-Volterra έδωσε ικανοποιητικές προβλέψεις για την συνύπαρξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και την *L.monocytogenes* στα μαλακά τυριά κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασίες ψυγείου. Η συγκεκριμένη προσέγγιση μοντελοποίησης είναι αρκετά χρήσιμη για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της μικροβιακής αλληλεπίδρασης στα τρόφιμα για το στάδιο της εκτίμησης του κινδύνου των τροφίμων (Panebianco, και συν., 2020).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην ανάλυση της συγκεκριμένης εργασίας στόχος ήταν να αναλυθεί η ανταγωνιστικότητα που εμφανίζουν τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος έναντι στο παθογόνο *Listeria monocytogenes* όταν και τα δύο συνυπάρχουν σε υποστρώματα μαλακών τυριών. Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα παθογόνο που ευδοκιμεί στα μαλακά τυριά και η ανάπτυξη του είναι υπαίτια για την τροφική λοίμωξη της λιστερίωσης. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, είναι απαραίτητα για την παρασκευή των τυριών και την δημιουργία των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών. Σε πείραμα που έγινε για την ανταγωνιστικότητα αυτών των δύο σε συνύπαρξή τους στο Κατίκι Δομοκού από τους (Kagkli, Iliopoulos, Stergiou, Lazaridou, & Nychas, 2009), ελέγχθηκαν πέντε στελέχη της *L.monocytogenes* τα οποία εμβολιάστηκαν στο τυρί και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες 5, 10, 15 και 20°C για ένα μήνα. Από το πείραμα φάνηκε πως τα στελέχη που επιβιώνουν και ανταγωνίζονται την *listeria* όταν έχουν εμβολιαστεί απομονωμένα, λειτουργούν το ίδιο και όταν εμβολιαστούν αναμεμιγμένα ως κοκτέιλ. Συγκεκριμένα το στέλεχος TS125 ήταν αυτό που έδειξε την μεγαλύτερη υπεροχή σε όλες τις περιπτώσεις. Φαινόμενα τα οποία παρατηρήθηκαν, ήταν επίσης και το ότι η ανάπτυξη και επιβίωση των στελεχών και των δύο τύπων βακτηρίων σχετιζόταν με την θερμοκρασία αποθήκευσης, κάτι που είναι λογικό εφόσον έχουν διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης, πράγμα που θα οδηγήσει σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, και διαφορές στην ανταγωνιστικότητα για τα θρεπτικά συστατικά. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια υπερίσχυαν αρκετά και δρούσαν ανασταλτικά στην ανάπτυξη της *Listeria* από τους 15°C και πάνω λόγω μεγάλης αύξησης της συγκέντρωσής τους. Το γεγονός αυτό μας δείχνει ότι πέρα από τα φυσικά εμπόδια που επιφέρουν τα οξυγαλακτικά όπως είναι η μείωση του pH και η παραγωγή βακτηριοκτόνων βακτηριοσινών, υπάρχουν και οι παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση των κυττάρων, όπως είναι η θερμοκρασία που παίζουν καθοριστικό ρόλο την επίτευξη του επιθυμητού αποτελέσματος. Πείραμα που διεξήχθη από τους (Benkerroum, Oubel, Zahar, Dlia, & Filali-Maltouf, 2003), παρατηρήθηκε η παραγωγή

μιας συγκεκριμένης ουσίας η οποία είχε παρόμοια δράση με τις βακτηριοσίνες, και χαρακτηρίστηκε ως μια από αυτές, σε μαροκινό τυρί Jben. Η συγκεκριμένη βακτηριοσίνη παράγεται από τον μικροοργανισμό *Lactococcus lactis subsp. lactis CCMM/IAV/BK2*, και το ενδεχόμενο να παρουσιάσει ανασταλτική δράση έναντι της *L.monocytogenes* σχετίζεται με την αρχική ποσότητα εμβολιασμού. Σε αυτό το πείραμα πέρα από το γεγονός της κρισιμότητας που παίζει η αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού, σημειώθηκε και η εξής ιδιομορφία, ότι παρόλο που τα κύτταρα της *L.monocytogenes* με την πάροδο της αποθήκευσης μειώνονται συνεχώς, αυτό δεν αποτελεί νομοτέλεια για την εξαφάνιση της, ενδέχεται δηλαδή να αναζωογονηθεί και τα κύτταρά της να αναπτυχθούν εκ νέου. Οι (Speranza, Sinigaglia, & Corbo, 2009) πραγματοποίησαν μελέτη στην οποία χρησιμοποίησαν την υπεροχή που έχει η φυσιολογία των βιομεμβρανών, όσον αφορά την ανθεκτικότητα, και δημιούργησαν μια βιομεμβράνη η οποία αποτελούταν από διαφορετικά στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων στα οποία δεν είχε ενσωματωθεί κάποια καλλιέργεια εκκίνησης, με την λογική να μπορέσουν να επιβιώσουν σε επιφάνειες υλικών και να προστατέψουν την μικροβιακή χλωρίδα του προϊόντος, σε ενδεχόμενη αλλοίωση του από ανάπτυξη της *L.monocytogenes*. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα στελέχη οξυγαλακτικών, και με αυτά σχηματίστηκαν βιομεμβράνες από το κάθε ένα ξεχωριστά, αλλά και αναμεμιγμένα, σχηματίζοντας ένα βιοφίλμ από κοκτέιλ όλων των στελεχών των επιλεγμένων γαλακτικών βακτηρίων. Το πείραμα έδειξε ότι μια τέτοια διενέργεια μπορεί να αποβεί εποικοδομητική καθώς αυτές οι βιομεμβράνες κατάφεραν να επιβιώσουν και να επηρεάσουν την ανάπτυξη των κυττάρων της *L.monocytogenes* αρνητικά. Παράλληλα από πείραμα μοντελοποίησης των (Panebianco, και συν., 2020), στο οποίο εμβολιάστηκαν στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων και στελέχη της *L.monocytogenes* σε υπόστρωμα μαλακού τυριού, λαμβάνουμε τα δεδομένα ότι μπορούν πέρα από τις αρχικές καλλιέργειες εκκίνησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων που παραδοσιακά τοποθετούνται στα τυριά κατά την παρασκευή τους να προστεθούν και συμπληρωματικές καλλιέργειες οξυγαλακτικών οι οποίες αν προστεθούν στην σωστή αναλογία μπορούν να επιφέρουν θετική επιρροή στον έλεγχο της ανάπτυξης της *L.monocytogenes*. Όλα τα πειράματα που αναλύθηκαν αποδεικνύουν την ουσιαστική συμβολή που έχουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια και η ανάπτυξη τους, εντός ορίων, για την διατήρηση της ασφάλειας των μαλακών τυριών,

λόγω της ανταγωνιστικότητας τους με το παθογόνο *L.monocytogenes*. Παρόλα αυτά η αξιοποίηση τους πρέπει να έχει σημαντική προσοχή προκειμένου να μη έχουμε υπερανάπτυξη τους, και σχηματισμό ανεπιθύμητων χαρακτηριστικών τόσο από οργανοληπτική άποψη, όσο και από άποψη ασφάλειας.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

(n.d.).

Adzitey, F., & Huda, N. (2010, December 9). *Listeria monocytogenes* in foods: Incidences and possible control measures. *Academic Journals*.

Ammendolia, M., Iosi, F., Berardis, B., Guccione, G., Superti, F., Conte, M., & Longhi, C. (2014, January 9). *Listeria monocytogenes* Behaviour in Presence of Non-UV-Irradiated Titanium Dioxide Nanoparticles. *Plos One*.

Annous, B., Becker, L., Bayles D O, Labeda, D., & Wilkinson, B. (1997, July 8). Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *ASM Journals*.

Auvolat, A., & Besse, N. (2015, September 4). The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food. *Food Microbiology*.

Bannenberg, J., Abee, T., Zwietering, M., & Besten, H. (2021, January 16). Variability in lag duration of *Listeria monocytogenes* strains in half Fraser enrichment broth after stress affects the detection efficacy using the ISO 11290-1 method. *International Journal of Food Microbiology*.

Benkerroum, N., Oubel, H., Zahar, M., Dlia, S., & Filali-Maltouf, A. (2003, June 20). Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis subsp. lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *Journal of applied Microbiology*.

BOHAYCHUK, V., GENSLER, G., KING, R., MANNINEN, K., SORENSEN, O., WU, J., . . . MCMULLEN, L. (2006, March 10). Occurrence of Pathogens in Raw and Ready-to-Eat Meat and Poultry Products Collected from the Retail Marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. *Journal of Food Protection*.

- Boulade, M., Morlay, A., Piat, F., Roupioz, Y., Livache, T., Charette, P., . . . Leroy, L. (2019, May 17). Early detection of bacteria using SPR imaging and event counting: experiments with *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*[†]. *Royal Society of chemistry*.
- BREMER, P., MONK, I., & OSBORNE, C. (2001, March 26). Survival of *Listeria monocytogenes* Attached to Stainless Steel Surfaces in the Presence or Absence of *Flavobacterium spp.* *Journal of Food Protection*.
- Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S., & Cabanes, D. (2011, Septembre 01). The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*.
- Carpentier, B., & Chassaing, D. (2004, March 30). Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises . *International Journal of Food Microbiology*.
- Champomier-Vergès, M.-C., Maguin, E., Mistou, M.-Y., Anglade, P., & Chich, J.-F. (2002). Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *Journal of Chromatography*.
- Cintas, L., Casaus, M., Herranz, C., Nes, I., & Hernández, P. (2001, February 19). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*.
- Doris, L., & Seah, H. (1995). *Isolation and identification of Listeria monocytogenes from a range of foods in Singapore*. Great Britain.
- Duché, O., Trémoulet, F., Glaser, P., & Labadie, J. (2002, January 10). Salt Stress Proteins Induced in *Listeria monocytogenes*.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. (2021, November 12). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal*.
- Fuchizawa, I., Shimizu, S., Kawai, Y., & Yamazaki, K. (2008, July 11). Specific detection and quantitative enumeration of *Listeria spp.* using fluorescent in situ hybridization in combination with filter cultivation (FISHFC). *Journal of Applied Microbiology*.
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2006, July 4). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*.

- Garrido, V., A.I. Vitas, & I. García-Jalón. (2008, November 22). Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: Prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. *Food Control*.
- Giuffrida, A., Valenti, D., Ziino, G., Spagnolo, B., & Panebianco, A. (2008, November 20). A stochastic interspecific competition model to predict the behaviour of *Listeria monocytogenes* in the fermentation process of a traditional Sicilian salami. *European Food Research and Technology* .
- Gray, M. L. (1960, December 09). Isolation of *Listeria monocytogenes* from Oat Silage. *Science*.
- Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Stanislav D., Maguin, E., & Maguin, E. (2002, August). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* .
- Guerzoni, M., Lanciotti, R., & Cocconcelli, P. (2001, August 1). Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology*.
- HARRIS, L., FLEMING, H., & KLAENHAMMER, T. (1991, April 25). Sensitivity and Resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to Nisin. *Journal of Food Protection*.
- JARVIS, A. W. (1989). Bacteriophages of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*.
- Johansson, T. (1998, January 5). Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and food-processing environments. *International Journal of Food Microbiology*.
- Kagkli, D.-M., Iliopoulos, V., Stergiou, V., Lazaridou, A., & Nychas, G.-J. (2009, March 21). Differential *Listeria monocytogenes* Strain Survival and Growth in Katiki, a Traditional Greek Soft Cheese, at Different Storage Temperatures. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*.
- Katell Rivoal, Stéphane Quéguiner, Evelyne Boscher, Stéphanie Bougeard, Gwennola Ermel, Gilles Salvat, . . . Jocelyne Protais. (2010, January 10). Detection of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurized liquid whole eggs and characterization by PFGE. *International Journal of Food Microbiology*.
- Khalid, K. (2011, May 15). An overview of lactic acid bacteria . *International Journal of Biosciences (IJB)* .

- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria . *FEMS microbiology reviews*.
- König, H., & Fröhlich, J. (2017). Lactic Acid Bacteria. Στο *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Cham Springer .
- Liu, S., Graham, J., Bigelow, L., Morse II, P., & Wilkinson, B. (2002, January 8). Identification of *Listeria monocytogenes* Genes Expressed in Response. *American Society for Microbiology*.
- Lorca, G., & Valdez, G. (2000, July 5). A Low-pH-Inducible, Stationary-Phase Acid Tolerance Response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. *Current Microbiology*.
- Lungu, B., Ricke, S., & Johnson, M. (2008, September 13). Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: A review. *Anaerobe*.
- Mahmood , M., Ahmed , A., & Hussain, I. (2003). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Poultry Meat, Poultry Meat Products and Other Related Inanimates at Faisalabad. *Pakistan Journal of Nutrition*.
- Marty-Teyssset, C., Torre, F., & Garel, J.-R. (2000, January 1). Increased Production of Hydrogen Peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon Aeration: Involvement of an NADH Oxidase in Oxidative Stress. *Applied and environmental microbiology*.
- Mathieu, F., Michel, M., Lebrihi, A., & Lefebvre, G. (1993, December 29). Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producing strain *Carnobacterium piscicola* CP5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in salt solution, broth and skimmed milk, at various incubation temperatures. *International Journal of Food Microbiology*.
- Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2010). *Μικροβιολογία Τροφίμων*. Αθήνα: Ίων.
- Nørnung, B., Andersen, J., & Schlundt, J. (1999, October 5). Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *International Journal of Food Microbiology*.
- Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S., & Igimi, S. (2003, November 11). Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. *International Journal of Food Microbiology*.

- Pan, Y., Zhang, Y., Cheng, J.-H., & Sun, D.-W. (2019, September 15). Inactivation of *Listeria monocytogenes* at various growth temperatures by ultrasound pretreatment and cold plasma. *LWT - Food Science and Technology*.
- Panebianco, F., Giarratana, F., Caridi, A., Sidari, R., De Bruno, A., & Giuffrida, A. (2020, October 21). Lactic acid bacteria isolated from traditional Italian dairy products: activity against *Listeria monocytogenes* and modelling of microbial competition in soft cheese . *LWT*.
- Pouillot, R., Klontz, K. C., Chen, Y., Burall, L. S., Macarasin, D., Doyle, M., . . . Van Doren, J. M. (2015). Infectious Dose of *Listeria monocytogenes* in Outbreak Linked to Ice Cream, United States, 2015. *PMC*.
- PRESSER, K., RATKOWSKY, D., & ROSS, T. (1997, April 1). Modelling the Growth Rate of *Escherichia coli* as a Function of pH and Lactic Acid Concentration. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*.
- PUCCI,, M., VEDAMUTHU,, E., KUNKA, , B., & VANDENBERGH, P. (1988, June 28). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Using Bacteriocin PA-1 Produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*.
- Rahimi, E., Ameri, M., & Momtaz, H. (2010, March 23). Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milkand dairy products in Iran. *Food Control*.
- Renato H. Orsi, & Martin Wiedmann. (2016, April 29). Characteristics and distribution of *Listeria spp.*, including *Listeria* species newly described since 2009. *PMC*.
- Somers, E., Johnson, M., & Wong, A. (2001, April 30). Biofilm Formation and Contamination of Cheeseby Nonstarter Lactic Acid Bacteria in The Dairy Environment. *Journal of dairy Science*.
- Speranza, B., Sinigaglia, M., & Corbo, M. (2009, January 20). Non starter lactic acid bacteria biofilms: A means to control the growth of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Food Control*.
- Stiles, M. E. (1996, October). Biopreservation by lactic acid bacteria . *Antonie van Leeuwenhoek*.
- Tripathi, P., Beaussart, A., Andre, G., Rolain, T., Lebeer, S., Vanderleyden, J., . . . Dufréne, Y. (2012, December). Towards a nanoscale view of lactic acid bacteria. *Micron*.

- Tsai, H.-N., & Hodgson, D. (2003, August 18). Development of a Synthetic Minimal Medium for *Listeria monocytogenes*. *American Society for Microbiology*.
- Vanegas, M., Vásquez, E., Martínez, A., & Rueda, A. (2008, July 7). Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by real-time PCR. *Food Control*.
- Venema, K., Haverkort, R., Abee, T., Haandrikman, A., Leenhouts, K., Leij, L., . . . Kok, J. (1994). Mode of action of LciA, the *Lactococcus* A immunity protein. *Molecular microbiology*.
- Vitas, A., Aguado, V., & Garcia-Jalon, I. (2003, April 28). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology*.
- Wang, C., & Hong, C. (1998, August 10). Quantitative PCR for *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*.
- Yang, C., You, L., Kwok, L.-Y., Jin, H., Peng, J., Zhao, Z., & Sun, Z. (2021, November). Strain-level multiomics analysis reveals significant variation in cheeses from different regions. *LWT*.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C., Harris, H., Mattarelli, P., . . . Lebeer, S. (2020, 04 15). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *ERA*.
- Ανδρίτσου, Ν. Δ. (2008). *Επίδραση της προσαρμογής σε συνθήκες όξινης και θερμοκρασιακής καταπόνησης στην οξεοανθεκτικότητα και το πρωτέωμα του παθογόνου Listeria monocytogenes* Scott A. Αθήνα.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005. (2005). ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα. *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*, 26.
- Κεχαγιάς, Χ., & Τσάκαλη, Ε. (2017). *Επιστήμη και Τεχνολογία Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων*. Αθήνα: Εκδόσεις Νέων Τεχνολογιών.
- Παππά-Κονιδάρη, Α. (1996). *Συμβολή στη μελέτη δασποράς των λιστεριών*.

- Πυροβόλου, Α. (2019). *Η ανταγωνιστική σχέση της Listeria monocytogenes και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) σε υπόστρωμα τυριών τυρογάλακτος, με χρήση μοντέλων προορατικής μικροβιολογίας διαθέσιμων στο Διαδίκτυο*. Αθήνα.
- Τυμπής, Δ., Πετράκης, Ε., & Κοντελής, Σ. (2016). *Μικροβιολογία τροφίμων: μεθοδολογία και τεχνικές αναλύσεων*. Αθήνα: Εκδόσεις ΔΙΣΙΓΜΑ.
- Χριστοδούλου, Η.-Δ. (2016). *Μικροβιολογικές αλλαγές και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μαλακού τυριού τύπου "κατίκι" με την προσθήκη εκχυλίσματος σαφρον (Crocus Sativus L.) κατά την παρασκευή και συντήρησή του*. Αθήνα.