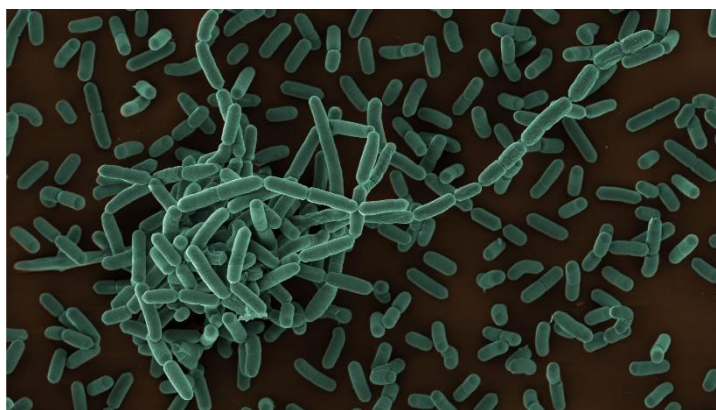




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πτυχιακή εργασία

Η βιωσιμότητα της *Listeria monocytogenes* στα
μαλακά άσπρα τυριά



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Καλτσά Ηλέκτρα-Μαρία/ Kaltsa Electra – Maria

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Κοντελής Σπύρος/ Κοντελής Σπύρος

ΑΙΓΑΛΕΩ 2023

Έγινε δεκτή

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή εργασία με τίτλο «*Η βιωσιμότητα της Listeria monocytogenes στα μαλακά άσπρα τυριά*» που παρουσιάστηκε από την φοιτήτρια Καλτσά Ηλέκτρα και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

Όνομα επιβλέποντος

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Καλτσά Ηλέκτρα - Μαρία



Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προπτυχιακού τίτλου σπουδών, στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Φτάνοντας στη συγγραφή της τελευταίας παραγράφου της παρούσας μελέτης μου και κάνοντας την προσωπική μου ανασκόπηση στα χρόνια φοίτησης μου καθώς και στον ενάμιση χρόνο που αφιέρωσα στην διεκπεραίωση της πτυχιακής μου εργασίας, νιώθω την ανάγκη να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ, λοιπόν, στον υπεύθυνο καθηγητή μου Κοντελέ Σπυρίδων (Επίκουρος καθηγητής), για την υπερπολύτιμη βοήθεια του, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές και την καθοδήγηση που μου έδωσε κατά την διάρκεια της συνεργασίας μας.

Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ στις Επίκουρες καθηγήτριες Μπατρίνου Ανθιμία και Τσάκαλη Ευσταθία για την βοήθεια τους κατά την διάρκεια της εκπόνησης του πειραματικού μέρους της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, τους συναδέλφους μου με τους οποίους εργάστηκα στον ίδιο χώρο, για το φιλικό κλίμα που υπήρξε, την κατανόηση και την άψογη συνεργασία μας.

Καλτσά Ηλέκτρα-Μαρία

Περίληψη

Δύο μοριακά ταυτοποιημένα στελέχη *Lactobacillus lactis* και *Bifidobacterium longum* ήταν διαθέσιμα και από προηγούμενα αποτελέσματα είχε διαπιστωθεί ότι παρήγαγαν γαλακτικό και οξικό οξύ καθώς και γαλακτικό, οξικό και προπιονικό οξύ, αντίστοιχα. Αυτά τα στελέχη εμβολιάστηκαν σε συγκαλλιέργεια με *L. monocytogenes* σε τροποποιημένο υγρό υπόστρωμα MRS και επώαστηκαν στους 37°C/ 48 ώρες. Σε όλες τις συγκαλλιέργειες το αρχικό εμβόλιο *Listeria monocytogenes* ήταν πάντα 10^2 cfu/mL ενώ για το *Lactobacillus lactis* το αρχικό εμβόλιο ήταν (α) 10^2 cfu/mL και (β) 10^6 cfu/mL. Οι ίδιοι συνδυασμοί συγκαλλιέργειας δοκιμάστηκαν επίσης με το στέλεχος *Bifidobacterium longum*. Μετά την επώαση των δειγμάτων, μετρούνταν η τιμή pH των συγκαλλιέργειών και γίνονταν δοκιμή ανίχνευσης παρουσίας/απουσίας *Listeria monocytogenes*. Σε αρκετές περιπτώσεις συγκαλλιέργειας, το *L. monocytogenes* εξαλείφθηκε, αλλά δεν βρέθηκε σαφής συσχέτιση μεταξύ του τελικού pH και της εξάλειψης του *L. monocytogenes*. Από την άλλη πλευρά, διαπιστώθηκε ότι οι περισσότερες περιπτώσεις όπου το *L. monocytogenes* εξαλείφθηκε ήταν σε συγκαλλιέργεια με το *Bifidobacterium longum* που παρήγαγε τρία οργανικά οξέα (γαλακτικό, οξικό και προπιονικό) έναντι δύο (γαλακτικό, οξικό).

Λέξεις Κλειδιά: *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium longum*, *L. monocytogenes* συγκαλλιέργεια, οργανικά οξέα, ζύμωση.

Abstract

Two molecularly identified strains *Lactobacillus lactis* and *Bifidobacterium longum* were available where previous results had shown that produced lactic and acetic acids as well as lactic, acetic, and propionic acids, respectively. These strains co-inoculated with *L. monocytogenes* in a liquid modified MRS medium and incubated at 37°C for 48h. In the co-cultures the initial *Listeria monocytogenes* inoculum was always 10^2 cfu/mL while for *Lactobacillus lactis* the initial inoculum was (a) 10^2 cfu/mL and (b) 10^6 cfu/mL. The same co-culture combinations were also tested with the *Bifidobacterium longum* strain. Following incubation of the samples, the pH of the co-culture combinations was measured, and the presence/absence of *Listeria monocytogenes* was detected. In several cases of co-culture, *L. monocytogenes* was eliminated, but no clear correlation was found between the final pH and *L. monocytogenes* elimination. On the other hand, it was found that most of the cases where *L. monocytogenes* was eradicated were in co-culture with the *Bifidobacterium longum* which produced three organic acids (lactic, acetate and propionic) versus two (lactic, acetate).

Keywords: *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium longum*, *L. monocytogenes* συγκαλλιέργεια, οργανικά οξέα, ζύμωση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή.....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ <i>Listeria monocytogenes</i>	9
1.1 Το γένος <i>Listeria</i>	9
1.2 Ανθεκτικότητα και ευαισθησία της <i>Listeria monocytogenes</i> σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες	10
1.2.1 Επίδραση pH	11
1.2.2 Επίδραση θερμοκρασίας.....	12
1.2.3 Επίδραση ενεργότητας νερού	12
1.2.4 Επίδραση συγκέντρωσης αλάτων	13
1.3 Ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής <i>L. monocytogenes</i>	13
1.4 Πηγές της <i>Listeria monocytogenes</i>	14
1.5 Λιστερίωση	15
1.6 Κριτήρια καταλληλότητας – νομοθεσία	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΑΡΟΥΣΙΑ <i>Listeria monocytogenes</i> ΣΤΑ ΜΑΛΑΚΑ ΑΣΠΡΑ ΤΥΡΙΑ.....	20
2.1 Ορισμός και παραγωγή μαλακών λευκών τυριών	20
2.2 Επιπολασμός <i>Listeria monocytogenes</i> στο γάλα	20
2.3 Επιβίωση μικροοργανισμού στα μαλακά άσπρα τυριά	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ <i>Listeria monocytogenes</i>.....	25
3.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση <i>Listeria monocytogenes</i>	25
3.1.1 Μέθοδος ISO 11290-1:2017	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	27
4.1 Υλικά και εξοπλισμός.....	27
4.1.1 Υλικά	27
4.1.2 Εξοπλισμός	28
4.2 Μέθοδοι.....	28
4.2.1 Προετοιμασία υποστρωμάτων	28
4.2.2 Προετοιμασία των εμβολίων	28
4.2.3 Εμβολιασμός	29
4.2.4 Επώαση και συλλογή δειγμάτων	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	31
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	38

Εισαγωγή

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα παθογόνο βακτήριο, τόσο για τον άνθρωπο όσο και για αρκετά είδη ζώων. Είναι υπεύθυνο για μία σοβαρή τροφιογενή λοίμωξη, γνωστή ως λιστερίωση, η οποία έχει έντονη συμπτωματολογία ιδιαίτερα για ευπαθείς ομάδες ανθρώπων όπως νεογνά, σε ανοσοκατασταλμένα άτομα ή ηλικιωμένους. Μία από τις κυριότερες και συχνότερες εστίες μόλυνσης είναι το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα οποία όμως καταναλώνονται σε καθημερινή βάση από το σύνολο των ανθρώπων σε παγκόσμιο επίπεδο. Άλλα τρόφιμα που μπορούν να περιέχουν το συγκεκριμένο παθογόνο είναι τα λαχανικά, το κρέας και τα προϊόντα του κρέατος, τα πουλερικά και τα θαλασσινά, ψάρια ή οστρακοειδή (Shamloo et al., 2019).

Έχει δημιουργηθεί, λοιπόν, η ανάγκη να υιοθετηθούν ταχείς και ακριβείς μέθοδοι ανίχνευση του βακτηρίου *L. monocytogenes* ώστε να προστατευτεί αποτελεσματικά η υγεία του καταναλωτή. Είναι ένα βακτήριο που έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να εμφανίσει ανθεκτικότητα έναντι των αντιβιοτικών και μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί ικανοποιητικά, ακόμη και όταν επικρατούν αντίξοες συνθήκες όπως στρες, αυξημένη συγκέντρωση συντηρητικών και αντιβιοτικών στο περιβάλλον ανάπτυξης. Η αύξηση όμως της αντοχής του έναντι των αντιβιοτικών συνεπάγεται ότι η διαχείριση και η αντιμετώπιση της νόσου που προκαλείται από την κατανάλωση μολυσμένης τροφής με *L. monocytogenes*, αλλά και η αποτροπή της διάδοσής του βακτηρίου μέσω της τροφικής αλυσίδας γίνεται πιο δύσκολη, καθώς απαιτείται η λήψη όλων και δραστικότερων φαρμάκων ή τεχνολογιών για τον περιορισμό της (Shamloo et al., 2019).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ *Listeria monocytogenes*

1.1 Το γένος *Listeria*

Το Γένος *Listeria* περιλαμβάνει Gram θετικά βακτήρια, τα οποία δεν σχηματίζουν σπόρια ή κάψα, είναι προαιρετικά αναερόβια, ραβδόμορφα με διάμετρο περίπου 0,5 μm και μήκος 1-2 μm. Παρουσιάζουν κινητικότητα σε ένα εύρος θερμοκρασιών 10 ως 25°C, λόγω μαστίγιων που φέρουν εξωκυτταρικά και περιμετρικά. Παρουσιάζει ομοιότητες με τα γένη *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* και *Staphylococcus* (Hain et al., 2006; Luque-Sastre et al., 2018).

Το γένος *Listeria* ταξινομήθηκε στην οικογένεια *Corynebacteriaceae* σύμφωνα με την 7η έκδοση του Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, αλλά τοποθετήθηκε σε μια νέα οικογένεια, που ονομάστηκε *Listeriaceae*, το 2004. Ωστόσο, η αλληλουχία 16S rRNA της *Listeria* σχετίζεται στενά με τον *Lactobacillus* και συνήθως ταξινομείται μαζί με τους *Lactobacillus* και *Erysipelothrix* (Shamloo et al., 2019).

Τα βακτήρια του γένους *Listeria* μπορούν να αναπτυχθεί σε ένα ευρύ φάσμα pH που κυμαίνεται από 4,5 ως 9,0, ενώ το εύρος θερμοκρασιών που μπορεί να αναπτυχθεί/επιβιώσει είναι από 0 – 45°C, αν και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του είναι κοντά στους 37°C. Τα βακτήρια του *Listeria* spp. αναπτύσσονται επίσης και σε συνθήκες υψηλή αλατότητας, όπου η περιεκτικότητα σε NaCl κυμαίνεται ακόμη και σε 10% (Hain et al., 2006).

Στο γένος *Listeria* μέχρι το 2006 είχαν ταξινομηθεί έξι είδη (Hain et al., 2006). Τα τελευταία χρόνια, όμως, ο αριθμός τους αυξάνεται συνεχώς. Το 2017, οι Martinez-Rioz & Dalgaard, αναφέρουν την ύπαρξη περισσότερων από 20 ειδών που ταξινομήθηκαν σε αυτό το γένος, μεταξύ των οποίων έξι είδη αναφέρονται πιο συχνά:

- *Listeria monocytogenes*
- *Listeria ivanovii*
- *Listeria seeligeri*
- *Listeria innocua*
- *Listeria welshimeri*
- *Listeria grayi*

Από τα είδη αυτά, σοβαρή ασθένεια στον άνθρωπο αλλά και στα ζώα μπορεί να προκαλέσει το είδος *L. monocytogenes*, αν και έχουν υπάρξει ορισμένες αναφορές ότι δυνητικά παθογόνα για τον άνθρωπο είναι τα είδη *L. seeligeri* και *L. ivanovii*. Το είδος *L. ivanovii* προκαλεί λοιμώξεις σε ζώα (Hain et al., 2006; Martinez-Rioz & Dalgaard, 2017; Shamloo et al., 2019).

Τα βακτήρια *Listeria* spp έχουν διακριθεί σε διαφορετικές ορότυπους σύμφωνα με το σωματικό αντιγόνο O και το μαστιγιακό αντιγόνο H. Η *Listeria monocytogenes* έχει διαφοροποιηθεί σε τουλάχιστον 13 διαφορετικού ορότυπους και αυτοί με τη σειρά τους έχουν ταξινομηθεί σε τέσσερις γενεαλογικές σειρές (lineage) (Luque-Sastre et al., 2018)

Πίνακας 1: Γενεαλογικές σειρές και ορότυποι *L.monocytogenes*

Γενεαλογική σειρά (lineage)	Ορότυποι (Serotypes)	Περιγραφή
I	1/2b, 3b, 4b	Διάφορες πηγές και κυρίαρχος ορότυπος των ανθρώπινων απομονώσεων
II	1/2a, 1/2c, 3a, 3c	Διάφορες πηγές. Κυριαρχεί στα τρόφιμα και στο φυσικό περιβάλλον
III	4a, 4b, 4c	Σημαντική πηγή: μηρυκαστικά
IV	4a, 4b, 4c	Σημαντική πηγή: μηρυκαστικά

Πηγή: [Luque-Sastre et al., 2018](#)

1.2 Ανθεκτικότητα και ευαισθησία της *Listeria monocytogenes* σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί κάτω από ευρείες συνθήκες περιβαλλοντικού στρες που συναντώνται τόσο στα τρόφιμα όσο και στον ξενιστή. Η ικανότητα ορισμένων υποτύπων *L. monocytogenes* να ευδοκιμούν υπό συνθήκες στρες που υπάρχουν σε συγκεκριμένες συνθήκες θεωρείται ότι αντανακλά γενετικά χαρακτηριστικά και φαινοτυπικές ικανότητες που διατηρούνται μεταξύ των στελεχών ενός υποτύπου (Bergholz et al., 2010).

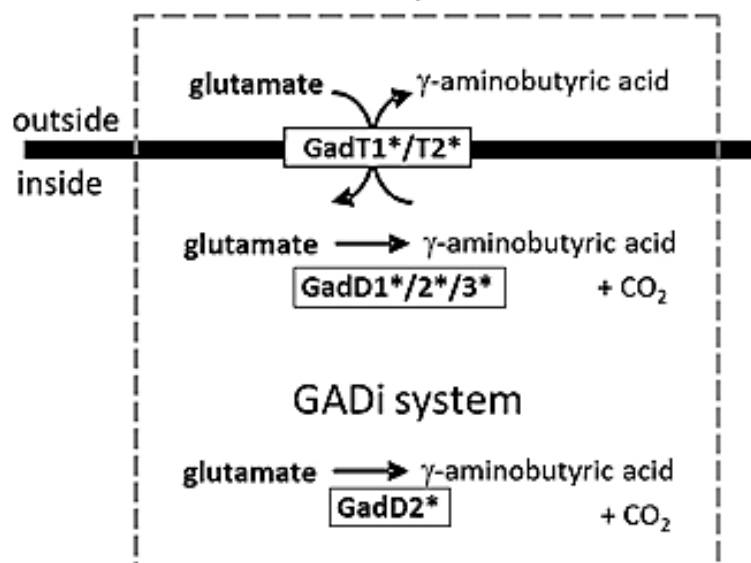
1.2.1 Επίδραση pH

Το pH αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες του περιβάλλοντος που μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη και τη συμπεριφορά των μικροοργανισμών, αναπτύσσονται σε ορισμένο εύρος pH (Arcari et al., 2020). Το *Listeria monocytogenes* αναπτύσσεται σε pH που κυμαίνεται από 4,2 -9,5 (Gerard et al., 2018) όταν όλες οι υπόλοιπες συνθήκες είναι ιδανικές

Όσο πιο όξινο είναι το περιβάλλον τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των κατιόντων υδρογόνου ($[H^+]$). Η υψηλή αυτή συγκέντρωση όμως των πρωτονίων μπορεί να οδηγήσει σε πρωτονίωση ορισμένων βιολογικών μορίων, γεγονός που σημαίνει ότι το φορτίο, η δομή και πιθανότατα και η λειτουργικότητά τους επηρεάζεται. Κατά συνέπεια, επηρεάζεται και η λειτουργικότητα και βιωσιμότητα του βακτηριακού κυττάρου (Arcari et al., 2020).

Σε περιβάλλον όπου επικρατούν συνθήκες χαμηλού pH, οι μικροοργανισμοί και ανάμεσα τους και η *Listeria monocytogenes* αναπτύσσουν ορισμένους μηχανισμούς άμυνας, ομοιοστατικούς και προστατευτικούς, ώστε να προσαρμοστούν στις αντίξοες συνθήκες. Ουσιαστικά, οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί βασίζονται κυρίως στην ενεργοποίηση ορισμένων συστημάτων αποκαρβοξυλίωσης, ώστε να προστατευθεί το κύτταρο από το όξινο stress και να παραμείνει το κυτταροπλασματικό pH σε τιμές που είναι θεωρητικά κατάλληλες για την επιβίωση και την ανάπτυξη του. Τα συστήματα αποκαρβοξυλασών αμινοξέων (amino acid decarboxylases), όπως γλουταμικής αποκαρβοξυλάσης (glutamate decarboxylase - GAD) και αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης (arginine decarboxylase - ADI) χρησιμοποιούν ένα πρωτόνιο για να παράγουν ένα μόριο διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) για κάθε μόριο αμινοξέος που εντοπίζουν στο υπόστρωμα. Με τον τρόπο αυτό η συγκέντρωση των πρωτονίων στο κυτταρόπλασμα ελαττώνεται και έτσι το pH διατηρείται σχετικά σταθερό (Arcari et al., 2020).

Το σύστημα της γλουταμινικής αποκαρβοξυλάσης (GAD) είναι ιδιαίτερα σημαντικό αλλά και πολύπλοκο (Εικόνα 1). Συμμετέχουν στη διαδικασία δύο αντιμεταφορείς γλουταμικού/GABA (GadT1 και GadT2) και τρία ένζυμα γλουταμικής αποκαρβοξυλάσης (GadD1, GadD2 και GadD3) (Gahan & Hill, 2014).



Εικόνα 1: Σύστημα γλουταμινικής αποκαρβοξυλάσης (GAD)

Πηγή: Gahan & Hill, 2014

Το *L. monocytogenes* έχει επίσης τη δυνατότητα να καταλύσει δύο διαδοχικές αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης για την παραγωγή ακετοΐνης από πυροσταφυλικό, καταναλώνοντας ταυτόχρονα δύο πρωτόνια στη διαδικασία (Arcari et al., 2020).

1.2.2 Επίδραση θερμοκρασίας

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* αναπτύσσεται σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών. Είναι ένας ψυχρότροφος μικροοργανισμός που αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες κάτω από 7°C, δηλαδή μπορεί να αναπτυχθεί ακόμη και αν ένα τρόφιμο φυλάσσεται σε θερμοκρασίες ψύξης. Ορισμένα στελέχη μπορούν να επιβιώσουν, όχι όμως να πολλαπλασιαστούν, ακόμη και σε θερμοκρασίες την περιοχή των 0°C. Επίσης, μπορεί να πολλαπλασιαστεί και σε υψηλές θερμοκρασίες, οι οποίες φθάνουν ως και τους 45°C. Ωστόσο, η βέλτιστη ανάπτυξη του παθογόνου βακτηρίου παρατηρείται μεταξύ 30 και 37°C (Gerard et al., 2018).

1.2.3 Επίδραση ενεργότητας νερού

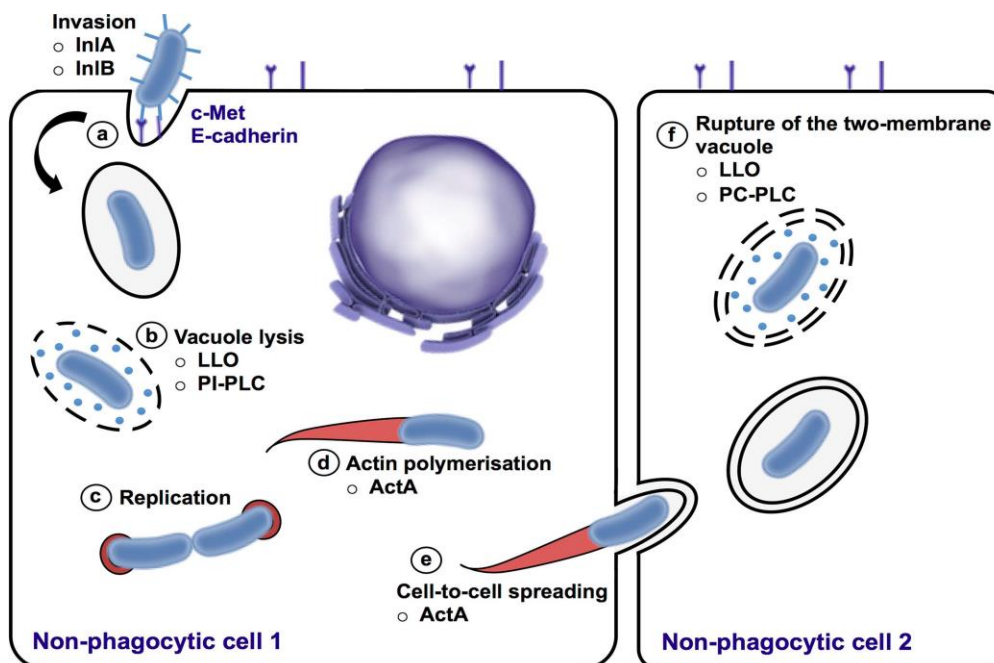
Η ενεργότητα ύδατος είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Σε τιμές μικρότερες του 0,92 ($a_w \leq 0,92$), το *L. monocytogenes* δεν αναπτύσσεται (Gerard et al., 2018).

1.2.4 Επίδραση συγκέντρωσης αλάτων

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* παρουσιάζει αντοχή σε αλατούχα διαλύματα, οπότε μπορεί να αναπτυχθεί σε συγκεντρώσεις άλατος ακόμη και 10,0% NaCl (Gerard et al., 2018).

1.3 Ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής *L. monocytogenes*

Το βακτήριο, ως προς το μηχανισμό δράσης του, θεωρείται «ενδοκυτταρικό παράσιτο». Ο κύκλος ζωής του βακτηρίου *L. monocytogenes* στο εσωτερικό των κυττάρων που μολύνει έχει μελετηθεί διεξοδικά. Στην Εικόνα 2, διακρίνονται τα διαφορετικά στάδια της ανάπτυξής του στο κύτταρο του ξενιστή.



Εικόνα 2: Στάδια του κύκλου ζωής του *L.monocytogenes* στα κύτταρα του ξενιστή α) είσοδος στο επιθηλιακό κύτταρο του γαστρεντερικού σωλήνα β) απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα από το κενοτόπιο γ) αναπαραγωγή δ) πολυμερισμός ακτίνης και εξάπλωση βακτηρίου ε) μεταφορά σε άλλο κύτταρο και σε άλλα μέρη και όργανα του οργανισμού

Πηγή: Luque-Sastre et al., 2018

Η διείσδυση του βακτηρίου *L. monocytogenes* στο κύτταρο – ξενιστή γίνεται με τη βοήθεια δύο πρωτεϊνών (ιντερναλίνη Α - InlA και ιντερναλίνη - InlB) που συνδέονται με το εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες αυτές δημιουργούν αναδιατάξεις της δομής της κυτταρικής μεμβράνης, επιτρέποντας έτσι την είσοδο του παθογόνου

μικροοργανισμού στο κύτταρο του οργανισμού. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη InlA η οποία αποτελείται από 800 περίπου αμινοξέα αναπτύσσει ομοιοπολικούς δεσμούς με την E-Cadherin και έτσι προσκολλάται στο βακτηριακό κύτταρο, και το διευκολύνει να εισέλθει στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου και σε ορισμένα κύτταρα του ήπατος. Η πρωτεΐνη InlB αποτελείται από 630 περίπου αμινοξέα. Αναγνωρίζει, για παράδειγμα, τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (c-Met) και τον υποδοχέα (gC1q-R) και διευκολύνει τη διείσδυση του βακτηρίου σε κύτταρα του ήπατος, σε ινοβλάστες και σε κύτταρα του επιθηλίου του εντέρου (Luque-Sastre et al., 2018).

1.4 Πηγές της *Listeria monocytogenes*

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* έχει απομονωθεί από πολλές διαφορετικές όπως είναι το νερό, το έδαφος, και μπορεί να εισέλθει στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα κατά την επεξεργασία των τροφίμων, από τον περιβάλλοντα χώρο. Το γεγονός ότι είναι ένα ψυχρότροφο βακτήριο, δηλαδή μπορεί και αναπτύσσεται ακόμη και σε συνθήκες ψύξης, αυξάνει τον δυνητικό κίνδυνο να μολύνει τα τρόφιμα και να καταναλωθεί από τον άνθρωπο (Hain et al., 2006).

Στον Πίνακα 2, παρουσιάζονται συνοπτικά θηλαστικά, πτηνά και άλλα είδη από τα οποία έχουν απομονωθεί και έχουν ταυτοποιηθεί βακτήρια *Listeria*.

Πίνακας 2: Γενεαλογικές σειρές και ορότυποι *L. monocytogenes*

Θηλαστικά	Γάτες, βοοειδή, τσιντσιλά (τρωκτικά), ελάφια, σκύλοι, κουνάβια, αλεπούδες, κασίκες, ινδικά χοιρίδια, άλογα, άνθρωποι, τσακάλια, ποντίκια, βιζόν, πίθηκοι, άλκες, χοίροι, κουνέλια, ρακούν, αρουραίοι, πρόβατα,
Πτηνά	Καναρίνια, κοτόπουλα, κοτόπουλα, γερανοί, περιστέρια, πάπιες, αετοί, χήνες, γεράκια, κουκουβάγιες, παπαγάλοι, πέρδικες, φασιανοί, περιστέρια, γλάροι, γαλοπούλες, αγριο-πετεινοί
Άλλα	Μυρμήγκια, καρκινοειδή, σαύρες, ψάρια, μύγες, βάτραχοι, σαλιγκάρια, τσιμπούρια και χελώνες

Πηγή: Luque-Sastre et al., 2018

1.5 Λιστερίωση

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* μπορεί να προσαρμοστεί στις συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα ξεπερνώντας τις «εχθρικές» συνθήκες αυτού του μικροπεριβάλλοντος, όπως η οξύτητα, το χαμηλό οξυγόνο και η αντιμικροβιακή δράση των χολικών αλάτων και πεπτιδίων. Υποδείχθηκε ότι η *Listeria* θα μπορούσε να προκαλέσει τη χρόνια λοίμωξη και έχει μια μοναδική ικανότητα να επιβιώνει σε διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα του γαστρεντερικού σωλήνα (Shamloo et al., 2019).

❖ **Συμπτώματα:** Η λιστερίωση είναι μία τροφιμογενή λοίμωξη που μπορεί να προκαλέσει ποικίλα συμπτώματα που διαφέρουν ως προς την ένταση και τη σοβαρότητά τους. Έχει υπολογιστεί ότι ο αριθμός των ατόμων που εμφανίζουν λιστερίωση είναι χαμηλό και κυμαίνεται κατά μέσο όρο από 2 ως 15 περιπτώσεις ανά 10^6 άτομα ετησίως. Τα συμπτώματα της λιστερίωσης μπορεί να κυμαίνονται από ήπια μέχρι πολύ σοβαρά. Έτσι, το άτομο που μολύνθηκε με *L. monocytogenes* μπορεί να εμφανίσει γαστρεντερίτιδα που συνοδεύεται από διάρροιες, ναυτίες, έμετους, πυρετό, αλλά και σε πιο σοβαρές περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει αποβολή, προγεννητικές λοιμώξεις, σηψαιμία, ακόμη και θάνατο (Hain et al., 2006).

Οι ομάδες που κινδυνεύουν πιο έντονα από λιστερίωση είναι οι έγκυες, τα νεογνά, οι ανοσοκατεσταλμένοι ενήλικοι και οι ηλικιωμένοι (Martinez-Rios & Dalgaard, 2018). Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να οδηγήσει σε έκτρωση ή να προκαλέσει πρώιμο τοκετό. Τα άτομα που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή, όπως οι ασθενείς με καρκίνο, λευχαιμία, σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS), Hodgkin ή είναι άνω των 65 ετών κινδυνεύουν από σηψαιμία και μηνιγγίτιδα. Έχει ανησυχητικά υψηλό ποσοστό θνησιμότητας μεταξύ των ευπαθών ομάδων ασθενών που υπολογίζεται ότι σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φθάσει ακόμη και το 25- 30% (Hain et al., 2006).

Σε πρόβατα και βοοειδή, η λιστερίωση μεταδίδεται κυρίως μέσω της αλλοιωμένης ζωοτροφής και μπορεί να είναι η αιτία εκτρώσεων, υψηλής θνησιγένειας, νεογνικής σηψαιμίας (Hain et al., 2006). Στις ευρωπαϊκές χώρες, συνολικά 1760 περιπτώσεις λιστερίωσης αναφέρθηκαν σε ανθρώπους το 2013 από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA). Κατά μέσο όρο, το 99,1% των περιπτώσεων χρειάστηκε νοσηλεία. Η επίπτωση της *Listeria* είναι σχετικά σπάνια και η ετήσια αναφορά μόλυνσης με *Listeria* έχει μειωθεί από 7,7 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο σε 3,1 περιπτώσεις κατά την περίοδο 1990-2003 στις ΗΠΑ. Επιπλέον, στην Ευρώπη, η συχνότητα μόλυνσης

μειώθηκε από 4,5 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο σε 3,4 περιπτώσεις μεταξύ 1999 και 2003. Κάθε χρόνο, 1600 περιπτώσεις μόλυνσης από *Listeria* αναφέρονται από τις ΗΠΑ. Μια μελέτη έδειξε ότι η ετήσια επίπτωση της λοίμωξης από *Listeria* στις ΗΠΑ είναι περίπου 1795-1860 περιπτώσεις ανά 100000 άτομα. Επίσης, το ποσοστό θνησιμότητας για αυτή τη μόλυνση είναι περίπου 30% σε ορισμένες περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών. Στις ευρωπαϊκές χώρες, συνολικά 1760 περιπτώσεις λιστερίωσης αναφέρθηκαν σε ανθρώπους το 2013 από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA). Κατά μέσο όρο, το 99,1% των περιπτώσεων χρειάστηκε νοσηλεία.

Σύμφωνα με το Εθνικό Κέντρο Ζωονοσογόνων, Μεταδιδόμενων και Εντερικών Νοσημάτων του CDC, η λιστερίωση προστέθηκε στον κατάλογο των εθνικά κοινοποιήσιμων νόσων το 2001. Για να βελτιωθεί η μελέτη επιτήρησής του, το Συμβούλιο της Επικρατείας και οι Επιδημιολόγοι της Επικράτειας συνέστησαν όλες οι απομονώσεις *L. monocytogenes* να προωθούνται σε κρατικά εργαστήρια δημόσιας υγείας για υποτυποποίηση μέσω του Εθνικού Δικτύου Μοριακής Υποτυποποίησης για την Παρακολούθηση των Τροφιμογενών Νοσημάτων. Όλες οι πολιτείες έχουν κανονισμούς που απαιτούν από τους παρόχους υγειονομικής περίθαλψης να αναφέρουν περιπτώσεις λιστερίωσης και οι υπάλληλοι της δημόσιας υγείας θα πρέπει να προσπαθήσουν να πάρουν συνέντευξη από όλα τα μολυσμένα άτομα αμέσως χρησιμοποιώντας ένα τυπικό ερωτηματολόγιο σχετικά με τα τρόφιμα υψηλού κινδύνου. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, το FoodNet διεξάγει ενεργή εργαστηριακή και πληθυσμιακή παρακολούθηση. Με βάση αυτές τις μελέτες επιτήρησης το 2006, οι αξιωματούχοι δημόσιας υγείας των ΗΠΑ ανακοίνωσαν ότι μεταξύ 884 εστιών τροφιμογενών παθογόνων, μόνο ένα ξέσπασμα οφειλόταν στη *Listeria*. Ωστόσο, ένα χρόνο αργότερα το CDC ανέφερε 122 κρούσματα *Listeria* στον κόσμο που έφτασαν τα 158 κρούσματα το 2008. Ωστόσο, αυτά τα δεδομένα έδειξαν ότι η συχνότητα μόλυνσης λόγω *Listeria* μειώθηκε (42%) σε σύγκριση με το 1998 (Shamloo et al., 2019). Επί του παρόντος, τα περισσότερα κρούσματα προέρχονται μέσω της κατανάλωσης γαλακτοκομικών προϊόντων, ενώ ο αριθμός των κρουσμάτων λόγω κατανάλωσης έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων έχει μειωθεί. Η κατανάλωση φρούτων, λαχανικών και παγωτού σχετίζεται με χαμηλούς έως μέτριους αριθμούς κρουσμάτων *Listeria*. Ένα ξέσπασμα της *Listeria* λόγω μόλυνσης από πεπόνι αναφέρθηκε το 2011 (Shamloo et al., 2019).

Τον Μάρτιο του 2015 αναφέρθηκε ξέσπασμα λιστερίωσης με κατανάλωση παγωτού. Αυτό που ήταν ασυνήθιστο σε αυτό το ξέσπασμα ήταν ότι τρεις ορότυποι 1/2b, 3b και 1/2a της *Listeria monocytogenes*, που βασικά σχετίζονται με τα τρόφιμα και το περιβάλλον, αναφέρθηκαν ως υπεύθυνα βακτήρια σε αυτό το ξέσπασμα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε χαμηλό επίπεδο μόλυνσης στα δείγματα παγωτού, που αντιπροσωπεύει χαμηλότερη μολυσματική δόση για αυτά. Θα πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη ότι η κατάσταση της υγείας των ασθενών έχει μεγάλη επίδραση στη μόλυνση με *L. monocytogenes*, καθώς το ποσοστό μόλυνσης είναι υψηλότερο σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Shamloo et al., 2019). Οι πιο διαδεδομένοι ορότυποι της *Listeria* σε τρόφιμα και περιβάλλοντα είναι 1/2a και 1/2b. Ωστόσο, τα στελέχη του ορότυπου 4b ευθύνονται για το 50% των ανθρώπινων κρουσμάτων *Listeria monocytogenes*, ενώ ο ορότυπος 1/2a προκαλεί το 27% της κλινικής λιστερίωσης. Στις ευρωπαϊκές χώρες, συνολικά 1760 περιπτώσεις λιστερίωσης σε ανθρώπους αναφέρθηκαν το 2013 από την EFSA. Πρόσφατα στοιχεία δήλωσαν ότι τα περισσότερα κρούσματα λιστερίωσης συνδέθηκαν με μόλυνση καρκινοειδών, οστρακόδερμων, μαλακίων, κρέατος και προϊόντων κρέατος, τυριών, λαχανικών και χυμών σε περιοχές της ΕΕ. Το υψηλότερο ποσοστό μόλυνσης στις κινεζικές βιομηχανίες τροφίμων ήταν το *L. monocytogenes* σύμφωνα με μια διατη έρευνα που διεξήχθη με μόλυνση περίπου 20%. Ανακάλυψαν ότι το ποσοστό μόλυνσης (ορότυποι 1/2a και 3a) στη Βόρεια Κίνα ήταν υψηλότερο από τη νότια περιοχή, γεγονός που οφείλεται στην ψυχροτρόπο ιδιότητά της. Η βόρεια περιοχή έχει ψυχρό κλίμα ενώ η νότια είναι κυρίως ζεστή (Shamloo et al., 2019).

1.6 Κριτήρια καταλληλότητας – νομοθεσία

Ο κανονισμός ΕΚ 2073/2005 της ΕΕ ορίζει ορισμένα κριτήρια υγιεινής διεργασιών που υποδεικνύουν τη σωστή λειτουργία της παραγωγικής διαδικασίας. Ο κανονισμός ορίζει επίσης κριτήρια ασφάλειας τροφίμων για σχετικά τροφιμογενή βακτήρια, τις τοξίνες και τους μεταβολίτες τους σε συγκεκριμένα τρόφιμα. Τα κριτήρια καθορίζουν την αποδοχή ενός προϊόντος που διατίθεται στην αγορά. Ειδικά κριτήρια για το *L. monocytogenes* ισχύουν για τα τρόφιμα άμεσης κατανάλωσης, συμπεριλαμβανομένων των νωπών τυριών.

Πίνακας 3: Κριτήρια ασφάλειας τροφίμων για *Listeria monocytogenes* σύμφωνα με ΕΚ 2073/2005

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί/οι τοξίνες και οι μεταβολίτες τους	Πλάνο δειγματοληψίας		Όρια		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
		n	c	m	M		
1.1 Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Να μην ανιχνεύεται σε 25 g		EN/ISO 11290-1	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.2 Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g (Αυτό το κριτήριο εφαρμόζεται εάν ο παρασκευαστής μπορεί να αποδείξει, ικανοποιώντας την αρμόδια αρχή, ότι το προϊόν δεν θα υπερβεί το όριο των 100 cfu/g καθ' όλη τη διάρκεια διατήρησης. Ο υπεύθυνος της επιχείρησης τροφίμων μπορεί να ορίσει ενδιάμεσα όρια κατά τη διάρκεια της διαδικασίας τα οποία πρέπει να είναι αρκετά χαμηλά ώστε να εξασφαλίζεται ότι δεν υπερβαίνεται το όριο των 100 cfu/g καθ' όλη τη διάρκεια διατήρησης)		EN/ISO 11290-2 (1 ml ενοφθαλισμένου δείγματος τοποθετείται σε τρυβλίο Petri διαμέτρου 140 mm ή σε 3 τρυβλία Petri διαμέτρου 90 mm.)	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
		5	0	Να μην ανιχνεύεται σε 25 g (Το κριτήριο αυτό εφαρμόζεται για τα προϊόντα πριν αποδεσμευτούν από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης που τα παρήγαγε, όταν δεν μπορεί να αποδείξει, ικανοποιώντας την αρμόδια αρχή, ότι το προϊόν δεν θα υπερβαίνει το όριο των 100 cfu/g καθ' όλη τη διάρκεια διατήρησης.)		EN/ISO 11290-1	Πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης τροφίμων που το παρήγαγε
1.3 Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g		EN/ISO 11290-2 (1 ml ενοφθαλισμένο υ δείγματος τοποθετείται σε τρυβλίο Petri διαμέτρου 140 mm ή σε 3 τρυβλία Petri διαμέτρου 90 mm.)	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
		5	0	Να μην ανιχνεύεται σε 25 g		EN/ISO 11290-1	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους

Τα τρόφιμα με $pH \leq 4,4$ ή με $a_w \leq 0,92$ και τα τρόφιμα με $pH < 5,0$ και $a_w \leq 0,94$ θεωρούνται αυτόματα ως τρόφιμα που ανήκουν στην κατηγορία 1,3. Άλλα προϊόντα διατροφής μπορεί επίσης να ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία, με την επιφύλαξη επιστημονικών στοιχείων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΑΡΟΥΣΙΑ *Listeria monocytogenes* ΣΤΑ ΜΑΛΑΚΑ ΑΣΠΡΑ ΤΥΡΙΑ

2.1 Ορισμός και παραγωγή μαλακών λευκών τυριών

Το μαλακό τυρί παρουσιάζει το μεγαλύτερο δυνητικό κίνδυνο για την ανάπτυξη του βακτηρίου *L. monocytogenes*. Το pH και η ενεργότητα ύδατος είναι κατάλληλες για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου παθογόνου. Σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην περιοχή του Βελγίου τα μαλακά και ημιμαλακά τυριά παρουσίασαν τιμές pH μεταξύ 4,16 έως 7,47 και ενεργότητα ύδατος (a_w) που κυμάνθηκε από 0,93 έως 0,98. Ο παράγοντας που καλείται να κρατήσει τις συνθήκες ακατάλληλες για την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε αυτές τις περιπτώσεις είναι η θερμοκρασία και οι συνθήκες υγιεινής. Αν το τυρί δεν μολυνθεί με το βακτήριο, το προϊόν θα είναι ασφαλές για διάθεση στην αγορά. Η αποθήκευση του μαλακού τυριού σε συνθήκες ψύξης επιβραδύνει, αλλά δεν αναστέλλει πλήρως την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* (Gerald et al., 2018). Τα μαλακά τυριά παρασκευάζονται χωρίς να ασκηθεί πίεση στο τυρόπηγμα. Διατηρούν μία κρεμώδη υφή και ο χρόνος ωρίμανσης τους είναι σύντομος. Η μικροχλωρίδα του φλοιού και του πυρήνα των μαλακών τυριών διαφέρει. Έτσι, αν έχουν ωριμάσει παρουσία μούχλας, όπως το Camembert και το Brie, τότε δημιουργείται ένα λευκό περίβλημα γύρω από τον πυρήνα που αποτελείται από *Penicillium camemberti* ή/και από *Geotrichum candidum*. Ο πυρήνας όμως είναι πλούσιος σε βακτήρια γαλακτικού οξέος. Από την άλλη, τα μαλακά τυριά που έχουν ωριμάσει με βακτήρια, έχουν γενικά κόκκινες φλούδες. Κατά την ωρίμανση, συνηθίζεται να πλένονται με αλατισμένο νερό που, ανάλογα τον παραγωγό, περιέχει ή όχι συγκεκριμένες πρόσθετες ουσίες. Ο φλοιός αποτελείται γενικά από *Actinobacteria* (Gerald et al., 2018).

2.2 Επιπολασμός *Listeria monocytogenes* στο γάλα

Οι Fleming et al. (1988) το 1988 ανέφεραν *L. monocytogenes* στο 2% του παστεριωμένου γάλακτος στη Μασαχουσέτη, αλλά πριν από αυτό, ο Weis (1975) επιβεβαίωσε ότι το *L. monocytogenes* είναι ένας αιτιολογικός παράγοντας μαστίτιδας στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, που μπορεί να οδηγήσει σε μόλυνση του γάλακτος που απεκκρίνεται. Από τότε, διεξήχθη μια σειρά μελετών για το *L. monocytogenes* στο γάλα

και στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται τα αποτελέσματα ορισμένων ερευνών σε νωπό γάλα για *L. monocytogenes*.

Πίνακας 4: Επιπολασμός *L. monocytogenes* στο νωπό γάλα με βάση την παρουσία / απουσία του *L. monocytogenes* που ανιχνεύθηκε σε 25 g ή ml

Συνολικά δείγματα	Θετικά δείγματα	Επιπολασμός	Προέλευσης	Αναφορά
137	6	4.4	Ολλανδία	Beckers et al., 1987
176	27	15.3	Β. Ιρλανδία	Harvey and Gilmour, 1992
589	29	4.9	Ιρλανδία	Rea et al., 1992
774	28	3.6	Ισπανία	Gaya et al., 1998
295	58	19.7	Σουηδία	Waak et al., 2002
143	9	6.3	Βέλγιο	De Reu et al., 2004
24	1	4.2	Ιρλανδία	Fox et al., 2009
230	0	0	Αυστρία	Schoder et al., 2011
297	2	0.7	Νέα Ζηλανδία	Hill et al., 2012
446	97	21.7	Ιράν	Jamali et al., 2013
468	11	2.4	Γαλλία	Meyer-Broseta et al., 2003
182	10	5.5	Φιλανδία	Ruunsumen et al., 2013
3761	278	7.4	Συνολικά	–

Πηγή: Wemmenhove et al., 2021

Τα ποσοστά μόλυνσης αναφέρθηκαν στο νωπό γάλα έως και 45% στην Ισπανία και 12% στις ΗΠΑ (Fenlon et al., 1989). Βραζιλιάνος ερευνητής διεξήγαγε έρευνα από τον Οκτώβριο 1989-1990 σχετικά με τη συχνότητα εμφάνισης *Listeria* spp. σε ωμό και παστεριωμένο γάλα και βρέθηκε *Listeria* spp. στο 12,7% των δειγμάτων νωπού γάλακτος και περίπου στο 0,9% των δειγμάτων παστεριωμένου γάλακτος (Moura et al., 1993). Διεξήχθη ένας αριθμός μελετών σχετικά με τον επιπολασμό των *L. monocytogenes* και *Listeria* spp. σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. Για παράδειγμα, το 2004, διεξήχθη μια μελέτη στην Τσεχική Δημοκρατία, η οποία δήλωσε συνολικό ποσοστό μόλυνσης 2,6% με *L. monocytogenes* σε δείγματα γάλακτος, το οποίο οφειλόταν στη μόλυνση του γάλακτος με χώμα πριν από την παστερίωση (Navratilova et al., 2004). Μια άλλη μελέτη που δημοσιεύθηκε το ίδιο έτος στη Βόρεια Ιρλανδία βασίστηκε σε μια έρευνα που διεξήχθη διάρκειας ενός έτους σε εργοστάσιο επεξεργασίας γάλακτος στην οποία ο ερευνητής διαπίστωσε τη μόλυνση με *Listeria* spp. στο 44,4% του νωπού γάλακτος και στο 5,6% των δειγμάτων παστεριωμένου γάλακτος όπου η *L. monocytogenes* αποτελούσε το 22% των

ακατέργαστων δειγμάτων. Ωστόσο, δεν ανιχνεύθηκε σε δείγματα παστεριωμένου γάλακτος (Kells et al., 2004).

Έρευνα που διεξήχθη στη Λετονία σε διάφορες φάρμες σε ολόκληρη τη χώρα έδειξε ότι *Listeria* spp. βρέθηκε κυρίως στο νωπό γάλα που παρασκευάζεται με συμβατικό τρόπο. Επίσης στην ίδια μελέτη το βακτήριο *L. monocytogenes* απομονώθηκε κυρίως από χύμα γάλα από βιολογική φάρμα γαλακτοπαραγωγής, αλλά ο επιπολασμός της μόλυνσης ήταν τρεις φορές υψηλότερος σε δείγματα γάλακτος συμβατικών γαλακτοκομικών εκμεταλλεύσεων, 33 έναντι 211 δειγμάτων, αντίστοιχα (Konosonoka et al., 2012; Shamloo et al., 2019).

Οι άνθρωποι χρησιμοποιούν κατσικίσιο και πρόβειο γάλα ως εναλλακτική λύση για τη διατροφή των βρεφών που δεν μπορούν να ανεχθούν αγελαδινό γάλα λόγω αλλεργίας. Επιπλέον, το αιγοπρόβειο γάλα έχει μεγαλύτερη θρεπτική αξία από το αγελαδινό. Αποδείχθηκε ότι η *Listeria* spp. βρίσκονται στο 5,6% των δειγμάτων αιγοπρόβειου γάλακτος και στο 3,9% των δειγμάτων πρόβειου γάλακτος, στα οποία το 33,3 και το 25% από αυτά ανήκαν στο *L. monocytogenes* αντίστοιχα. Αντίστοιχα, οι συνθήκες υγιεινής των μηχανών αρμέγματος και η δημόσια υγεία θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για την αποφυγή της μόλυνσης (Osman et al., 2014). Σε μια μελέτη που διεξήχθη στην Αιθιοπία, ο επιπολασμός της *Listeria* spp. στο νωπό γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα ήταν 28,4%, όπου το 5,6% από αυτά ανήκε στη *L. monocytogenes*. Είναι ενδιαφέρον ότι οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι το νωπό γάλα είχε τη χαμηλότερη μόλυνση μεταξύ άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων (18,9%), ενώ ο επιπολασμός της μόλυνσης στο παστεριωμένο γάλα ήταν περίπου 40% (Seyoum et al., 2015). Αν και η παστερίωση θα μπορούσε να μειώσει την πιθανότητα μόλυνσης, δεν μπορεί να εξαλείψει εντελώς την απειλή, καθώς μια έκθεση από τη Φινλανδία έδειξε ότι το γάλα θα μπορούσε να μολυνθεί μέσω των επόμενων σταδίων παστερίωσης (Lyytikäinen et al., 2000). Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι ο επιπολασμός του *L. monocytogenes* στο εμφιαλωμένο νωπό γάλα ήταν υψηλότερος από το φρέσκο χύμα γάλα της δεξαμενής (4,8% έναντι 1,7%). Ο επιπολασμός των βακτηρίων στα φίλτρα γάλακτος ήταν περίπου 39%. Εξέτασαν την επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* και διαπίστωσαν ότι η διατήρηση του γάλακτος σε θερμοκρασία ψυγείου θα μπορούσε να μειώσει τη συχνότητα μόλυνσης στο γάλα. Η πιο πρόσφατη αναφορά από το Ιράν ήταν από το Ισφαχάν στην οποία διαπίστωσαν ότι ο επιπολασμός

της *Listeria* spp. στο νωπό γάλα, το παγωτό, την κρέμα γάλακτος και το χυλό ήταν 5,49%, 19,04%, 11,11% και 4%, αντίστοιχα. Ωστόσο, δεν ανίχνευσαν *Listeria* spp. σε γιαούρτι, βούτυρο και τυρί. Σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές από το Ιράν, κυρίαρχο είδος *Listeria* ήταν το *L. innocua* και το *L. monocytogenes* με επιπολασμό 5,44% και 1,36% αντίστοιχα (Shamloo et al., 2015; Sayevand et al., 2018)

2.3 Επιβίωση μικροοργανισμού στα μαλακά άσπρα τυριά

Τα περισσότερα τυριά προορίζονται για έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα και δεν υποβάλλονται σε στάδιο θέρμανσης πριν από την κατανάλωση. Τα έτοιμα προς κατανάλωση τυριά μπορούν να παρασκευαστούν από παστεριωμένο γάλα ή από νωπό γάλα. Διάφορα τυριά, κυρίως μαλακού τύπου, τυριά με μύκητες έχουν συνδεθεί με περιπτώσεις λιστερίωσης. Αν το *L. monocytogenes* υπάρχει έστω και σε μικρές συγκεντρώσεις στο νωπό γάλα, τα παραγόμενα τυριά, αν παραχθούν από μη επεξεργασμένο γάλα, μπορούν να αποτελούν κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξη του βακτηρίου και η κατανάλωσή τους μπορεί να είναι επικίνδυνη. Πρόκειται για ένα βακτήριο που, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι ικανό να διατηρηθεί ζωντανό και σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμη και να αναπτυχθεί, σε περιβάλλον με χαμηλό pH, σε θερμοκρασίες ψύξης και σε υψηλή συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου (% NaCl), να σχηματίσει βιοφίλμ.

Με άλλα λόγια μπορεί να αναπτυχθεί κατά την διαδικασία παραγωγής ενός τυριού. Ωστόσο, η θερμική επεξεργασία (παστερίωση) συνήθως είναι επαρκής τεχνολογία για τη θανάτωση των αυτών των παθογόνων βακτηρίων και για την ασφαλή κατανάλωση των τυριών που παράγονται (Wemmenhove et al., 2021).

Οι Wemmenhove et al (2021) αξιολόγησαν την ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes* σε 10 τυριά διαφορετικού τύπου (καμαμπέρ, τσένταρ, cottage, Emmental, φέτα, gouda, μοτσαρέλα (υψηλή υγρασία), queso fresco και ricotta). Οι ερευνητές έλαβαν υπόψη τη συγκέντρωση του αδιάσπαστου γαλακτικού οξέος, του pH, του a_w και της θερμοκρασίας αποθήκευσης των τυριών. Παρατήρησαν ότι η αναστολή αυτών των παθογόνων βακτηρίων πραγματοποιείται σε κάθε περιβάλλον με τη συμβολή όλων των παραγόντων, με το αδιάσπαστο γαλακτικό οξύ να είναι η βασική παράμετρος αναστολής (Wemmenhove et al., 2021).

Πίνακας 5: Περιπτώσεις κρουσμάτων λιστερίωσης από τυρί κατά τη χρονολογική περίοδο 1983-2019

Έτος	Είδος τυριού	Περιπτώσεις	Ποσοστό θνησιμότητας των κρουσμάτων	Αναφορά
1983–1987	Μαλακό τυρί από νωπό γάλα	122	27	Bula et al., 1995
1985	Μαλακά τυριά μεξικανικού τύπου	142	34	Linnan et al., 1988
1989	Camembert	2	0	Ries et al., 1990
1989/1990	Blue cheese	26	23	Jensen et al., 1994
1995	Brie de Meaux	NR	NR	Goulet et al., 1995
1995	Μαλακό τυρί	37	30	Vaillant et al., 1998
1997	Μαλακό τυρί	14	0	Jacquet et al., 1999
1997	Μαλακό τυρί	NR	NR	RNSP, 1997
2000	Μαλακό τυρί μεξικανικού τύπου	13	0	Catwright et al., 2013
2001	Μαλακό τυρί	33	0	Carrique-Mas et al., 2003
2001	Μαλακό τυρί	120	Άγνωστο	Danielsson-Tham et al., 2004
2001	Τυρί	19	0	Makino et al., 2005
2002	Τυρί από παστεριωμένο γάλα	86	0	Pagotto et al., 2006
2003	Μαλακό τυρί από νωπό γάλα	17	0	Gaulin et al., 2003
2005	Τυρί μεξικανικού τύπου	23	22	MacDonald et al., 2005
2005	Queso fresco	9	Άγνωστο	FIOD, 2005
2005	Τυρί Tomme	10	50	Bille et al., 2006
2006	Μαλακό τυρί	189	14	Koch et al., 2010
2006	Μαλακό τυρί	78	17	EFSA, 2007
2009-2012	Queso fresco	30	37	Magalhaes et al., 2015
2014	Μαλακό τυρί	5	20	CDC, 2014
2017	Τυρί για επάλειψη	8	25	CDC, 2017
2019	Τυρί σε φέτες Deli (ύποπτο)	10	10	CDC, 2019

Πηγή: Wemmenhove et al., 2021

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ *Listeria monocytogenes*

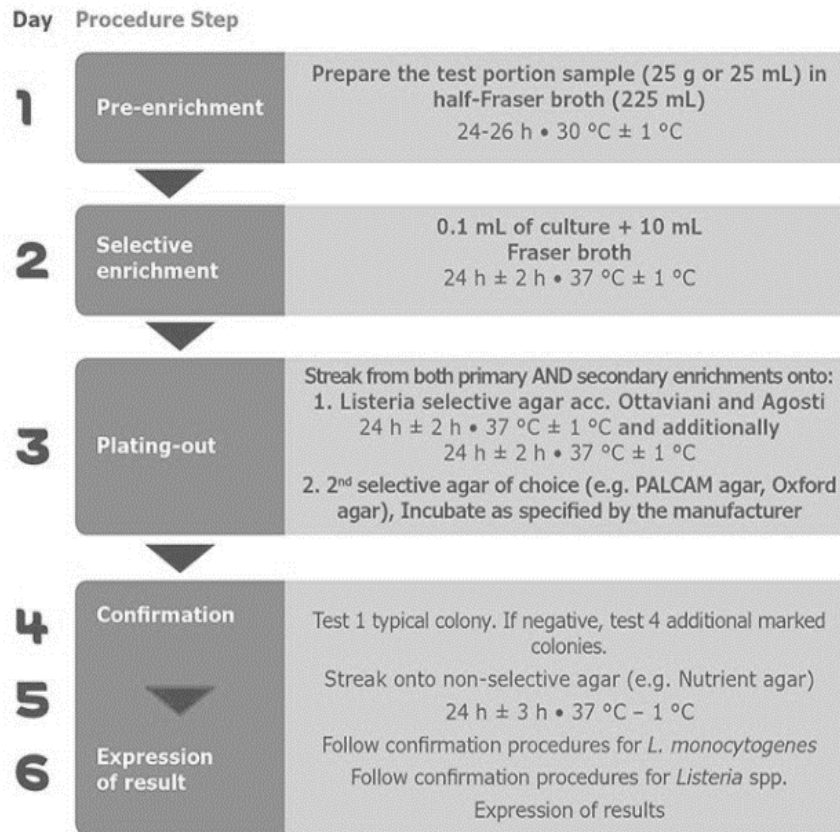
3.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση *Listeria monocytogenes*

3.1.1 Μέθοδος ISO 11290-1:2017

Η απομόνωση του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* μπορεί να πραγματοποιηθεί με την εφαρμογή μεθόδων καλλιέργειας που βασίζονται σε επιλεκτικό εμπλουτισμό του υποστρώματος και στη συνέχεια σε επώαση. Μία μέθοδος που χρησιμοποιείται, όχι μόνο για την απομόνωση, αλλά και την ταυτοποίηση του βακτηρίου είναι η ISO 11290 -1: 2017. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για προϊόντα ανθρώπινης κατανάλωσης, αλλά και για προϊόντα που προορίζονται για τη διατροφή των ζώων. Επίσης χρησιμοποιείται σε δείγματα του περιβάλλοντος στον τομέα παραγωγής και χειρισμού τροφίμων (ISO, 2022).

Στην **Εικόνα 3**, παρουσιάζονται εν συντομία τα κυριότερα βήματα της μεθόδου. Είναι μία διαδικασία που διαρκεί έξι 24ώρα, δηλαδή έξι ημέρες.

- **1.** Προ – εμπλουτισμός. Προετοιμασία δειγμάτων 25 g ή 25 ml, σε ζωμό half-Fraser (225 ml). Ακολουθεί επώαση για 25 h ± 1h, στους 30°C ± 1°C. Τα βήματα είναι τα ακόλουθα:
- **2.** Επιλεκτικός εμπλουτισμός. Προσθήκη 0,1ml καλλιέργειας σε 10 ml ζωμό Fraser. Επώαση για 24 h ± 2 h, στους 37°C ± 1°C.
- **3.** Εξάπλωση με κρίκο εμβολιασμού στην επιφάνεια των τρυβλίων από το υλικό του εκλεκτικού εμπλουτισμού στους ακόλουθους δυο τύπους τρυβλίων:
 - *Listeria selective agar* (ALOA) - 24 h ± 2 h, στους 37°C ± 1°C
 - Palcam ή Oxford agar - 24 h ± 2 h, στους 37°C ± 1°C
- **4.** Διαδικασία ταυτοποίησης των αποικιών χαρακτηριστικής εμφάνισης από το τρυβλία.



Εικόνα 3: Σύντομο διάγραμμα περιγραφής της μεθόδου ISO 11290 - 1:2017

Πηγή: <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/protocol/food-and-beverage-testing-and-manufacturing/regulatory-compliance-for-food-and-beverage/listeria-detection-food-chain-iso-11290>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

4.1 Υλικά και εξοπλισμός

Τα υλικά και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη ήταν τα ακόλουθα.

4.1.1 Υλικά

- **Υποστρώματα:** Χρησιμοποιήθηκαν δύο υποστρώματα
 - Τροποποιημένο υγρό MRS (broth)** από το οποίο είχε αφαιρεθεί το οξικό νάτριο – το οποίο παρεμποδίζει την ανάπτυξη του *L. monocytogenes*. Στο συγκεκριμένο υπόστρωμα ήταν εφικτό να αναπτυχθούν και οξυγαλακτικά βακτήρια και *L. monocytogenes*.
 - MRS agar το οποίο είναι εκλεκτικό για την απομόνωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων.
 - OXOID agar εκλεκτικό για την απομόνωση των βακτηρίων *L. monocytogenes*.
- **Eppendorf:** φιαλίδια Eppendorf (**Εικ. 3.1**)
- **Αλάτι:** Χρησιμοποιήθηκε NaCl εργαστηριακής καθαρότητας για την ρύθμιση της ενεργότητας νερού (a_w).
- **HCl:** Η ρύθμιση του pH έγινε με HCl 0.1 N.
- **Γυάλινα φιαλίδια:** Γυάλινα φιαλίδια με κατάλληλο πώμα (**Εικόνα 3.2**)
- **Μικροοργανισμοί:** Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι 3 μικροοργανισμοί:
 - Lactobacillus lactis*
 - Bifidobacterium longum*
 - Listeria monocytogenes*

Από προηγούμενες αναλύσεις είχαν διαπιστωθεί ότι τα παραπάνω στελέχη παράγαν τα ακόλουθα οργανικά οξέα:

- <i>Lactobacillus lactis</i> :	Γαλακτικό οξύ	Οξικό οξύ	
- <i>Bifidobacterium longum</i> :	Γαλακτικό οξύ	Οξικό οξύ	Προπιονικό οξύ
- <i>Listeria monocytogenes</i> :	Γαλακτικό οξύ	Οξικό οξύ	

4.1.2 Εξοπλισμός

- **Μηχανικές μικροπιπέτες:** Χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες αυτόματου μεταβλητού όγκου (0,2-20μl) / (0,1-100μl) (100-1000μl) (Εικ. 3.5), για την προσθήκη διαφόρων ποσοτήτων μέσα στις πλάκες μικροτιτλοδότησης. Το κάθε φρεάτιο του microplate έχει πλήρη χωρητικότητα 400μl, από αυτά ο όγκος του μέσου καλλιέργειας ήταν 320 μl και του εμβολίου 32 μl.
- **pHμετρο:** Η μέτρηση του pH έγινε μέσω ειδικού ηλεκτρόδιου που έχει κάθε πεχάμετρο (Εικ. 3.6). Χρησιμοποιήθηκε για την ρύθμιση της pH του υποστρώματος ανάπτυξης.
- **Μικροζυγός ακριβείας:** ο ζυγός ακριβείας (Εικ. 3.7) χρησιμοποιήθηκε για να ζυγιστούν με ακρίβεια όλες οι ποσότητες NaCl για την ρύθμιση της ενεργότητας του νερού.
- **Κλίβανοι:** Οι κλίβανοι (Εικ. 3.8) χρησιμοποιήθηκαν για την επώαση των τρυβλίων Eppendorf.

4.2 Μέθοδοι

4.2.1 Προετοιμασία υποστρωμάτων

Αρχικά προετοιμάστηκαν οι ακόλουθοι δεκαέξι (16) συνδυασμοί pH/ NaCl

		NaCl			
		0.5	0.7	1.0	1.4
pH	5.0	5.0/ 0.5	5.0/ 0.7	5.0/ 1.0	5.0/1.4
	5.3	5.3/ 0.5	5.3/ 0.7	5.3/ 1.0	5.3/1.4
	5.6	5.6/ 0.5	5.6/ 0.7	5.6/ 1.0	5.6/1.4
	5.9	5.9/ 0.5	5.9/ 0.7	5.9/ 1.0	5.9/1.4

Αρχικά ζυγίζονταν η κατάλληλη ποσότητα NaCl και κατόπιν διαλύονταν σε κατάλληλη ποσότητα του θρεπτικού υγρού και κατόπιν με HCl ρυθμίζονταν στην επιθυμητή τιμή pH. Ακολουθούσε αποστείρωση του διαλύματος μέσω μικροδιήθησης με αποστειρωμένα φίλτρα.

4.2.2 Προετοιμασία των εμβολίων

Η προετοιμασία των εμβολίων έγινε ως εξής: Από τους -80°C ποσότητα καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε θρεπτικό ζωμό και ακολούθησε επώαση για 48 h στους 37°C. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις και καταμέτρηση των αποικιών στα κατάλληλα τρυβλία.

4.2.3 Εμβολιασμός

Καλλιέργειες αναπτύχθηκαν στα κατάλληλα υγρά υποστρώματα υπό τις κατάλληλες συνθήκες και μετά από διαδοχικές αραιώσεις καταμετρήθηκαν οι πληθυσμοί τους. Από τις κατάλληλες κάθε φορά διαδοχικές αραιώσεις λαμβάνονταν 32 μL και μεταφέρονταν σε 320 μL τροποποιημένου MRS. Οι συνδυασμοί πληθυσμών που επιλέχθηκαν ήταν:

a]		<i>Lactobacillus lactis</i>	-	<i>L. monocytogenes</i>
a1	αρχικό φορτίο	10^3 cfu/ml		10^2 cfu/ml
a2	αρχικό φορτίο	10^6 cfu/ml		10^2 cfu/ml

και

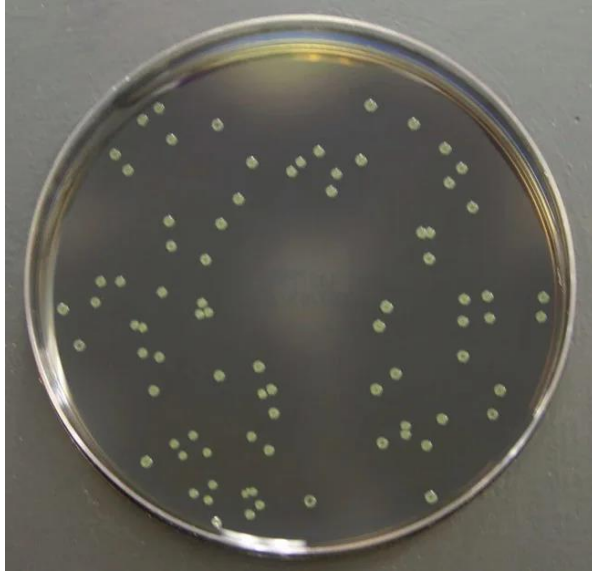
b]		<i>Bifidobacterium longum</i>		<i>L. monocytogenes</i>
b1	αρχικό φορτίο	10^2 cfu/ml		10^2 cfu/ml
b2	αρχικό φορτίο	10^6 cfu/ml		10^2 cfu/ml

Σε όλες τις περιπτώσεις το αρχικό εμβόλιο του *L. monocytogenes* ήταν 10^2 cfu/mL.

4.2.4 Επώαση και συλλογή δειγμάτων

Όλα τα microplate επώαστηκαν στους 37°C για 48h. Κάθε ένας από τους συνδυασμούς pH/NaCl παράχθηκε εις τετραπλούν σε μικροβοθρία των 352 μL x 4, δηλαδή κάθε συνδυασμός ήταν διαθέσιμος συνολικά σε $352 \times 4 = 1408$ μL δηλαδή περίπου 1.4 mL.

Με μικροπιπέτα λαμβάνονταν το περιεχόμενο από κάθε βοθρίο, περίπου 350 μL και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στα 3000 rpm/ 5 min. Το υπερκείμενο υγρό συλλέγονταν και μετρούνταν η τιμή pH ενώ στο Eppendorf μετά την φυγοκέντρηση προσθέτονταν 1 mL LEB (Buffered Listeria enrichment broth). Τα Eppendorf παρέμεναν για επώαση στους 30°C / 4 h. Κατόπιν σε κάθε ένα από αυτά προστίθονταν 2 μL Listeria Selective Enrichment Supplement) και ακολουθούσε επώαση στους 30°C / 48 h. Κατόπιν, με το πέρας της επώασης με κρίκο εμβολισμού μεταφέρονταν ποσότητα του εμπλουτισμένου δείγματος σε τρυβλία με εκλεκτικό υπόστρωμα OXOID. Η τυπική εμφάνιση των αποικιών είναι γκρι χρώματος με μαύρη περιφερειακή ζώνη γύρω από την περιφέρεια.



Εικόνα 4: Τυπική εμφάνιση αποικιών *L. monocytogenes* στο εκλεκτικό υπόστρωμα OXOID (Πηγή: <https://www.fishersci.se/shop/products/listeria-selective-agar-oxford-formulation/12912598>)

Η εμφάνιση αποικιών αυτού του χρώματος στην επιφάνεια των τρυβλίων OXOID σημαίνει ότι επιβίωση κυττάρων *L. monocytogenes* στα δείγματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ήταν διαθέσιμα δυο στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων, το *Bifidobacterium longum* (C 308) και το *Lactobacillus lactis* (C 609) τα οποία είχαν απομονωθεί από μαλακά τυριά τυρογάλακτος. Από αναλύσεις πρότερων ερευνών είχε διαπιστωθεί ότι το στέλεχος *Bifidobacterium longum* (C 308) παρήγαγε τα οργανικά οξέα, κατά σειρά φθίνουσας συγκέντρωσης: γαλακτικό, οξικό και προπιονικό οξύ ενώ το οξυγαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus lactis* C 609 παρήγαγε γαλακτικό και οξικό αλλά όχι προπιονικό οξύ. Επίσης ήταν διαθέσιμο στέλεχος *L. monocytogenes*.

Ο στόχος της εργασίας ήταν να μελετηθεί η επιβίωση πληθυσμού *L. monocytogenes* σε συγκαλλιέργεια με δύο LAB καλλιέργειες. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν: (α) μέγεθος/ πληθυσμός εμβολίων και (β) είδος βακτηρίων.

Μια βασική διαφορά των δύο οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι ότι το *Bifidobacterium longum* C 308 παράγει τρία ασθενή οργανικά οξέα, γαλακτικό, οξικό και προπιονικό ενώ το *Lactobacillus lactis* C 609 παράγει γαλακτικό και οξικό.

a]	<i>Lactobacillus lactis</i>	-	<i>L. monocytogenes</i>
a1	αρχικό φορτίο	10^3 cfu/ml	10^2 cfu/ml
a2	αρχικό φορτίο	10^6 cfu/ml	10^2 cfu/ml

και

b]	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	<i>L. monocytogenes</i>
b1	αρχικό φορτίο	10^2 cfu/ml	10^2 cfu/ml
b2	αρχικό φορτίο	10^6 cfu/ml	10^2 cfu/ml

Η επιλογή του αρχικού πληθυσμού *L. monocytogenes* στο επίπεδο των 100 cfu/ml – το οποίο είναι χαμηλό – οφείλεται στο γεγονός ότι λαμβάνονται μέτρα έναντι των παθογόνων βακτηρίων οπότε δεν θα πρέπει να θεωρείται πολύ πιθανό να βρίσκεται σε υψηλούς πληθυσμούς σε ένα τρόφιμο.

Στον Πίνακα 6 παρατηρούμε ότι σε όλες τους συνδυασμούς που δοκιμάστηκαν δεν επιτεύχθηκε η θανάτωση του *L. monocytogenes*. Οι τελικές τιμές pH κυμάνθηκαν από 4.17 έως 4.76.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Δίδονται οι αρχικές συνθήκες του υποστρώματος (Nutrient Broth – NB) σε pH (5.0, 5.3, 5.6, 5.9) και συγκέντρωση σε NaCl (0.5%, 0.7%, 1.0%, 1.4% w/v) σε τριάδες δειγμάτων. Επίσης παρουσιάζονται οι τελικές τιμές pH κάθε δείγματος – καθώς και ο μέσος όρος (Μ.Ο.) – που είχε εμβολιαστεί με το συνδυασμό *L. monocytogenes* – *Lactobacillus lactis* C 609/ $10^2 - 10^2$ cfu/mL και μετά από 48h επώαση στους 37°C. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται τα δείγματα όπου ανιχνεύθηκε η παρουσία *L. monocytogenes* και με λευκό χρώμα τα δείγματα στα οποία δεν ανιχνεύθηκε το βακτήριο.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ pH	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ NaCl			ΤΕΛΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ pH			Μ.Ο.	SD
	0.5	0.7	1.0	0.5	0.7	1.0		
5.0	0.5	0.5	0.5	4.41	4.42	4.25	4.36	0.09
	0.7	0.7	0.7	4.59	4.36	4.42	4.46	0.11
	1.0	1.0	1.0	4.52	4.45	4.58	4.52	0.06
	1.4	1.4	1.4	4.77	4.71	4.79	4.76	0.04
5.3	0.5	0.5	0.5	4.58	4.55	4.62	4.58	0.03
	0.7	0.7	0.7	4.65	4.61	4.65	4.64	0.02
	1.0	1.0	1.0	4.71	4.72	4.77	4.73	0.03
	1.4	1.4	1.4	4.81	4.72	4.67	4.73	0.06
5.6	0.5	0.5	0.5	4.23	4.15	4.18	4.19	0.04
	0.7	0.7	0.7	4.32	4.13	4.28	4.24	0.09
	1.0	1.0	1.0	4.19	4.27	4.32	4.26	0.06
	1.4	1.4	1.4	4.23	4.27	4.29	4.26	0.03
5.9	0.5	0.5	0.5	4.19	4.22	4.16	4.19	0.03
	0.7	0.7	0.7	4.19	4.26	4.17	4.21	0.04
	1.0	1.0	1.0	4.22	4.19	4.11	4.17	0.05
	1.4	1.4	1.4	4.47	4.52	4.49	4.49	0.02

Είναι σαφής η τάση ότι όσο πιο χαμηλή είναι η αρχική τιμή pH του υποστρώματος τόσο πιο χαμηλή είναι η μεταβολή του pH (Δ pH).

Στον Πίνακα 7 έχουν μεταβληθεί η συνθήκες και στην περίπτωση αυτή ο αρχικός πληθυσμός του οξυγαλακτικού βακτηρίου έχει αυξηθεί σημαντικά και συγκεκριμένα κατά 4 τάξης μεγέθους – από 100 cfu/mL σε 1000000 cfu/mL. Οι τελικές τιμές pH κυμάνθηκαν από 3.97 έως 4.29. Στην σειρά αυτή πειραμάτων διαπιστώθηκε η θανάτωση των κυττάρων *L. monocytogenes* στις ακόλουθες περιπτώσεις: (α) αρχική τιμή pH 5.6 και τελικές 4.21 και 4.24 και (β) αρχική τιμή pH 5.9 και τελικές τιμές 4.15 και 3.97. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως ότι παρόμοιες τελικές τιμές pH είχαν παρατηρηθεί και σε άλλους συνδυασμούς όπως: αρχικό pH-NaCl/ 5.0-0.5% τελική τιμή 4.19 καθώς και pH-NaCl/ 5.3-1.0% τελική τιμή 4.18.

Δυο πιθανές εξηγήσεις για το φαινόμενο αυτό είναι οι εξής: (α) οι αρχικές τιμές pH, 5.0 και 5.3, ήταν λιγότερο ευνοϊκές για την ανάπτυξη της οξυγαλακτικής καλλιέργειας σε σύγκριση με τις τιμές 5.6 και 5.9. Πιθανόν σε αυτές τις τιμές η ανάπτυξη της οξυγαλακτικής καλλιέργειας να ήταν ισχυρή και τελικά να στέρησε από διατροφικούς πόρους το

βακτήριο *L. monocytogenes* το οποίο άλλωστε ήταν σε πολύ χαμηλό πληθυσμό. Μια άλλη εξήγηση, η οποία να ισχύει ταυτόχρονα με την (α) είναι ότι στις περιπτώσεις όπου διαπιστώθηκε θανάτωση του *L. monocytogenes* η συγκέντρωση του NaCl ήταν 1.0% και 1.4%. Πιθανόν λοιπόν ο συνδυασμός χαμηλού pH, διαειδικού ανταγωνισμού – δηλαδή μεταξύ *Lactobacillus lactis* και *Listeria monocytogenes* για πόρους και συγκέντρωσης NaCl να οδήγησε στην εξαφάνιση του δυνητικά παθογόνου βακτηρίου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Δίδονται οι αρχικές συνθήκες του υποστρώματος (Nutrient Broth – NB) σε pH (5.0, 5.3, 5.6, 5.9) και συγκέντρωση σε NaCl (0.5%, 0.7%, 1.0%, 1.4% w/v) σε τριάδες δειγμάτων. Επίσης παρουσιάζονται οι τελικές τιμές pH κάθε δείγματος – καθώς και ο μέσος όρος (Μ.Ο.) – που είχε εμβολιαστεί με το συνδυασμό *L. monocytogenes* – *Lactobacillus lactis*/ 10^2 – 10^6 cfu/mL και μετά από 48h επώαση στους 37°C. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται τα δείγματα όπου ανιχνεύθηκε η παρουσία *L. monocytogenes* και με λευκό χρώμα τα δείγματα στα οποία δεν ανιχνεύθηκε το βακτήριο.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ pH	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ NaCl			ΤΕΛΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ pH			AV	SD
	0.5	0.7	1.0	0.5	0.7	1.0		
5.0	0.5	0.5	0.5	4.21	4.22	4.15	4.19	0.03
	0.7	0.7	0.7	4.29	4.30	4.28	4.29	0.01
	1.0	1.0	1.0	4.21	4.22	4.29	4.24	0.04
	1.4	1.4	1.4	4.19	4.23	4.31	4.24	0.05
5.3	0.5	0.5	0.5	4.18	4.15	4.22	4.18	0.03
	0.7	0.7	0.7	4.25	4.26	4.15	4.22	0.05
	1.0	1.0	1.0	4.21	4.17	4.19	4.19	0.02
	1.4	1.4	1.4	4.29	4.21	4.26	4.25	0.04
5.6	0.5	0.5	0.5	4.13	4.15	4.11	4.13	0.02
	0.7	0.7	0.7	4.02	4.13	4.22	4.12	0.09
	1.0	1.0	1.0	4.19	4.21	4.22	4.21	0.01
	1.4	1.4	1.4	4.20	4.28	4.24	4.24	0.04
5.9	0.5	0.5	0.5	4.01	4.12	4.08	4.07	0.05
	0.7	0.7	0.7	4.09	4.11	4.14	4.11	0.02
	1.0	1.0	1.0	4.21	4.12	4.11	4.15	0.05
	1.4	1.4	1.4	4.05	3.98	3.89	3.97	0.07

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκαλλιέργειας του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Bifidobacterium longum* και στελέχους *L. monocytogenes* και τα δύο σε πληθυσμούς 10^2 cfu/mL. Σε αυτή τη σειρά δοκιμών διαπιστώθηκαν τρεις (3) συνδυασμοί όπου διαπιστώθηκε εξαφάνιση του στελέχους *L. monocytogenes*. Οι συνδυασμοί αυτοί ήταν: (α) pH-NaCl/ 5.3-1.4%, τελική τιμή 4.09, (β) pH-NaCl/ 5.6-1.4% τελική τιμή 4.14 και (γ) (β) pH-NaCl/ 5.6-1.4% και τελική τιμή 4.14. Το κοινό σημείο και των τριών περιπτώσεων ήταν ότι το pH < 4.15 και ότι η συγκέντρωση άλατος ήταν 1.4%.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Παρουσιάζονται οι αρχικές συνθήκες του υποστρώματος (*Nutrient Broth – NB*) σε pH (5.0, 5.3, 5.6, 5.9) και συγκέντρωση σε NaCl (0.5%, 0.7%, 1.0%, 1.4% w/v) σε τριάδες δειγμάτων. Επίσης παρουσιάζονται οι τελικές τιμές pH κάθε δείγματος – καθώς και ο μέσος όρος (M.O.) – που είχε εμβολιαστεί με το συνδυασμό *L. monocytogenes – Bifidobacterium longum C 308/ 10² – 10² cfu/mL* και μετά από 48h επώαση στους 37°C. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται τα δείγματα όπου ανιχνεύθηκε η παρουσία *L. monocytogenes* και με λευκό χρώμα τα δείγματα στα οποία δεν ανιχνεύθηκε το βακτήριο.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ pH	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ NaCl			ΤΕΛΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ pH			M.O.	SD
	0.5	0.7	1.0	0.5	0.7	1.0		
5.0	0.5	0.5	0.5	4.31	4.28	4.22	4.27	0.04
	0.7	0.7	0.7	4.40	4.45	4.36	4.40	0.04
	1.0	1.0	1.0	4.47	4.45	4.38	4.43	0.04
	1.4	1.4	1.4	4.51	4.41	4.48	4.47	0.05
5.3	0.5	0.5	0.5	4.32	4.41	4.32	4.35	0.05
	0.7	0.7	0.7	4.52	4.41	4.44	4.46	0.05
	1.0	1.0	1.0	4.71	4.72	4.77	4.73	0.03
	1.4	1.4	1.4	4.01	4.12	4.13	4.09	0.06
5.6	0.5	0.5	0.5	4.23	4.35	4.18	4.25	0.08
	0.7	0.7	0.7	4.32	4.13	4.28	4.24	0.09
	1.0	1.0	1.0	4.19	4.27	4.32	4.26	0.06
	1.4	1.4	1.4	4.03	4.17	4.22	4.14	0.09
5.9	0.5	0.5	0.5	4.19	4.22	4.16	4.19	0.03
	0.7	0.7	0.7	4.19	4.26	4.17	4.21	0.04
	1.0	1.0	1.0	4.22	4.19	4.11	4.17	0.05
	1.4	1.4	1.4	4.12	4.12	4.19	4.14	0.04

Στον **Πίνακα 9** παρουσιάζονται οι συνδυασμοί συγκαλλιέργειας *L. monocytogenes – Bifidobacterium longum C 308/ 10² – 10⁶ cfu/mL* μετά από 48 h επώασης στους 37°C. Στην συγκεκριμένη περίπτωση εντοπίστηκαν εννέα (9) συνδυασμοί στους οποίους έστω και μία φορά από τον σύνολο των τριών επαναλήψεων εξαφανίστηκε το *L. monocytogenes*. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις η τιμή pH ήταν χαμηλότερα του 4.2

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Παρουσιάζονται οι αρχικές συνθήκες του υποστρώματος (*Nutrient Broth – NB*) σε pH (5.0, 5.3, 5.6, 5.9) και συγκέντρωση σε NaCl (0.5%, 0.7%, 1.0%, 1.4% w/v) σε τριάδες δειγμάτων. Επίσης παρουσιάζονται οι τελικές τιμές pH κάθε δείγματος – καθώς και ο μέσος όρος (Μ.Ο.) – που είχε εμβολιαστεί με το συνδυασμό *L. monocytogenes – LAB C 308/ 10² – 10⁶ cfu/mL* και μετά από 48h επώαση στους 37°C. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται τα δείγματα όπου ανιχνεύθηκε η παρουσία *L. monocytogenes* και με λευκό χρώμα τα δείγματα στα οποία δεν ανιχνεύθηκε το βακτήριο.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ pH	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ NaCl			ΤΕΛΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ pH			Μ.Ο.	SD
	0.5	0.7	1.0	0.5	0.7	1.0		
5.0	0.5	0.5	0.5	4.38	4.22	4.32	4.31	0.07
	0.7	0.7	0.7	4.32	4.28	4.30	4.30	0.02
	1.0	1.0	1.0	4.21	4.20	4.12	4.18	0.04
	1.4	1.4	1.4	4.09	4.17	4.14	4.13	0.04
5.3	0.5	0.5	0.5	4.22	4.17	4.27	4.22	0.04
	0.7	0.7	0.7	4.26	4.31	4.34	4.30	0.04
	1.0	1.0	1.0	3.71	3.82	3.77	3.77	0.05
	1.4	1.4	1.4	3.81	3.92	3.89	3.87	0.05
5.6	0.5	0.5	0.5	4.23	4.15	4.18	4.19	0.04
	0.7	0.7	0.7	4.22	4.33	4.28	4.28	0.05
	1.0	1.0	1.0	4.09	3.97	4.12	4.06	0.07
	1.4	1.4	1.4	4.14	4.14	4.00	4.09	0.07
5.9	0.5	0.5	0.5	4.19	4.22	4.16	4.19	0.03
	0.7	0.7	0.7	4.19	4.1	4.17	4.15	0.04
	1.0	1.0	1.0	4.22	4.19	4.11	4.17	0.05
	1.4	1.4	1.4	3.97	4.03	3.99	4.00	0.03

Τα αίτια αναστολής του βακτηρίου *L. monocytogenes* μπορεί να είναι περισσότερα από ένα. Είναι γνωστό εδώ και πολλές δεκαετίες ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν – κατά περίπτωση – πλήθος αντιμικροβιακών ενώσεων όπως οργανικά οξέα, διακετύλιο, υπεροξειδίο του υδρογόνου, αντιμικροβιακά βιομόρια, και βακτηριοσίνες (Egan et al., 2016). Με βάση τα προϊόντα του μεταβολισμού τους και συγκεκριμένα τα ασθενή οργανικά τους οξέα διακρίνονται σε ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά.

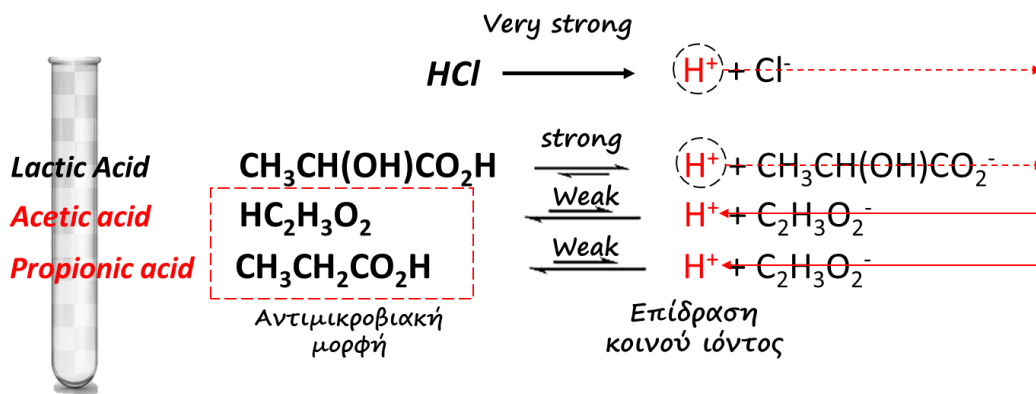
Τα ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) έχουν το γαλακτικό οξύ ως το κύριο μεταβολικό προϊόν, μειώνουν το pH και επιτυγχάνοντας την αναστολή ανάπτυξης του *L. monocytogenes* (Martín et al., 2022). Το ετεροζυμωτικό LAB παράγει γαλακτικό οξύ και άλλες ενώσεις όπως η αιθανόλη και διοξειδίο του άνθρακα (Kasra-Kermanshahi and Mobarak-Qamsari, 2015). Ο σχηματισμός διοξειδίου του άνθρακα μπορεί να οδηγήσει σε αναερόβιο περιβάλλον και διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ η αιθανόλη δρα μετουσιώνοντας τις πρωτεΐνες που χρειάζονται τα βακτήρια για να επιβιώσουν.

Πέρα όμως των παραπάνω, είναι σημαντικό να επισημανθεί και η πιθανή επίδραση του είδους των οργανικών οξέων που συμμετέχουν στην διαμόρφωση του pH. Είναι γνωστό ότι η αντιμικροβιακή δράση των οργανικών οξέων οφείλεται στην μη-ιοντική μορφή τους η οποία με τη σειρά της επηρεάζεται από τη σταθερά pK_a και την τιμή pH. Συγκεκριμένα ισχύει: Όσο μικρότερη η pK_a τόσο ισχυρότερο το οξύ και όσο ισχυρότερο το οξύ τόσο μικρότερη η αντιμικροβιακή δράση. Στην δεδομένη περίπτωση έχουμε δύο βακτήρια όπου το ένα - το *Lactobacillus lactis* – παράγει γαλακτικό και οξικό ενώ το δεύτερο - *Bifidobacterium longum* – παράγει γαλακτικό, οξικό και προπιονικό για τα οποία ισχύει η ακόλουθη σειρά ως προς την pK_a :

Γαλακτικό οξύ (pK_a : 3.86) > Οξικό οξύ (pK_a : 4.74) > Προπιονικό οξύ (pK_a : 4.88)

Οπότε με βάση τα παραπάνω, το ισχυρότερο οξύ είναι το γαλακτικό και το ασθενέστερο το προπιονικό και αντίστροφα το ισχυρότερα αντιμικροβιακά είναι το προπιονικό και ασθενέστερα αντιμικροβιακά είναι το γαλακτικό.

Στα αποτελέσματα των πειραμάτων φαίνονται περιπτώσεις όπου για την ίδια τιμή pH 4.22 στο στέλεχος *Lactobacillus lactis* δεν είχαμε αναστολή ενώ στο στέλεχος *Bifidobacterium longum* είχαμε αναστολή. Ένας πιθανός μηχανισμός ο οποίος δικαιολογεί το φαινόμενο αυτό είναι αυτός της ισορροπίας του Le Chatelier και van 't Hoff σε συνάρτηση με την επίδραση «κοινού ιόντος» όπως δίδεται στο Σχήμα Χ που ακολουθεί. Αρχικά η ρύθμιση του pH των υποστρωμάτων – πριν την επώαση – έγινε με την εφαρμογή ενός ισχυρού οξέος, του HCl το οποίο διίσταται πλήρως, συνεπώς στο υγρό της ζύμωσης ήδη υπάρχουν ιόντα H^+ . Κατά την ζύμωση του *Lactobacillus lactis* παράγεται γαλακτικό οξύ και οξικό οξύ. Το γαλακτικό ως ισχυρότερο από το οξικό διίσταται περισσότερο και εμπλουτίζει ακόμα περισσότερο το υγρό της ζύμωσης. Επίσης διίσταται και το οξικό αλλά σε λιγότερη έκταση. Καθώς όμως συγκεντρώνονται όλο και περισσότερα ιόντα υδρογόνου H^+ και με βάση την αρχή Le Chatelier και van 't Hoff καθώς και με την «επίδραση κοινού ιόντος» η ισορροπία της χημικής εξίσωσης τείνει προς την αριστερή πλευρά της, δηλαδή προς την μη-ιοντική πλευρά οπότε και ενισχύεται η αντιμικροβιακή επίδραση των οξέων.



Σχήμα: Αναπαράσταση σε σχήμα των οργανικών οξέων σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει το υγρό της ζύμωσης και της διάστασής τους

Στην περίπτωση της ζύμωσης του *Bifidobacterium longum* όπου εκεί πέρα του γαλακτικού και οξικού οξέος παράγεται και προπιονικό οξύ. Στην περίπτωση αυτή το φαινόμενο της επίδρασης «κοινού ιόντος» είναι ισχυρότερο ακόμη με το προπιονικό οξύ να «πιέζεται» περισσότερο από την αρχή της ισορροπίας και να βρίσκεται στην μη-ιοντική μορφή του, δηλαδή να είναι ισχυρότερα πιο αντιμικροβιακό.

Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι πέρα του γαλακτικού οξέος, τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν σε μικρότερες βέβαια συγκεντρώσεις οξικό οξύ. Το γαλακτικό οξύ και το οξικό οξύ είναι τα κύρια αντιμικροβιακά οργανικά οξέα λόγω της ικανότητάς τους να μειώνουν το ενδοκυτταρικό pH των παθογόνων βακτηρίων μέσω ενδοκυτταρικής διάστασης και ενδοκυτταρικής διαρροής από πορίνες ή περμεάσες (διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς). Προϋπόθεση για διαμεμβρανική μεταφορά των ασθενών οξέων στο εσωτερικό των βακτηρίων είναι να μην έχουν φορτίο και για να μην έχουν φορτίο θα πρέπει να είναι στην μη-ιοντική μορφή τους. Εφόσον όμως πρόκειται για ασθενή οργανικά οξέα η βαθμός διάστασής τους εξαρτάται από την σταθερά διαστάσεως pK_a καθώς και από το pH του οποίου τελικά η τελική του τιμή μπορεί να διαμορφώνεται από ένα ή περισσότερα οργανικά οξέα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Bergholz, T. M., den Bakker, H. C., Fortes, E. D., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2010). Salt stress phenotypes in *Listeria monocytogenes* vary by genetic lineage and temperature. *Foodborne pathogens and disease*, 7(12), 1537-1549.
2. Egan, K., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C., & Cotter, P. D. (2016). Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? *Frontiers in microbiology*, 7, 461.
3. ΕΚ 2073/2005 της ΕΕ, Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα. EL 009.001.
4. Fenlon, D. R., & Wilson, J. (1989). The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk from farm bulk tanks in North-East Scotland. *Journal of Applied Microbiology*, 66(3), 191-196.
5. Fleming, S.L. Cochi, K.L. MacDonald, et al. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis, *N Engl J Med*, 312 (1985), pp. 404-407
6. Gérard, A., El-Hajjaji, S., Niyonzima, E., Daube, G., & Sindic, M. (2018). Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in various types of cheese—A review. *International Journal of Dairy Technology*, 71(4), 825-843.
7. Hain, T., Steinweg, C., & Chakraborty, T. (2006). Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. *Journal of biotechnology*, 126(1), 37-51.
8. ISO (International Organization for Standardization). (2022). ISO 11290 – 1: 2017. Microbiology of the food chain- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – Part 1: Detection method.
9. Kells, J., & Gilmour, A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. *International journal of food microbiology*, 91(2), 167-174.
10. Konosonoka, I. H., Jemeljanovs, A., Osmane, B., Ikauniece, D., & Gulbe, G. (2012). Incidence of *Listeria* spp. in dairy cows feed and raw milk in Latvia. *International Scholarly Research Notices*, 2012.
11. Luque-Sastre, L., Arroyo, C., Fox, E. M., McMahon, B. J., Bai, L. I., Li, F., & Fanning, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Listeria* species. *Microbiology spectrum*, 6(4), 6-4.
12. Lyytikäinen, O., Autio, T., Maijala, R., Ruutu, P., Honkanen-Buzalski, T., Miettinen, M., ... & Siitonen, A. (2000). An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a

- infections from butter in Finland. *The Journal of infectious diseases*, 181(5), 1838-1841.
13. Martín, I., Rodríguez, A., Alía, A., Martínez, R., & Córdoba, J. J. (2022). Selection and characterization of lactic acid bacteria with activity against *Listeria monocytogenes* from traditional RTE ripened foods. *LWT*, 163, 113579.
 14. Martinez-Rios, V., & Dalgaard, P. (2018). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis. *Food Control*, 84, 205-214.
 15. Martinez-Rios, V., & Dalgaard, P. (2018). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis. *Food Control*, 84, 205-214.
 16. Moura, S. M., Destro, M. T., & Franco, B. D. G. D. M. (1993). Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. *International journal of food microbiology*, 19(3), 229-237.
 17. Navratilova, P., Schlegelova, J., Sustackova, A., Napravnikova, E., Lukasova, J., & Klimova, E. (2004). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in milk, meat and foodstuff of animal origin and the phenotype of antibiotic resistance of isolated strains. *Veterinární medicína*, 49(7), 243.
 18. Osman, K. M., Zolnikov, T. R., Samir, A., & Orabi, A. (2014). Prevalence, pathogenic capability, virulence genes, biofilm formation, and antibiotic resistance of *Listeria* in goat and sheep milk confirms need of hygienic milking conditions. *Pathogens and global health*, 108(1), 21-29.
 19. Sayevand, H. R., Bakhtiary, F., Pointner, A., Remely, M., Hippe, B., Hosseini, H., & Haslberger, A. (2018). Bacterial diversity in traditional dough in comparison to industrial doogh. *Current Microbiology*, 75, 386-393.
 20. Seyoum, E. T., Woldetsadik, D. A., Mekonen, T. K., Gezahegn, H. A., & Gebreyes, W. A. (2015). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw bovine milk and milk products from central highlands of Ethiopia. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(11), 1204-1209.
 21. Weis, J., & Seeliger, H. P. R. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Applied microbiology*, 30(1), 29-32.
 22. Wemmenhove, E., Wells-Bennik, M. H. J., & Zwietering, M. H. (2021). A model to predict the fate of *Listeria monocytogenes* in different cheese types—A major role for undissociated lactic acid in addition to pH, water activity, and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 357, 109350.