

Επαγωγή της κατάστασης «Ζώντα αλλά Μη Καλλιεργήσιμα-Viable But Non Culturable» σε μεμονωμένα κύτταρα *Listeria monocytogenes* και στοχαστική περιγραφή της ανάκαμψης αυτών

Μαριάννα Αρβανίτη¹, Παναγιώτης Τσακανίκας², Αρτεμης Γιαννακοπούλου¹, Παναγιώτης Σκανδάμης¹

¹ Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 118 55

² Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 118 55

Η έκθεση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε υποθανάτιες συνθήκες καταπόνησης ενδέχεται να επάγει την κατάσταση Ζώντα αλλά Μη Καλλιεργήσιμα (VBNC), στοχαστικά σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων, και με μεταβλητή ικανότητα επακόλουθης ανάκαμψης. Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν: (i) η διερεύνηση, σε επίπεδο πληθυσμού αλλά και μεμονωμένων κυττάρων, των συνθηκών επαγωγής της κατάστασης VBNC, (ii) η περιγραφή της κατανομής των καλλιεργήσιμων, VBNC (ή/και τραυματισμένων) και νεκρών κυττάρων κατά την έκθεση στη καταπόνηση και (iii) η παρακολούθηση της ανάκαμψης των μεμονωμένων κυττάρων σε πραγματικό χρόνο με time lapse microscopy. Δύο βακτηριακά στελέχη, το ScottA (ορότυπος 4b) και το EGD-e (ορότυπος 1/2a) υποβλήθηκαν σε όξινη καταπόνηση (υδροχλωρικό οξύ και οξικό οξύ) και σε καταπόνηση με τη χρήση απολυμαντικών στους 4 °C ή 20°C. Υπεροξικό οξύ (Peroxy-acetic acid-PAA) (20, 30 και 40 ppm στους 20°C, για 3 ώρες) χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της κατάστασης VBNC στον μικροοργανισμό *L.monocytogenes*, στέλεχος ScottA. Προκειμένου να διαφοροποιηθεί ο ανθεκτικός υποπληθυσμός από τον συνολικό, έγινε καταμέτρηση των πληθυσμών μετά από επιφανειακή επίστρωση και επώαση (37°C για 2 έως 5 μέρες) σε θρεπτικό μέσο Tryptic Soy Agar με 0.6% Yeast Extract (TSAYE) και 0.5% NaCl w/v (για το συνολικό πληθυσμό), συγκριτικά με TSAYE περιέχον 5% w/v NaCl, για την καταμέτρηση του τραυματισμένου ή VBNC υπο-πληθυσμού. Η παρουσία και ο πληθυσμός (CFU/ml και %) των κυττάρων VBNC προσδιορίστηκε συγκρίνοντας τα

αποτελέσματα της μεθόδου επιφανειακής επίστρωσης με εκείνα της μικροσκοπίας φθορισμού, χρησιμοποιώντας συνδυασμό των φθοροφόρων cFDA (ζώντα) και Propidium Iodide (νεκρά). Η ικανότητα της ανάκαμψης παρακολούθηθηκε μετά το πέρας της έκθεσης στην καταπόνηση επάνω σε TSAYE, στους 37 °C. Κατόπιν έκθεσης σε 40ppm, ο συνολικός πληθυσμός έχασε την καλλιεργησιμότητά του, παρόλα αυτά, τα κύτταρα παρέμειναν cFDA-θετικά (δηλαδή μεταβολικά ενεργά), εκπέμποντας πράσινο φθορισμό, υποδεικνύοντας την επαγωγή της κατάστασης VBNC. Ωστόσο τα ίδια κύτταρα δεν έδειξαν ικανότητα ανάκαμψης. Αντίθετα, κατόπιν έκθεσης σε 20 και 30 ppm PAA ο χρόνος της 1^{ης} γενεάς των υπό ανάκαμψη κυττάρων επιμηκύνθηκε (128.75±62.01 και 79.00±43.07, αντίστοιχα) συγκριτικά με μη κύτταρα μάρτυρα (47.67±55.15 λεπτά), δηλαδή κύτταρα που δεν εκτέθηκαν σε καταπόνηση. Εικόνες μικροσκοπίας μετά από 18 ώρες έδειξαν διακύμανση του δυναμικού ανάκαμψης, αποτυπώνοντας μεμονωμένα κύτταρα, που δεν είχαν διαιρεθεί, και μικρο-αποικίες με μεταβλητούς αριθμούς κυττάρων. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμβάλλουν στην εκτίμηση της κινητικής της κατάστασης VBNC, αποκαλύπτοντας τους κινδύνους κατανάλωσης τροφής που εμπεριέχει κύτταρα σε κατάσταση ληθάργου.

Λέξεις-Κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, Ζώντα αλλά Μη Καλλιεργήσιμα (VBNC) , Μικροσκοπία Φθορισμού, Ανάκαμψη

Ευχαριστίες: Αυτή η εργασία υποστηρίζεται ως μέρος της επιχορήγησης «1η Πρόσκληση για Η.Φ.Ρ.Ι. Ερευνητικά έργα για την υποστήριξη μεταδιδακτορικών Ερευνητών» από κονδύλια της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ) και του Ελληνικού Ιδρύματος Έρευνας και Καινοτομίας (HFRI).