

Αναλυτική έκθεση με δεδομένα σχετικά με τη διερεύνηση της ικανότητας των εντεροπαθογόνων βακτηρίων *Salmonella enterica* και *Staphylococcus aureus* (MRSA) να αποικίζουν και να αναπτύσσονται *in vitro* (επιφάνειες μοντέλα) και *in situ* (σε φυτικές επιφάνειες π.χ. μαρούλι, σπανάκι κ.α.) υπό διαφορετικές συνθήκες (Π6-Δ2.1)

Μεγάλες ποσότητες λαχανικών καταναλώνονται καθημερινά παγκοσμίως καθώς αποτελούν σημαντικό κομμάτι μια υγιούς και ισορροπημένης διατροφής. Ωστόσο η κατανάλωσή τους έχει συσχετιστεί με τροφιμογενείς ασθένειες. Με βάση τις υποδείξεις της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA, 2013), πρωταρχικό ρόλο παγκοσμίως αποτελεί ο έλεγχος των πράσινων φυλλωδών λαχανικών που καταναλώνονται ωμά (πράσινες σαλάτες), καθώς επιμολύνονται με το παθογόνο βακτήριο *Escherichia coli*, ενώ το παθογόνο *Salmonella* ανιχνεύεται συχνά σε φυλλώδη λαχανικά και σε τομάτες. Συγκεκριμένα αναφέρεται ότι από ένα σύνολο 394 καταγεγραμμένων περιστατικών τροφοδηλητηριάσεων από κατανάλωση τροφίμων μη ζωικής προέλευσης (FoNAO, food non-animal origin), 109 φαίνεται να συνδέονται με το παθογόνο *Salmonella* spp., και συγκεκριμένα με τους ορότυπους Agona, Durban, Enteritidis, Gustavia, Montevideo, Newport, Typhi, Typhimurium, Umbilo καθώς και μη ταυτοποιημένους ορότυπους. Ο ορότυπος Typhimurium ταυτοποιήθηκε ότι έχει συνδεθεί με τροφοδηλητηριάσεις κατά την κατανάλωση πεπονιού (honeydew), μαρουλιού, βασιλικού, σαλατών, λαχανικών και σαλάτες λαχανικών (Pui et al., 2011; ECDC, 2008; Wetzel et al., 2010; Isara et al., 2010; Sagoo et al., 2003a,b). Οι Berger et al. (2010) αναφέρουν αρκετές μελέτες που διερεύνησαν τις πιθανές πηγές επιμόλυνσης καθόλα τα στάδια της τροφικής αλυσίδας από το χωράφι (pre-harvest) και στα επόμενα στάδια μετά τη συγκομιδή (post-harvest). Κατά τα στάδια πριν τη συλλογή, παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να αποικίσουν τις καλλιέργειες. Ο ενδεχόμενος αυτός κίνδυνος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μετά τη συγκομιδή είτε από περαιτέρω επιμόλυνση ή από τον πολλαπλασιασμό των υφισταμένων παθογόνων πληθυσμών κατά την επεξεργασία και τους χειρισμούς μετά τη συγκομιδή. Έχει αναφερθεί ότι, θρεπτικά συστατικά απελευθερώνονται κατά την κοπή, τεμαχισμό σε φέτες ή αποφλοιώση που προκαλούν καταστροφή του ιστού και μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των μικροοργανισμών (Harris et al., 2003). Αυτά τα θρεπτικά συστατικά μπορούν να παραμείνουν στις επιφάνειες της βιομηχανίας και να επηρεάσουν την επιβίωση των βακτηρίων, την προσκόλληση και τη δημιουργία βιο-υμενίων, το οποίο μετέπειτα μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα της διασταυρούμενης επιμόλυνσης των φυλλωδών λαχανικών. Παρόλο που αρκετές μελέτες αναφέρονται στην ικανότητα των παθογόνων να σχηματίζουν βιο-υμενία στην επιφάνεια των φύλλων διαφορετικών φυλλωδών λαχανικών, ελάχιστες λαμβάνουν υπόψη τις μικροβιακές αλληλεπιδράσεις με την ενδογενή χλωρίδα η οποία διευκολύνει το σχηματισμό βιο-υμενίων. Λίγες δε μελέτες έχουν ασχοληθεί με την ανθεκτικότητα των μικτών βιο-υμενίων (mixed species biofilms) στην απολύμανση (Bremer et al., 2002, Chorianoopoulos et al., 2008, Fatemi and Frank, 1999, Norwood and Gilmour, 2000, Olaimat και Holley, 2012) και σχεδόν καμία με την ενδογενή χλωρίδα του φυτικού προϊόντος. Σε μια προηγούμενη μελέτη, βρέθηκε ότι η ενδογενής χλωρίδα σπανακιού φάνηκε να επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη του παθογόνου *E. coli* *in vitro* και *in situ* (Lopez-Velasco et al., 2012).

Οι Olaimat και Holley (2012) ανέφεραν συγκεντρωτικά τις μελέτες που σχετίζονται με τις πηγές επιμόλυνσης και την επιβίωση ή ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών σε φρέσκα προϊόντα. Βιβλιογραφικές μελέτες αναφέρουν την ικανότητα των παθογόνων μικροοργανισμών

*Salmonella* spp. και *E. coli* O157:H7 να εισέρχονται σε πολλά διαφορετικά φυτά, ενώ αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει τους τρόπους της ενδεχόμενης επιμόλυνσης πριν από τη συγκομιδή και την επακόλουθη εισχώρηση (internalization) των μικροοργανισμών εντός του φυτού (Deering et al., 2012). Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι υπάρχει μια σειρά από παράγοντες όπως το είδος του φυτού, το στέλεχος ή/και ο ορότυπος του βακτηρίου, ο τρόπος μόλυνσης και η ηλικία του φυτού που επηρεάζουν την πιθανότητα εισχώρησης ενός παθογόνου βακτηρίου εντός ενός φυτού. Η εισχώρηση των βακτηρίων φαίνεται να λαμβάνει χώρα ή μέσω φυσικών ανοιγμάτων (στοματία και φακίδια) ή/και μέσω περιοχών που έχουν υποστεί φυσική ή βιολογική καταπόνηση, αλλά μεγάλοι πληθυσμοί παρατηρούνται και στην επιφάνεια των φυτικών ιστών. Δεδομένης όμως της αδυναμίας διείσδυσης των απολυμαντικών στο εσωτερικό των φυτικών ιστών οι συμβατικές μέθοδοι απολύμανσης καθίστανται αναποτελεσματικές ενάντια στα ενδοφυτικά κύτταρα του παθογόνου (Ibarra-Sanchez et al., 2004). Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί *Salmonella* και *E. coli* έχουν ανιχνευτεί-παρατηρηθεί εντός φυσικών οπών των φύλλων, όπως τα στοματία (Chaco et al., 2009; Golberg et al., 2011; Kroupitski et al., 2009). Η διάχυση μέσω των στοματίων των φυτών θεωρείται ως ενεργός διαδικασία, ενώ το βακτηριακό σύστημα έκκρισης τύπου III (TTSS) καθώς και τα συστήματα παθογένειας SPI-1 (*Salmonella* Pathogenicity Island-1) και SPI-2 είναι απαραίτητα για την προσκόλληση των βακτηρίων και την κινητικότητα τους στην επιφάνεια του φύλλου (Schikora et al., 2011). Για την ποσοτικοποίηση των ενδοφυτικών κυττάρων *Salmonella* και *E. coli* O157: H7 απαιτείται η απολύμανση-εξυγίανση της επιφάνειας του φυτού και ακολούθως η πολτοποίηση του ιστού. Στη συνέχεια η καταμέτρηση των μικροοργανισμών λαμβάνει χώρα με επίστρωση του πολτοποιημένου ιστού σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα (Deering et al., 2012). Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα απολυμαντικά για την εξυγίανση της επιφάνειας του φυτού (για τη περαιτέρω ποσοτικοποίηση των ενδοφυτικών κυττάρων) περιλαμβάνουν νιτρικό άργυρο (~ 1%), χλωριούχο υδράργυρο (~ 0,1%) ή υψηλή συγκέντρωση υποχλωριώδους νατρίου (10.000 ppm) (Franz et al., 2007).

Στο πλαίσιο αυτού του έργου έχουν σχεδιαστεί επιμέρους εργασίες ώστε να μελετηθεί η ικανότητα σχηματισμού βιο-υμενίων από τα παθογόνα *Salmonella* Typhimurium και *Staphylococcus aureus* σε φυτικές επιφάνειες *in vitro* και *in situ*. Σε μια πρώτη προσπάθεια κατανόησης του φαινομένου, ελέγχθηκε η ικανότητα των δύο αυτών ειδών να προσκολλώνται και να δημιουργούν βιο-υμένιο σε φυτική επιφάνεια καθώς και σε εκχύλισμα φυτικού ιστού σε στερεή μορφή (**Παράρτημα I – Πειραματικός σχεδιασμός**). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *S. Typhimurium* (CDC 6516-60) (ATCC 14028) και *Staph. aureus* COL (MRSA) σε χαμηλό πληθυσμό (περίπου ένα δεκαδικό λογάριθμο) για τον εμβολιασμό εργαστηριακού θρεπτικού υποστρώματος LB (Luria-Bertani) και εκχυλίσματος ρόκας σε υγρή ή στερεή μορφή (gel cassetes). Παράλληλα εμβολιάστηκε και φυτικός ιστός ρόκας τόσο επιφανειακά όσο και από την πλευρά των στοματίων. Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων του παθογόνου *S. Typhimurium*, έγινε συλλογή δειγμάτων για απομόνωση RNA καθώς και για μεταβολομική ανάλυση (Σύνδεση με ΠΕ4).

Παράλληλα λαμβάνοντας υπόψη α) τη ραγδαία αύξηση της ζήτησης των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων στα οποία εντάσσονται τα λαχανικά, β) την υπαιτιότητα του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. για την εκδήλωση τροφικών λοιμώξεων καθώς και γ) την ικανότητα της ενδοφυτικής προσαρμογής/ επιβίωσης του παθογόνου στο φυτικό ιστό σε συνδυασμό με δ) την αναποτελεσματικότητα των κοινά χρησιμοποιούμενων απολυμαντικών έναντι των ενδοφυτικών κυττάρων, για τις ανάγκες του παρόντος έργου σε μια δεύτερη προσέγγιση μελετήθηκε (**Παράρτημα II – Πειραματικός σχεδιασμός**) η επίδραση της θερμοκρασίας και του

χρόνου συντήρησης α) στην ικανότητα του παθογόνου *S. Enteritidis* να εποικίζει επιφάνειες διαφορετικών φυλλωδών λαχανικών, προσκόλληση (attached cells) ή ενδοφυτική προσαρμογή/επιβίωση (internalized cells), β) στη μετέπειτα οξεανθεκτικότητα των κυττάρων των παραπάνω κατηγοριών έναντι ακραίας όξινης καταπόνησης και γ) στην παραλλακτικότητα μεταξύ οροτύπων του παθογόνου στην ικανότητα εποίκησης φυλλικών επιφανειών.

Με βάση τη διεθνή πρόσφατη βιβλιογραφία, η αλληλεπίδραση φυτών και εντεροπαθογόνων βακτηρίων δεν είναι παθητική αλλά ενεργητική και περιλαμβάνει την ενεργοποίηση μεταβολικών μηχανισμών που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών. Πληθώρα μελετών στο πεδίο των αλληλεπιδράσεων φυτών-μικροοργανισμών έχουν δείξει ότι εντεροπαθογόνα βακτήρια μπορούν να προσβάλλουν και να επιβιώνουν μέσα ή πάνω στους φυτικούς ιστούς. Αν και τα εντεροπαθογόνα βακτήρια δεν προκαλούν ασθένειες στα φυτά, η δυνατότητα παραμονής τους σε φυτικές επιφάνειες μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία λόγω κατανάλωσης φρέσκων φρούτων και λαχανικών επιμολυσμένα με εντεροπαθογόνα βακτήρια. Έτσι η ανάπτυξη νέων στρατηγικών για την αντιμετώπιση των μολύνσεων σε φρέσκα φρούτα και λαχανικά αποτελεί ένα από τους βασικούς στόχους της βιομηχανίας τροφίμων.

Οι χαρπίνες είναι πρωτεΐνες που παράγονται από φυτοπαθογόνα βακτήρια κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασής τους με φυτά και εκκρίνονται μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III (Τ3ΕΣ). Σε οργανισμικό επίπεδο λειτουργούν ως επαγωγείς της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR), η οποία αποτελεί έναν από τους κύριους μηχανισμούς άμυνας των φυτών. Οι χαρπίνες αποτελούν τις μοναδικές πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω του Τ3ΕΣ και είναι ικανές να προκαλέσουν αντίδραση υπερευαισθησίας όταν χορηγηθούν εξωτερικά σε φυτικούς ιστούς σε καθαρή μορφή. Τα χαρακτηριστικά αυτά επέτρεψαν να αξιοποιηθούν οι χαρπίνες ως εμπορικά σκευάσματα για την βελτίωση της άμυνας και την ενίσχυση της ανάπτυξης των φυτών. Μέχρι σήμερα οι χαρπίνες έχουν αξιοποιηθεί επιτυχώς για την αντιμετώπιση πολλών φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών που προκαλούν ασθένειες στα φυτά.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω εξετάστηκε αν ενίσχυση των ενδογενών μηχανισμών άμυνας των φυτών θα μπορούσε να περιορίσει την αποίκηση τους από Σαλμονέλα (**Παράρτημα III – Πειραματικός σχεδιασμός**). Για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε αν η χαρπίνη από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola μπορεί να περιορίσει την ενδοφυτική επιβίωση και ανάπτυξη της σαλμονέλας (*Salmonella* Typhimurium) σε φυτικούς ιστούς τριών ποικιλιών καπνού, μετά από επίδραση χαρπίνης είτε με εξωγενή εφαρμογή της σε φύλλα καπνού ή με παροδική έκφραση μέσω Αγροβακτηρίου.

### Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της μελέτης της ικανότητας ανάπτυξης στελέχους *Salmonella* Typhimurium και *Staphylococcus aureus* σε επιφάνειες μοντέλα (π.χ. gel cassettes), σε φυλλικές επιφάνειες (ρόκα) παρουσιάζονται παρακάτω. Μετά από επώαση των δειγμάτων στους 10 και 20°C διαπιστώθηκε ότι τα παθογόνα *S. enterica* και *Staph. aureus* αποίκισαν τις επιφάνειες επιτυχώς. Συγκεκριμένα στα **Γραφήματα 1 και 2 (Παράρτημα I)** φαίνεται ότι τα παθογόνα *S. Typhimurium* και *Staph. aureus* αποίκισαν τις επιφάνειες επιτυχώς. Πρόσφατα έχει αποδειχτεί ότι η επιλεκτική ανίχνευση των *E. coli* και *Salmonella* spp. κοντά στα στομάτια μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μιας

χημειοτροπικής αλληλεπίδρασης (Deering et al., 2012), παρόλα αυτά, στα δείγματα φυτικού ιστού δεν υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων όπου ο εμβολιασμός του στελέχους είχε πραγματοποιηθεί στην επιφάνεια ή στην πλευρά των στοματίων (**Παράρτημα Ι - Γράφημα 1 και 2**). Κατά την ανάπτυξη του στελέχους *S. Typhimurium* στο υγρό εκχύλισμα ρόκας, ο πληθυσμός φάνηκε να είναι κατά ένα δεκαδικό λογάριθμο μικρότερος σε σύγκριση με το εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα (**Παράρτημα Ι - Γράφημα 3**). Παρόμοια αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση των στερεών θρεπτικών μέσων (δείγματα gel cassettes) (**Παράρτημα Ι - Γράφημα 4**).

Μελέτες αναφέρουν ότι ο φυτικός ιστός της ρόκας είναι πλούσιος σε δευτερογενείς μεταβολίτες όπως ταννίνες, τερπένια, αλκαλοειδή και φλαβονοειδή, σε γλυκοσινολικά οξέα (glucosinolates, GSLs) και σε ερουκικό οξύ. Επιστημονικά πειράματα με στόχο τη διερεύνηση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του εκχυλίσματος της ρόκας από τα φύλλα της καθώς και του ελαίου που περιέχει ο σπόρος της έχουν καταγραφεί από τα τέλη του 19ου αιώνα. Συγκεκριμένα σε μια παλαιότερη μελέτη αναφέρεται ότι το εκχύλισμα της ρόκας και το έλαιο του σπόρου της είχε αντιμικροβιακή δράση έναντι των βακτηρίων *E. coli*, *S. typhi* και *Bacillus subtilis* (Abdou et al., 1972). Τα τελευταία χρόνια η αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος και του ελαίου του φυτού *ErUCA sativa* έχουν απασχολήσει αρκετούς ερευνητές. Συγκεκριμένα, οι Gulfranz et al. (2011) υποστήριξαν την αντιμικροβιακή δράση του ελαίου από το σπόρο της ρόκας έναντι του βακτηρίου *E. coli* σε συγκέντρωση 50-72 µg/ml δημιουργώντας μια ζώνη αναστολής ακτίνας έως 30 mm. Ωστόσο, ενδιαφέρον προκαλεί η αντιμικροβιακή δράση αυτών και έναντι μυκήτων. Οι Rani et al. (2010) απέδειξαν την αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος ρόκας έναντι μυκήτων του γένους *Penicillium*. Φαίνεται δε ότι η αντιμικροβιακή δράση που χαρακτηρίζει το φυτό *ErUCA sativa* οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα του σε GSLs. Τα παράγωγα της υδρόλυσης των GSLs θεωρούνται ισχυροί και ικανοί αναστολείς της βακτηριακής δραστηριότητας. Οι ισοθειοκυανούχες ενώσεις που παράγονται από την υδρόλυση των GSLs είναι αυτές που θεωρείται ότι παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων. Μάλιστα, έχει καταγραφεί ότι οι αλκυλοισοθειοκυανούχες ενώσεις είναι κυτοτοξικές στο βακτήριο *S. Typhimurium* (Tiendink et al., 1991). Η τοξικότητα και το εύρος της αντιμικροβιακής δράσης των ισοθειοκυανούχων ενώσεων ποικίλλει ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού, με τα Gram αρνητικά βακτήρια να είναι λιγότερο ευαίσθητα από ότι τα Gram θετικά βακτήρια (Adarsh et al., 2009).

Με βάση τα παραπάνω, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι αυτή η διαφορά της τάξεως του ενός λογαρίθμου που υπάρχει μεταξύ του εργαστηριακού θρεπτικού υποστρώματος LB και του εκχυλίσματος ρόκας μπορεί να οφείλεται και στην αντιμικροβιακή δράση των γλυκοσινολικών οξέων και των προϊόντων υδρόλυσης τους. Επίσης, η αντιμικροβιακή δράση αυτών των ενώσεων έπαιξε ρόλο και στη χαμηλή ανάπτυξη που παρουσίασε το παθογόνο όταν αναπτύχθηκε στο φυτικό ιστό.

Σε μια δεύτερη προσέγγιση για τον προσδιορισμό της ικανότητας του *S. Enteritidis* να προσκολλάται στις επιφάνειες φυλλωδών λαχανικών ή/ και να αναπτύσσεται ενδοφυτικά χρησιμοποιήθηκαν τα λαχανικά σπανάκι, μαρούλι, βλήτα, ρόκα και ιταλικά χόρτα. Πιο συγκεκριμένα, τα παραπάνω λαχανικά εμβολιάστηκαν με τον παθογόνο με τη μέθοδο της εμβάπτισης σε διάλυμα με συγκέντρωση  $7 \log \text{CFU/mL}$  και στη συνέχεια συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες για 2 και 48 ώρες σε θερμοκρασία 5 και 20 °C. Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ) καθώς και οι επιμέρους πληθυσμοί των αλλοιογόνων μικροοργανισμών (οξυγαλακτικά

βακτήρια, ψευδομονάδες, εντεροβακτήρια και ζύμες-μύκητες) των πέντε λαχανικών (ανεμβολίαστων) κατά την ημέρα παραλαβής τους καθώς και ύστερα από 48 ώρες συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία 5 και 20 °C φαίνεται στο **Γράφημα 1 (Παράρτημα II)**. Η OMX σε σπανάκι, ρόκα και ιταλικά χόρτα ήταν περίπου 7 log CFU/g και στο μαρούλι περίπου 5.5 log CFU/g, ενώ οι ψευδομονάδες αποτελούσαν τον κυρίαρχο μικροοργανισμό. Η ενδοφυτική OMX κυμαινόταν από 4.5-6.0 log CFU/g για όλα τα λαχανικά εκτός από το μαρούλι που ήταν περίπου 3.5 log CFU/g, ενώ ο κυρίαρχος μικροοργανισμός ήταν οι ψευδομονάδες. Επιπλέον καταμετρήθηκαν σε όλα τα λαχανικά, αλλά σε μικρότερους πληθυσμούς εντεροβακτήρια, ζύμες και μύκητες. Εξαιρέση αποτέλεσαν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία απουσίαζαν από το εσωτερικό όλων των λαχανικών. Όσον αφορά στο pH των λαχανικών, κατά την ημέρα παραλαβής τους κυμαινόταν από 5.9 έως 6.4 και παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητο μετά από 48 ώρες σε θερμοκρασίες 5 °C (pH 5.9 έως 6.2) και 20 °C (pH 6.0 έως 6.3).

Συντήρηση των εμβολιασμένων λαχανικών για 2 ώρες σε θερμοκρασίες 5 και 20 °C, όπως φαίνεται στο **Γράφημα 2 (Παράρτημα II)**, είχε ως αποτέλεσμα ο ολικός πληθυσμός του *S. Enteritidis* να κυμαίνεται από 5.0 έως 6.0 log CFU/g, και ο ενδοφυτικός πληθυσμός από 3.0 έως 5.0 log CFU/g. Κατά τη συντήρηση των λαχανικών για 48 ώρες στους 5 °C δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στους βακτηριακούς πληθυσμούς του παθογόνου στα υπό μελέτη λαχανικά, με εξαίρεση τη ρόκα, στην οποία παρατηρήθηκε μείωση τόσο του ολικού, όσο και του ενδοφυτικού πληθυσμού *S. Enteritidis* κατά περίπου 1.0 log CFU/g. Αντίθετα, συντήρηση των λαχανικών για 48 ώρες σε θερμοκρασία 20°C είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση ( $P<0.05$ ) του ολικού πληθυσμού στο μαρούλι, ενώ ο ενδοφυτικός πληθυσμός αυξήθηκε σημαντικά ( $P<0.05$ ) σε μαρούλι, βλήτα και σπανάκι κατά περίπου 1.0-2.0 log CFU/g.

Όσον αφορά στην επίδραση του είδους του λαχανικού στην ικανότητα ενδοφυτικής προσαρμογής/επιβίωσης του *S. Enteritidis* φαίνεται ότι συντήρηση σε χαμηλή θερμοκρασία είχε ως αποτέλεσμα σημαντική διαφοροποίηση του πληθυσμού των ενδοφυτικών κυττάρων μεταξύ των διαφορετικών λαχανικών. Πιο συγκεκριμένα, συντήρηση στους 5 °C για 2 ώρες είχε ως αποτέλεσμα το μεγαλύτερο ολικό πληθυσμό *S. Enteritidis* σε σπανάκι και ιταλικά (περίπου 5.0 log CFU/g) και το μικρότερο στα βλήτα (περίπου 4.0 log CFU/g). Παραμονή δε, του παθογόνου στην επιφάνεια των λαχανικών για 48 ώρες οδήγησε σε σημαντική μείωση του προσκολλημένου και ενδοφυτικού πληθυσμού σε ρόκα (περίπου 1.0 log CFU/g), πληθυσμός που διέφερε σημαντικά και μεταξύ των υπόλοιπων λαχανικών. Αντίθετα, συντήρηση των λαχανικών στους 20 °C για 2 ώρες είχε ως αποτέλεσμα παρόμοιους πληθυσμούς προσκολλημένων και ενδοφυτικών κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού *S. Enteritidis* για όλα τα υπό μελέτη λαχανικά, ενώ μετά από 48 ώρες παρατηρήθηκε αύξηση του ενδοφυτικού πληθυσμού του παθογόνου στο μαρούλι κατά περίπου 2.0 log CFU/g και στα βλήτα, στο σπανάκι και στη ρόκα κατά 1.0 log CFU/g, ενώ ο αντίστοιχος ολικός πληθυσμός παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητος. Με βάση την ικανότητα ενδοφυτικής προσαρμογής/επιβίωσης του *S. Enteritidis* τα λαχανικά κατατάσσονται ως εξής: σπανάκι> ιταλικά χόρτα> μαρούλι> βλήτα >ρόκα.

Είναι γνωστό ότι διαφορετικοί ορότυποι του παθογόνου *Salmonella* χαρακτηρίζονται από παραλλακτικότητα ως προς την ικανότητα προσκόλλησης, το σχηματισμό βιο-υμενίων και τον βαθμό ενδοφυτικής προσαρμογής/επιβίωσης σε βιοτικές επιφάνειες. Έρευνα των Guo et al., (2002) έδειξε ότι διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους βακτηρίων ενδέχεται να προσαρμόζονται ενδοφυτικά σε διαφορετικό βαθμό. Πιο συγκεκριμένα από τους πέντε ορότυπους *Salmonella*

(Enteritidis, Hartford, Michigan, Montevideo, και Poona), οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό υδροπονικού διαλύματος σε καλλιέργεια τομάτας, μόνο οι *S. Michigan* και *S. Montevideo* ανιχνεύτηκαν στις τομάτες. Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν τρία στελέχη *Salmonella* και εμβολιάστηκαν με τη μέθοδο της εμβάπτισης ( $7.0 \log \text{CFU/mL}$ ) στα υπό μελέτη λαχανικά (μαρούλι, βλήτα, σπανάκι, ρόκα και ιταλικά χόρτα). Συγκεκριμένα οι ορότυποι που επιλέχθηκαν ήταν οι Typhimurium, Infantis και Enteritidis, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των εν λόγω λαχανικών όπως περιγράφεται παραπάνω, ενώ ακολούθησε συντήρηση των λαχανικών στους 5 και 20 °C για 2 και 48 ώρες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (**Παράρτημα II - Γράφημα 3**), η συντήρηση των λαχανικών για 2 ώρες στους 5 °C είχε ως αποτέλεσμα ο ενδοφυτικός πληθυσμός και για τα τρία στελέχη να ανέρχεται στους 4.0-4.5  $\log \text{CFU/g}$ , ενώ στους 20 °C να είναι περίπου 3.5-4.5  $\log \text{CFU/g}$ . Στατιστικώς σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν μεταξύ των διαφορετικών οροτύπων ( $p > 0.05$ ), παρά μόνο στην περίπτωση των βλίτων στους 20 °C όπου οι ορότυποι *S. Enteritidis* και *S. Infantis* διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τον ορότυπο *S. Typhimurium* ( $p < 0.05$ ). Σε μελέτη των Miryam Díez-García *et al.*, (2012), αναφέρεται ότι ο ορότυπος *S. Typhimurium* είχε μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού βιομενίων σε σχέση με τους άλλους ορότυπους, γεγονός το οποίο ίσως εξηγεί και την καλύτερη ικανότητα ενδοφυτικής προσαρμογής/επιβίωσης του.

Περαιτέρω παραμονή των λαχανικών στους 5 °C για 48 ώρες είχε ως αποτέλεσμα μια μείωση της τάξεως του 1.0-1.5  $\log \text{CFU/g}$  του ενδοφυτικού πληθυσμού, η οποία στην περίπτωση των βλίτων και στο μαρούλι είναι στατιστικώς σημαντική ( $p < 0.05$ ) για τους ορότυπους *S. Enteritidis* και *S. Infantis*. Αντίθετα, η παραμονή των λαχανικών στους 20 °C για 48 ώρες οδήγησε σε μικρή αύξηση του ενδοφυτικού πληθυσμού με στατιστικώς σημαντικές διαφορές να παρατηρούνται μόνο στην περίπτωση των βλίτων καθώς ο πληθυσμός των οροτύπων *S. Enteritidis* και *S. Infantis* αυξήθηκε κατά 1.0  $\log \text{CFU/g}$ , ενώ ο πληθυσμός του οροτύπου *S. Typhimurium* μειώθηκε κατά 1.0  $\log \text{CFU/g}$ . Σε μελέτη των Lianou and Koutsoumanis, (2012) αναφέρεται ότι η επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών επιδρά στην ικανότητα σχηματισμού βιομενίων των στελεχών του *S. enterica* με αποτέλεσμα σε υψηλότερες θερμοκρασίες (25 °C) να αυξάνεται και η ικανότητα σχηματισμού βιο-υμενίων σε σχέση με άλλες χαμηλότερες. Ενδεχομένως, κάτι αντίστοιχο να συμβαίνει και με το βαθμό ενδοφυτικής ανάπτυξης του παθογόνου όπου είναι σχετικά υψηλότερος στη θερμοκρασία των 20 °C.

Με στόχο τη μελέτη της φυσιολογίας του παθογόνου μικροοργανισμού *S. Enteritidis* κατά την εποίκιση της επιφάνειας ή του εσωτερικού φυλλωδών λαχανικών, ο παθογόνος εκτέθηκε σε ακραία όξινη καταπόνηση προσομοιάζοντας το περιβάλλον (pH) του στομάχου. Για το λόγο αυτό, η όξινη καταπόνηση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C σε εργαστηριακό θρεπτικό υλικό TSB του οποίου το pH (2.7) ρυθμίστηκε υπό ασηπτικές συνθήκες με χρήση HCl (6N). Στο **Γράφημα 4 (Παράρτημα II)** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα επιβίωσης του ολικού πληθυσμού *S. Enteritidis* που εποικίζει μαρούλι, σπανάκι, βλήτα, ρόκα και ιταλικά, έναντι όξινης καταπόνησης (pH: 2.7), ύστερα από προηγούμενη συντήρηση του λαχανικού σε θερμοκρασίες 5 και 20 °C για 2 ή 48 ώρες. Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή  $t_x$  προς τον αντίστοιχο αρχικό πληθυσμό  $t_0$ , ο οποίος αναφέρεται στο επάνω μέρος του **Γραφήματος 4** για κάθε περίπτωση. Παρατηρούμε πως το μέγεθος του πληθυσμού που επιβιώνει μετά την όξινη καταπόνηση παραλλάσει σε σημαντικό βαθμό ανάλογα της θερμοκρασίας συντήρησης, του είδους του λαχανικού και του χρόνου συντήρησης του. Πιο συγκεκριμένα, συντήρηση σε χαμηλή

θερμοκρασία των βλίτων (**Παράρτημα II - Γράφημα 4Γ**) έχει ως αποτέλεσμα την ευαισθητοποίηση του παθογόνου έναντι ακόλουθης όξινης καταπόνησης. Ευαισθητοποίηση του παθογόνου παρατηρείται επίσης κατά την εποίκηση αυτού σε ρόκα και ιταλικά μετά από παρατεταμένη παραμονή (48 ώρες) στους 20 °C. Σχετικά με την επίδραση του είδους του λαχανικού στην οξεοανθεκτικότητα του παθογόνου, μεγαλύτερη επιβίωση του μικροοργανισμού έναντι ακόλουθης όξινης καταπόνησης παρατηρείται μετά από εποίκηση αυτού σε ιταλικά και σπανάκι σε χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης.

Σύμφωνα με τη διαγραμματική απεικόνιση της επιβίωσης του *S. Enteritidis* κατά τη διάρκεια όξινης καταπόνησης (**Παράρτημα II- Γράφημα 5**), μετά από παραμονή του παθογόνου σε σπανάκι, τα προσκολλημένα κύτταρα φαίνονται να έχουν αυξημένη οξεοανθεκτικότητα έναντι των ενδοφυτικών, ανεξαρτήτως χρόνου και θερμοκρασίας συντήρησης. Επιπλέον, παρατεταμένη παραμονή του παθογόνου στο σπανάκι είχε ως αποτέλεσμα την ευαισθητοποίηση του παθογόνου έναντι ακόλουθης όξινης καταπόνησης. Πιο συγκεκριμένα συντήρηση για 2 ώρες στους 5 °C και μετά από 90 λεπτά ακόλουθης όξινης καταπόνησης, παρατηρήθηκε μείωση του ολικού, προσκολλημένου και ενδοφυτικού πληθυσμού κατά περίπου 2.7, 1.5 και 2.5 log CFU/g αντίστοιχα. Επίσης ύστερα από συντήρηση για 2 ώρες στους 20 °C, παρατηρήθηκε μείωση της τάξης των 3.0, 2.1 και 3.2 log CFU/g αντίστοιχα. Συντήρηση στους 5 °C για 48 ώρες είχε ως αποτέλεσμα κατά τη μετέπειτα όξινη καταπόνηση η μείωση του πληθυσμού των ολικών, προσκολλημένων και ενδοφυτικών κυττάρων να είναι 2.88, 2.92 και 4.6 log CFU/g αντίστοιχα, με τον ενδοφυτικό πληθυσμό να είναι ουσιαστικά κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (1.0 log CFU/g) ήδη από τα πρώτα 60 λεπτά. Παρομοίως, τα ενδοφυτικά κύτταρα του παθογόνου έπειτα από προηγούμενη παραμονή στους 20 °C για 48 ώρες μειώθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης στα 60 λεπτά της έκθεσης σε όξινη καταπόνηση. Επιπλέον, η επίδραση του χρόνου συντήρησης 48 ωρών και στις δύο θερμοκρασίες φαίνεται πως ευαισθητοποιεί τα ενδοφυτικά κύτταρα με αποτέλεσμα τη μείωση των πληθυσμών κάτω από το όριο ανίχνευσης σε αντίθεση με τα προσκολλημένα κύτταρα τα οποία φαίνεται να μην επηρεάζονται.

Όσον αφορά στο μαρούλι (**Παράρτημα II - Γράφημα 6**), προηγούμενη συντήρηση για 2 ώρες στους 5 °C και διάρκεια όξινης καταπόνησης 90 λεπτά, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ολικού και προσκολλημένου πληθυσμού του *S. Enteritidis* κατά 4.0 και 1.6 log CFU/g αντίστοιχα, ενώ ο ενδοφυτικός πληθυσμός ήδη μειώθηκε κάτω του ορίου ανίχνευσης από τα πρώτα 30 λεπτά της όξινης καταπόνησης. Επίσης, ύστερα από συντήρηση για 2 ώρες στους 20 °C, παρατηρήθηκαν ελάχιστα μικρότερες μειώσεις των ολικών και προσκολλημένων κυττάρων του παθογόνου, ενώ ο ενδοφυτικός πληθυσμός είχε παρόμοια συμπεριφορά με τους 5 °C. Η μείωση του ενδοφυτικού πληθυσμού κάτω από το όριο ανίχνευσης μετά από 30 λεπτά έκθεσης σε χαμηλό pH, σε αντίθεση με τον προσκολλημένο πληθυσμό, υποδηλώνει ότι τα ενδοφυτικά κύτταρα ήταν πιο ευαίσθητα από τα προσκολλημένα, όπως ακριβώς και στην περίπτωση του σπανακιού. Παρατεταμένη παραμονή στους 5 °C (48 ώρες) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση τόσο των προσκολλημένων, όσο και των ενδοφυτικών κυττάρων του παθογόνου υπό του ορίου ανίχνευσης μετά από 75 και 45 λεπτά έκθεσης σε χαμηλό pH αντίστοιχα. Αντίθετα, παραμονή του παθογόνου στο μαρούλι για 48 ώρες στους 20 °C είχε ως αποτέλεσμα την εξίσωση της οξεοανθεκτικότητας σε ενδοφυτικά και προσκολλημένα κύτταρα καθώς και παράταση της καταμέτρησης επιβιωσάντων κυττάρων έως και μετά από 75 λεπτά όξινης καταπόνησης. Σύμφωνα δε, με τα παραπάνω αποτελέσματα, τα ενδοφυτικά κύτταρα του παθογόνου στο μαρούλι (48 ώρες, 20 °C) παρουσιάζουν αυξημένη οξεοανθεκτικότητα έναντι του αντίστοιχου ενδοφυτικού πληθυσμού στο σπανάκι.

Παραμονή του παθογόνου στην επιφάνεια ή το εσωτερικό των βλίτων (**Παράρτημα II - Γράφημα 7**), κατά τη διάρκεια συντήρησης σε χαμηλή θερμοκρασία (5 °C) είχε ως αποτέλεσμα την ευαισθητοποίηση τόσο των προσκολλημένων, όσο και των ενδοφυτικών κυττάρων *S. Enteritidis*. Πιο συγκεκριμένα μετά από παραμονή του παθογόνου για 48 ώρες στα βλήτα σε θερμοκρασία 5 °C, ο πληθυσμός των ενδοφυτικών και προσκολλημένων κυττάρων μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης ήδη μετά από τα πρώτα 15 λεπτά έκθεσης σε ακραία όξινη καταπόνηση. Ύστερα από συντήρηση για 2 ώρες είτε στους 5 °C είτε στους 20 °C παρατηρήθηκε ότι τα ενδοφυτικά κύτταρα ήταν πιο ευαίσθητα έναντι της όξινης καταπόνησης συγκριτικά με τα προσκολλημένα, δεδομένου ότι ο πληθυσμός τους μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης περίπου στα 15 και 45 λεπτά αντίστοιχα. Παραμονή δε, του παθογόνου σε βλήτα, σε θερμοκρασία 20 °C για 48 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή οξεοανθεκτικότητας των ενδοφυτικών κυττάρων, τα οποία φαίνεται να έχουν καλύτερη επιβίωση έναντι των προσκολλημένων κατά την έκθεσή τους σε ακραία όξινη καταπόνηση, με τον πληθυσμό τους να μειώνεται κάτω του ορίου ανίχνευσης μετά από 75 λεπτά, φαινόμενο το οποίο παρατηρείται και κατά την παραμονή του παθογόνου σε φυτικό ιστό μαρουλιού.

Παραμονή του παθογόνου στο εσωτερικό της ρόκας (**Παράρτημα II- Γράφημα 8**), κατά τη διάρκεια συντήρησης σε υψηλή θερμοκρασία (20 °C) είχε ως αποτέλεσμα την ευαισθητοποίηση των ενδοφυτικών κυττάρων *S. Enteritidis*. Πιο συγκεκριμένα μετά από παραμονή του παθογόνου για 48 ώρες στα βλήτα σε θερμοκρασία 20 °C, ο πληθυσμός των ενδοφυτικών κυττάρων μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης ήδη μετά από τα πρώτα 15 λεπτά έκθεσης σε ακραία όξινη καταπόνηση. Αντιθέτως, ύστερα από συντήρηση στους 5 °C παρατηρήθηκε ότι τα ενδοφυτικά και τα προσκολλημένα κύτταρα είχαν παρόμοια απόκριση έναντι μετέπειτα όξινης καταπόνησης. Σύμφωνα με τη διαγραμματική απεικόνιση της επιβίωσης του *S. Enteritidis* κατά τη διάρκεια όξινης καταπόνησης μετά από παραμονή του παθογόνου σε ιταλικά χόρτα (**Παράρτημα II - Γράφημα 9**), τα προσκολλημένα κύτταρα φαίνονται να έχουν αυξημένη οξεοανθεκτικότητα έναντι των ενδοφυτικών, ανεξαρτήτως χρόνου και θερμοκρασίας συντήρησης. Επιπλέον, παρατεταμένη παραμονή του παθογόνου στο λαχανικό στους 20 °C είχε ως αποτέλεσμα την ευαισθητοποίηση των προσκολλημένων κυττάρων έναντι ακόλουθης όξινης καταπόνησης.

Δεδομένου ότι μία σύντομη πέψη διαρκεί περίπου 60 λεπτά και σε συνδυασμό με τον ανακτώμενο πληθυσμό του παθογόνου τη χρονική στιγμή  $t=60$  λεπτά της έκθεσης σε όξινη καταπόνηση είναι δυνατόν να εκτιμηθεί ο αριθμός των κυττάρων του παθογόνου που δυνητικά μπορεί να υπερβεί το «εμπόδιο» του χαμηλού pH του στομάχου. Με βάση τον **Πίνακα 1 (Παράρτημα II)**, στις περισσότερες περιπτώσεις η προσκόλληση του παθογόνου επάνω στο λαχανικό δύναται να έχει ως αποτέλεσμα την μετέπειτα επιβίωση του παθογόνου έναντι ακραίας όξινης καταπόνησης, όπως στο περιβάλλον του ανθρώπινου στομάχου. Στο μαρούλι, ο κίνδυνος επιβίωσης κυττάρων *S. Enteritidis* κατά την πέψη επιμολυσμένου λαχανικού έγκειται στην οξεοανθεκτικότητα των προσκολλημένων κυττάρων και λιγότερο των ενδοφυτικών κυττάρων. Αντίθετα, στο σπανάκι ο κίνδυνος έγκειται τόσο στα προσκολλημένα, όσο και στα ενδοφυτικά κύτταρα του *S. Enteritidis*, τα οποία δυνητικά επιβιώνουν μίας σύντομης πέψης 60 λεπτών παρουσιάζοντας περίπου  $2.5 \log$  CFU/g επιβίωσαντες. Σημαντικό δε, είναι το γεγονός ότι η επιβίωση αυτή προέρχεται από τα ενδοφυτικά κύτταρα του παθογόνου στη φυλλική επιφάνεια του σπανακιού σε μόλις 2 ώρες σε θερμοκρασία είτε 5 °C, είτε 20 °C και είναι αδύνατο να απομακρυνθούν με τις συμβατικές μεθόδους εξυγίανσης των λαχανικών σε οικιακό ή ακόμη και βιομηχανικό επίπεδο. Τα βλήτα και η ρόκα φαίνεται ότι αποτελούν παρεμποδιστικό για το παθογόνο περιβάλλον όσον αφορά στην μετέπειτα απόκριση του παθογόνου σε ακραία όξινη



καταπόνηση. Πιο συγκεκριμένα, παραμονή του παθογόνου και στα δύο λαχανικά σε χαμηλή θερμοκρασία έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού σε επίπεδα κάτω του ορίου ανίχνευσης μετά από έκθεση σε χαμηλό pH για 60 λεπτά. Αντίθετα, παραμονή του λαχανικού σε θερμοκρασία 20 °C έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση τόσο των προσκολλημένων όσο και των ενδοφυτικών (μόνο για βλήτα) κυττάρων έναντι έκθεσης σε pH στομάχου για 60 λεπτά, πλην όμως σε χαμηλούς πληθυσμούς (περίπου 1.0 log CFU/g). Τέλος τα ιταλικά χόρτα ως περιβάλλον εποίκησης από τον παθογόνο φάνηκαν να αυξάνουν την οξεοανθεκτικότητα των προσκολλημένων κυττάρων αλλά όχι και των ενδοφυτικών, τα οποία ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου μετά από καταπόνηση σε χαμηλό pH για 60 λεπτά.

Με σκοπό τη μελέτη της φυσιολογίας των προσκολλημένων και ενδοφυτικών κυττάρων *S. Enteritidis* στην φυλλική επιφάνεια των φυλλωδών λαχανικών εκτιμήθηκε η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με τη λοιμωξιολογική δράση του μικροοργανισμού (*hilA*, *invA*, *spvR*, *ssrB*, *avrA*), με μηχανισμούς προσαρμογής και αντιμετώπισης συνθηκών καταπόνησης (*cadB*, *proV*) και με την εποίκηση του μικροοργανισμού σε βιοτικές επιφάνειες (*prgH*). Για τη μελέτη της σχετικής έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) και η ανίχνευση των παραγόμενων προϊόντων έγινε με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I. Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *16SrRNA*. Η εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης πραγματοποιήθηκε με χρήση της εξίσωσης του Pfaffl (Pfaffl, 2004). Ως κατάσταση αναφοράς τέθηκε αυτή των ολικών κυττάρων μετά από συντήρηση στους 5 °C για 2 ώρες. Το σύνολο των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν βρέθηκαν βιβλιογραφικά και τα χαρακτηριστικά τους αναφέρονται στον Πίνακα 2 (Παράρτημα II) και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στα Γραφήματα 10 και 11 (Παράρτημα II).

Στο Γράφημα 10 (Παράρτημα II) συνοψίζονται τα αποτελέσματα της μεταβολής των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης που λαμβάνουν χώρα κατά την εποίκηση της επιφάνειας ή του εσωτερικού των βλίστων από τον *S. Enteritidis*. Όσον αφορά στη σχετική έκφραση των γονιδίων, στον ολικό πληθυσμό του παθογόνου κατά τη συντήρηση για 2 ώρες στους 20 °C έναντι των 5 °C παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του *hilA* (κατά περίπου 400 φορές), *avrA*, *cadB* και *ssrB* κατά 10 φορές, του *invA* περίπου 30 φορές και του *proV* κατά περίπου 50 φορές, ενώ μείωση κατά 10 φορές παρατηρήθηκε στην έκφραση του γονιδίου *spvR*. Να σημειωθεί πως πέρα από την θετική ρύθμιση των γονιδίων παθογένειας, ο παθογόνος παρουσίασε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα κατά την όξινη καταπόνηση στους 20 °C έναντι των 5 °C για 2 ώρες. Είναι γνωστό δε (Álvarez-Ordóñez et al., 2010), ότι γονίδια όπως το *cadB*, το οποίο κωδικοποιεί το δίαυλο μεταφοράς του συστήματος λυσίνης /καδαβερίνης, συνδέονται με μηχανισμούς προσαρμογής του μικροοργανισμού *S. Typhimurium* σε ακραίες όξινες συνθήκες. Παραμονή του παθογόνου στους 5 °C για 48 ώρες είχε ως αποτέλεσμα τη θετική ρύθμιση του γονιδίου *hilA*, *invA* και *spvR* κατά περίπου 10 φορές, καθώς η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης γονιδίων όπως *cadB*, *proV* και *prgH* περιορίστηκε σε λιγότερες από 10 φορές. Το παραπάνω συνάδει με τα φαινοτυπικά αποτελέσματα, σύμφωνα με τα οποία παρατεταμένη παραμονή του παθογόνου σε χαμηλή θερμοκρασία είχε ως αποτέλεσμα την ευαισθητοποίησή του έναντι ακόλουθης ακραίας όξινης καταπόνησης. Αντίθετα, παρατεταμένη συντήρηση του παθογόνου στους 20 °C είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της οξεοανθεκτικότητας του ολικού πληθυσμού, κάτι όμως που δεν φαίνεται να αντικατοπτρίζεται στη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων, δεδομένου ότι παραμένουν σχεδόν αμετάβλητα σε σχέση με τις 2 ώρες στους 20 °C.

Σχετικά με τη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων των προσκολλημένων κυττάρων κατά τη συντήρηση για 2 ώρες στους 20 °C έναντι των 5 °C, θετική ρύθμιση παρουσίασε το γονίδιο *hilA* (αύξηση κατά 500 φορές) και κατά 10 φορές το *proV* ενώ παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του *invA*, *prgH* και *ssrB* κατά 100 φορές περίπου. Αντίθετα, μειωμένα κατά περίπου 10 φορές παρατηρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του *cadB*, παρ' όλο που ο προσκολλημένος πληθυσμός που παρουσίασε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα κατά την όξινη καταπόνηση ήταν μετά από συντήρηση στους 20 °C για 2 ώρες. Παραμονή του παθογόνου στους 5 °C για 48 ώρες είχε ως αποτέλεσμα τη θετική ρύθμιση κατά 100 φορές του γονιδίου *hilA* και κατά 10 φορές περίπου του *srnR*, ενώ μείωση των επιπέδων έκφρασης παρατηρήθηκε για *invA*, *ssrB* και *prgH* (κατά 1000 φορές) καθώς και του *cadB* (κατά 100 φορές). Τέλος, παρατεταμένη συντήρηση στους 20 °C είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή έκφρασης (αύξηση >100 φορές) τόσο γονιδίων σχετικών με την παθογένεια όπως *hilA*, *invA*, *ssrB* και *avrA* όσο και με την απόκριση σε καταπονήσεις (*proV*, *cadB*). Επίσης, θετική ρύθμιση παρουσίασε και το *cadB* (κατά 1000 φορές), χωρίς όμως να παρατηρείται αύξηση της οξεοανθεκτικότητας του μικροοργανισμού κατά την έκθεσή του σε ακόλουθη ακραία όξινη καταπόνηση. Αύξηση δε, των επιπέδων έκφρασης του *proV* στο *E. coli* O157:H7 σχετίζεται με την ενεργοποίηση προσαρμοστικών μηχανισμών έναντι ωσμωτικής καταπόνησης (Gunasekera et al., 2008) και στο *S. Typhimurium* επάγεται σε συνθήκες έλλειψης υγρασίας σε αβιοτικές επιφάνειες (ανοξείδωτο ατσάλι) (Finn et al., 2013). Επιπλέον, παραμονή του *E. coli* O157:H7 σε εκχύλισμα μαρουλιού είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή γονιδίων σχετικών με ωσμωτική καταπόνηση (Kyle et al., 2010).

Όσον αφορά στους ενδοφυτικούς πληθυσμούς, συντήρηση σε χαμηλή θερμοκρασία είχε ως αποτέλεσμα τον περιορισμό των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων σε χαμηλά επίπεδα, κάτι που μπορεί να σχετίζεται και με τη μη επιβίωση του παθογόνου έναντι ακόλουθης έκθεσης σε χαμηλό pH. Αντίθετα, συντήρηση στους 20 °C αύξησε την οξεοανθεκτικότητα του παθογόνου, κάτι όμως που δε δύναται να συσχετιστεί με τη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων, η οποία ήταν μη ανιχνεύσιμη, είτε λόγω χαμηλών επιπέδων έκφρασης, είτε λόγω χαμηλού αρχικού πληθυσμού (ή χαμηλού ανακτηθέντα πληθυσμού).

Στο **Γράφημα 11 (Παράρτημα II)** συνοψίζονται τα αποτελέσματα της μεταβολής των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης που λαμβάνουν χώρα κατά την εποίκιση της επιφάνειας ή του εσωτερικού σπανακιού από τον *S. Enteritidis*. Όσον αφορά στη σχετική μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης, παραμονή του παθογόνου σε φύλλα σπανακιού για 2 ώρες στους 5 °C φάνηκε να επάγει την έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με τη λοιμοξιογόνο δράση του μικροοργανισμού. Μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων έκφρασης παρουσίασε το γονίδιο *avrA* στα ενδοφυτικά κύτταρα (κατά περίπου 100 φορές), ενώ στα ολικά και στα προσκολλημένα κύτταρα η μεταβολή των επιπέδων έκφρασής του ήταν >10 φορές. Μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων *hilA*, *invA* και *srnR* παρουσιάστηκε μόνο στον ολικό πληθυσμό του παθογόνου. Τα γονίδια αυτά είναι απαραίτητα για την προσβολή των επιθηλιακών κυττάρων καθώς και την επιβίωση και εξάπλωση του παθογόνου στα κύτταρα του ξενιστή καθώς σύμφωνα με τις έρευνες των Schicora et al., (2011, 2012) απουσία τέτοιων γονιδίων σε μεταλλαγμένα στελέχη του *S. Typhimurium*, οδήγησε σε μειωμένο αριθμό του παθογόνου στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Επιπλέον, το γονίδιο *cadB*, που όπως έχει προαναφερθεί, συνδέεται με μηχανισμούς προσαρμογής του μικροοργανισμού *S. Typhimurium* σε ακραίες όξινες συνθήκες (Park et al., 1996; Álvarez-Ordóñez et al., 2010), παρουσίασε θετική μεταβολή της έκφρασης του (περίπου 10 φορές) και στα ολικά και στα προσκολλημένα και στα ενδοφυτικά κύτταρα του παθογόνου, γεγονός που συνάδει με τα φαινοτυπικά αποτελέσματα,

καθώς στους 5 °C για 2 ώρες και οι τρεις πληθυσμοί εμφανίζονται ως οξεοανθεκτικοί. Η επαγωγή του συγκεκριμένου γονιδίου κάτω από συνθήκες όξινης καταπόνησης έχει αναφερθεί και σε ορότυπους του *S. enterica* που εκτέθηκαν σε pH 4.5-5.5 ρυθμισμένο με HCl και οξικό οξύ (Joerger *et al.*, 2005). Επιπλέον, και στις τρεις κατηγορίες κυττάρων παρατηρείται θετική μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου *prgH*, το οποίο σχετίζεται με την προσκόλληση του παθογόνου σε βιοτικές επιφάνειες. Μεγαλύτερη θετική μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου αυτού παρατηρείται στα ενδοφυτικά κύτταρα (>100 φορές).

Παρατεταμένη παραμονή (48 ώρες) του παθογόνου στους 5 °C, είχε ως αποτέλεσμα στα ενδοφυτικά κύτταρα τη μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου *avrA* στα ίδια επίπεδα με αυτή που παρατηρήθηκε κατά την παραμονή του παθογόνου στους 5 °C για 2 ώρες, ενώ στον ολικό πληθυσμό παρατηρείται υποέκφραση των γονιδίων *hilA*, *invA* και *spvR*. Επιπλέον, στα προσκολλημένα κύτταρα, παρατηρείται θετική μεταβολή των γονιδίων έκφρασης *hilA* και *spvR* κατά περίπου 10 φορές. Το γονίδιο *cadB* υπερεκφράζεται πάλι και στους τρεις υποπληθυσμούς με τη μεγαλύτερη μεταβολή της έκφρασης του να παρατηρείται στα ενδοφυτικά κύτταρα (περίπου 10 φορές), γεγονός το οποίο δε συνάδει απόλυτα με τα φαινοτυπικά αποτελέσματα καθώς ο πληθυσμός των ενδοφυτικών κυττάρων μετά από παρατεταμένη παραμονή στους 5 °C εμφανίζεται ως ευαισθητοποιημένος.

Σε ότι αφορά την παραμονή του παθογόνου για 2 ώρες στους 20 °C, μεγαλύτερη θετική μεταβολή της έκφρασης παρατηρείται στο *spvR* (κατά 100 φορές), στα ενδοφυτικά κύτταρα, ενώ στα προσκολλημένα κύτταρα παρατηρείται μεταβολή της έκφρασης όλων των γονιδίων σχετιζόμενων με τη λοιμωξιγόνο δράση του μικροοργανισμού αλλά σε μικρότερο βαθμό. Σε ό,τι αφορά τον ολικό πληθυσμό δεν παρατηρήθηκε μεταβολή των επιπέδων έκφρασης του *cadB*, ενώ στον προσκολλημένο και τον ενδοφυτικό πληθυσμό η μεταβολή της έκφρασης κατέστη μη ανιχνεύσιμη είτε λόγω χαμηλών επιπέδων έκφρασης είτε λόγω χαμηλού αρχικού πληθυσμού (ή χαμηλού ανακτηθέντα πληθυσμού). Κατά την παρατεταμένη παραμονή (48 ώρες) του παθογόνου στους 20 °C σημειώθηκε μείωση των επιπέδων σχετικής έκφρασης όλων των γονιδίων σχετιζόμενων με τη λοιμωξιγόνο δράση του παθογόνου για τα κύτταρα του ολικού πληθυσμού, ενώ στα προσκολλημένα κύτταρα παρατηρήθηκε θετική μεταβολή της έκφρασης του *hilA* κατά περίπου 100 φορές. Σε ότι αφορά το γονίδιο *cadB* στα ολικά και στα προσκολλημένα κύτταρα παρατηρήθηκε μείωση της μεταβολής της έκφρασής του κατά περίπου 10 φορές, παρ' όλο που οι πληθυσμοί αυτοί εμφανίζουν αυξημένη οξεοανθεκτικότητα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την εκτίμηση του κινδύνου της ενδοφυτικής ανάπτυξης του παθογόνου *Salmonella* spp. σε φυλλώδη λαχανικά ευρείας κατανάλωσης δεδομένων α) της χαμηλής μολυσματικής δόσης (5-10 κύτταρα) του παθογόνου, β) της αναποτελεσματικότητας των συμβατικών μέσων εξυγίανσης φυλλικών επιφανειών έναντι των ενδοφυτικών κυττάρων και γ) της μεταβολής της φυσιολογίας του μικροοργανισμού (ανθεκτικότητα/ ευαισθητοποίηση) σε σχέση με την τοπολογική εδραίωσή του στο λαχανικό.

Τέλος, τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά τη μελέτη της επίδρασης της χαρπίνης, σε διάφορες συγκεντρώσεις, στην ενδοφυτική ανάπτυξη της σαλμονέλας σε φύλλα τριών ποικιλιών καπνού παρουσιάζονται παρακάτω. Αρχικά ελέγχθηκε ο χρόνος παραμονής της σαλμονέλας κατά την ενδοφυτική της ανάπτυξη σε φύλλα τριών ποικιλιών καπνού (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi, cv

W38 and cv. Turkey). Για την πραγματοποίηση του πειράματος, εμβολιάστηκαν φύλλα καπνού με σαλμονέλα σε συγκεντρώσεις της τάξης  $10^6$ ,  $10^5$ , και  $10^4$  cfu/ml. Το στέλεχος της σαλμονέλας που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 14028S, η οποία έφερε πλασμίδιο που επιτρέπει συνεχή έκφραση της GFP, ώστε να διευκολύνεται η παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων με κατάλληλη λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας αλλά και για την επιβεβαίωση των βακτηρίων στα τρυβλία μετά την απομόνωση τους από τις φυλλικές επιφάνειες. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε λήψη τυχαίων δισκίων από φύλλα των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν, ώστε να εκτιμηθεί το αρχικό μικροβιακό φορτίο των φύλλων πριν από την μόλυνση. Έπειτα από 20 ημέρες αποκόπηκαν δισκία φύλλων από τα ελάσματα που είχαν μολυνθεί με σαλμονέλα και επιστρώθηκαν σε τρυβλία ώστε να εκτιμηθεί ο πληθυσμός των βακτηρίων και έτσι να ελεγχθεί η ικανότητα παραμονής τους στα φύλλα (**Εικόνα 1 – Παράρτημα III**).

Σε όλες τις συγκεντρώσεις σαλμονέλας που πραγματοποιήθηκαν για τη μόλυνση των φύλλων, παρατηρήθηκε παραμονή των βακτηρίων, ενώ μεταξύ των ποικιλιών παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις στους πληθυσμούς της σαλμονέλας στο διάστημα των είκοσι ημερών. Δισκία που ελήφθησαν για τον προσδιορισμό του αρχικού μικροβιακού φορτίου των φύλλων δεν εμφάνισαν παρουσία άλλων μικροοργανισμών.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η επίδραση καθαρής χαρπίνης στην παραμονή της σαλμονέλας σε φυλλικές επιφάνειες των τριών ποικιλιών καπνού, στις οποίες προηγουμένως είχαν εφαρμοστεί διαφορετικές συγκεντρώσεις χαρπίνης (1-100  $\mu\text{g/ml}$ ) προκειμένου να καθοριστούν οι συγκεντρώσεις χαρπίνης που δεν προκαλούν μακροσκοπικά ορατή νέκρωση στα φύλλα δεδομένου ότι διαφορετικές ποικιλίες εκδηλώνουν διαφορετική ευαισθησία στην επίδραση χαρπίνης. Η εφαρμογή της χαρπίνης έγινε σε συγκέντρωση 1 και 10  $\mu\text{g/ml}$  και μία μέρα πριν τη μόλυνση με τα βακτήρια, ώστε να υπάρχει ο απαιτούμενος χρόνος για την ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας των φυτών. Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιήθηκε μόλυνση με σαλμονέλα σε συγκέντρωση  $10^6$  cfu/ml, η οποία ήταν σημασμένη με GFP ώστε να παρακολουθείται πιο εύκολα η ανάπτυξή της στα φυτά. Η μεταβολή του πληθυσμού της σαλμονέλας μελετήθηκε 0, 4 και 8 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με τα βακτήρια. Στις **Εικόνες 2 και 3 (Παράρτημα III)** παρουσιάζεται η απότομη μείωση του πληθυσμού της σαλμονέλας την τέταρτη ημέρα μετά την μόλυνση, στα φύλλα που είχε γίνει έγχυση με 10  $\mu\text{g/ml}$  χαρπίνης σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις, ενώ στην μεταχείριση των φύλλων με 1  $\mu\text{g/ml}$  χαρπίνης, παρατηρήθηκε μικρή και σταδιακή μείωση του πληθυσμού της σαλμονέλας σε σχέση με τα φύλλα που δεν εφαρμόστηκε καθόλου χαρπίνη. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσαν και οι άλλες ποικιλίες καπνού που μελετήθηκαν, γεγονός που ενισχύει τα αποτελέσματα της δράσης της χαρπίνης στον περιορισμό της ενδοφυτικής ανάπτυξης της σαλμονέλας σε φυλλικές επιφάνειες.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι από την όγδοη ημέρα φαίνεται να ανακάμπτει ο πληθυσμός της σαλμονέλας (**Εικόνες 2 και 3 – Παράρτημα III**). Γι αυτό κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστεί αν η έγχυση χαρπίνης την πέμπτη ημέρα μετά την αρχική έγχυση χαρπίνης θα μπορούσε να αποτρέψει την παρατηρούμενη ανάκαμψη. Για το σκοπό αυτό, εμβολιάστηκαν φύλλα τριών διαφορετικών φυτών καπνού ιδίου αναπτυξιακού σταδίου με διαφορετικές συγκεντρώσεις καθαρής χαρπίνης: χωρίς χαρπίνη, 10  $\mu\text{g/ml}$  χαρπίνης και 10  $\mu\text{g/ml}$  χαρπίνης στα οποία προστέθηκε ξανά 10  $\mu\text{g/ml}$  χαρπίνης την τέταρτη ημέρα μετά την μόλυνση από την σαλμονέλα, αντίστοιχα. Έπειτα από μια ημέρα τα ίδια φύλλα μολύνθηκαν με σαλμονέλα και αποκόπηκαν δισκία φύλλων 0, 4 και 8 μέρες μετά τη μόλυνση με σαλμονέλα για να εκτιμηθεί η ενδοφυτική της ανάπτυξη.

Η μεταχείριση χωρίς χαρπίνη (0 µg/ml) με την μεταχείριση με 10 µg/ml χαρπίνης δεν παρουσίασε διαφορετική εικόνα, παρατηρώντας μικρή μείωση του πληθυσμού την τέταρτη ημέρα και σταδιακή αύξηση την όγδοη ημέρα. Όσον αφορά την μεταχείριση όπου έγινε έγχυση στα φύλλα με 10 µg/ml χαρπίνης και ξαναπροστέθηκε σε αυτά 10 µg/ml χαρπίνης την τέταρτη ημέρα από τη μόλυνση με τη σαλμονέλα, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του πληθυσμού μέχρι και την όγδοη ημέρα συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις (Εικόνες 4 και 5 – Παράρτημα III).

Επιπρόσθετα η επίδραση της χαρπίνης στην ενδοφυτική ανάπτυξη της σαλμονέλας σε φυλλικές επιφάνειες, ελέγχθηκε έπειτα από παροδική έκφραση με αγροβακτήριο. Ειδικότερα, μολύνθηκαν φύλλα καπνού με αγροβακτήριο είτε κενό πλασμιδιακό δυαδικό φορέα ή φορέα με κλωνοποιημένο το γονίδιο *hrpZ* που κωδικοποιεί τη χαρπίνη και το πεπτιδίο έκκρισης της φυτικής πρωτεΐνης PR1a, ώστε όταν παράγεται η χαρπίνη από τα φυτικά κύτταρα να εκκρίνεται στον αποπλάστη. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός των φύλλων με τα αγροβακτήρια. Έπειτα από τρεις ημέρες μολύνθηκαν τα φύλλα με σημασμένη με GFP σαλμονέλα, ώστε να δοθεί ο απαιτούμενος χρόνος για τον μετασχηματισμό των κυττάρων φύλλου από το αγροβακτήριο. Η μεταχείριση των φύλλων των φυτών καπνού με το αγροβακτήριο χωρίς χαρπίνη καθώς και με το αγροβακτήριο που περιείχε το γονίδιο *hrpZ* που κωδικοποιεί για την χαρπίνη, παρουσίασαν παρόμοια εικόνα, με τον πληθυσμό της σαλμονέλας να μειώνεται την τέταρτη ημέρα και να ανακάμπτει σταδιακά μέχρι την όγδοη ημέρα. Αντιθέτως, η μεταχείριση των φύλλων των φυτών καπνού χωρίς αγροβακτήριο, παρουσίασε μια σταδιακή μείωση του πληθυσμού της σαλμονέλας στο διάστημα των οχτώ ημερών. Αν και η χαρπίνη παραγόμενη μέσω παροδικής έκφρασης με αγροβακτήριο μπορεί να περιορίσει την ενδοφυτική ανάπτυξη της σαλμονέλας, ο τρόπος αυτός εφαρμογής δεν είναι τόσο αποτελεσματικός όσο η απευθείας εφαρμογή καθαρής πρωτεΐνης.

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η εφαρμογή της χαρπίνης σε φυτά, σε συγκεντρώσεις στις οποίες δεν επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας, αλλά ενεργοποιούν αμυντικές αποκρίσεις των φυτών, φαίνεται να αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για τον περιορισμό της ανάπτυξης της σαλμονέλας σε φυτικούς ιστούς. Η απευθείας εξωτερική εφαρμογή καθαρής πρωτεΐνης στα φύλλα φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική στον περιορισμό αποίκησης της σαλμονέλας σε σύγκριση με τη μέθοδο του Αγροβακτηρίου. Οι τρεις ποικιλίες καπνού που χρησιμοποιήθηκαν εμφάνισαν διαφοροποιήσεις όσον αφορά την ενδοφυτική ανάπτυξη της σαλμονέλας στις φυλλικές επιφάνειες σε διάστημα είκοσι ημερών, το οποίο συνάδει με ευρήματα άλλων ερευνητικών ομάδων που υποστηρίζουν ότι το είδος και ο γονότυπος του φυτού παίζει ρόλο στο αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του φυτού με την σαλμονέλα. Επίσης διαφοροποιήσεις εμφάνισαν οι τρεις ποικιλίες καπνού όσον αφορά τη συγκέντρωση της χαρπίνης που πρέπει να εφαρμοστεί για να επαχθούν οι αμυντικοί μηχανισμοί των φυτών χωρίς παράλληλα να εκδηλωθεί αντίδραση υπερευαισθησίας. Τέλος διαπιστώθηκε ότι απαιτούνται επαναλαμβανόμενες εφαρμογές χαρπίνης, τουλάχιστον κάθε πέντε ημέρες, ώστε να περιοριστεί η ενδοφυτική ανάπτυξη της σαλμονέλας.

## Παράρτημα I

### Παράρτημα I – Πειραματικός σχεδιασμός

#### Μικροβιακό στέλεχος και συνθήκες ανάπτυξης

Ενεργή καλλιέργεια του στελέχους *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium (CDC 6516-60) (ATCC 14028) και *Staphylococcus aureus* strain COL (MRSA) χρησιμοποιήθηκε μετά από την προετοιμασία κατάλληλων δεκαδικών αραιώσεων για τον εμβολιασμό στείρου εργαστηριακού υποστρώματος LB (υγρού, στερεού), εκχυλίσματος φυτικού ιστού ρόκας (υγρού, στερεού) καθώς και ιστού ρόκας (επιφάνεια, στομάτια) σε πληθυσμό 1 log cfu/ml. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 10 και 20°C.

#### Παρασκευή εκχυλίσματος φυτικού ιστού ρόκας

Για την προετοιμασία του φυτικού εκχυλίσματος, φυτικός ιστός ρόκας αγοράστηκε από συνοικιακό οπωροπωλείο και μεταφέρθηκε στο εργαστήριο όπου ακολούθησε σχολαστικό πλύσιμο του φυτού. Ο ιστός τεμαχίστηκε και προστέθηκε απιονισμένο νερό σε ίση αναλογία. Το διάλυμα παρέμεινε στους 4°C για 4 ώρες και γινόταν πίεση ανά 30 λεπτά. Μετά το πέρας των 4 ωρών, το διάλυμα διηθήθηκε και τοποθετήθηκε στην αποστείρωση.

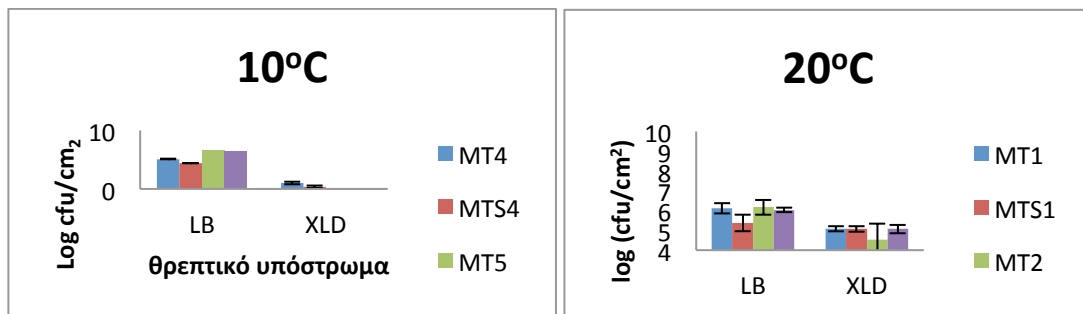
#### Προετοιμασία και Εμβολιασμός Gel cassettes

Η στερεή μήτρα ανάπτυξης (Gel Cassettes) είναι μία κατασκευή η οποία αποτελείται από ένα πλαστικό πλαίσιο πάχους 2 χιλιοστών (mm) με εξωτερικές διαστάσεις 130 x 145 mm και από ένα «παράθυρο» εσωτερικά του πλαισίου διαστάσεων 100 x 100 mm. Το πλαίσιο αυτό είναι επενδυμένο από μεμβράνη οικιακής χρήσης, πάχους 15μm. Για την προετοιμασία της στερεής μήτρας ανάπτυξης το πλαίσιο καλύφθηκε με μεμβράνη οικιακής χρήσης και σφραγίστηκε θερμικά με αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά (Brocklehurst et al. 1997). Αρχικά έγινε η πλήρωση των Gel Cassettes με το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (LB agar, στερεό εκχύλισμα ρόκας). Αφού στερεοποιήθηκε το υλικό ακολούθησε εξάπλωση του εμβολίου με πλαστικό κρίκο μιας χρήσης σε όλη την επιφάνεια του υλικού.

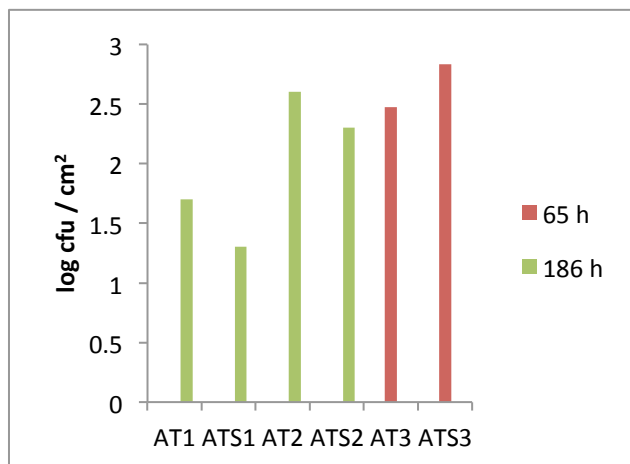
#### Απαρίθμηση Μικροβιακού Πληθυσμού στο Gel cassette και φυτικό ιστό

Το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα αφαιρέθηκε ασηπτικά με αποστειρωμένη λαβίδα από την στερεή μήτρα ανάπτυξης και τοποθετήθηκε σε σακούλα Stomacher με φίλτρο, στην οποία προστέθηκε Ringer (20 ml). Ακολούθησαν μαλάξεις μέχρι την πλήρη διαλυτοποίησή του. Ομοίως, αναλύθηκε και ο εμβολιασμένος φυτικός ιστός. Έπειτα 1 ml από το εκάστοτε ομογενοποιημένο δείγμα χρησιμοποιείται για τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και την απαρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού. Στην περίπτωση των δειγμάτων φυτικού ιστού πραγματοποιήθηκε επίστρωση και σε τρυβλία επιλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος XLD ή BP για τα στελέχη *Salmonella* και *Staphylococcus* αντίστοιχα.

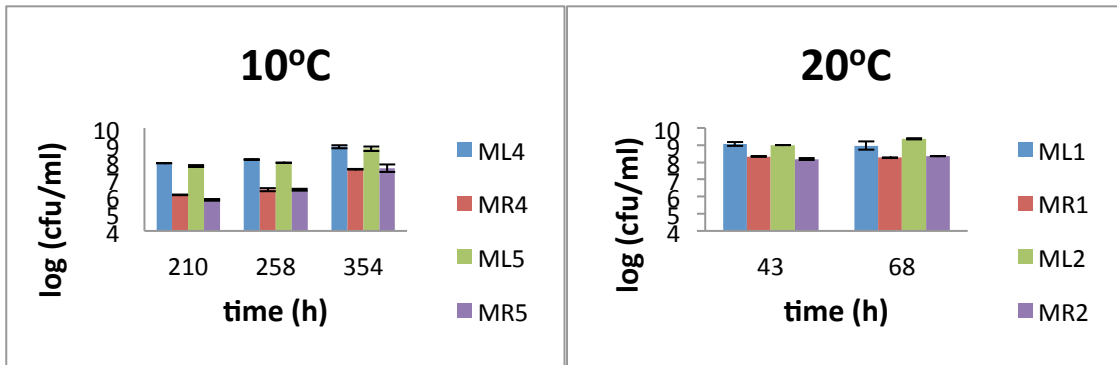
## Παράρτημα Ι – Αποτελέσματα



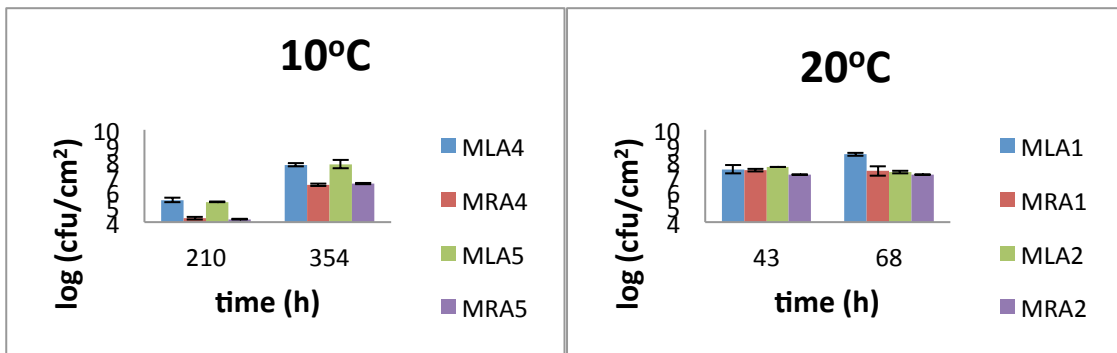
**Γράφημα 1.** Ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) (XLD) στους 10 (4, 5) και 20°C (1, 2) σε δείγματα φυτικού ιστού ρόκας στην επιφάνεια (MT) και την πλευρά των στοματίων (MTS) παρουσία την ενδογενούς χλωρίδας (LB).



**Γράφημα 2.** Ανάπτυξη του παθογόνου *Staphylococcus aureus* strain COL (MRSA) σε φυτικό ιστό (ρόκα) στην επιφάνεια (AT) και στην πλευρά των στοματίων (ATS) στους 10 (1), 15 (2) και 20°C (3).



**Γράφημα 3.** Ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) στους 10 (4, 5) και 20°C (1, 2) σε θρεπτικό υπόστρωμα LB (ML) και εκχύλισμα ρόκας (MR).



**Γράφημα 4.** Ανάπτυξη του στελέχους *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) στους 10 (4, 5) και 20°C (1, 2) σε gel cassette με θρεπτικό υπόστρωμα LB (MLA) και εκχύλισμα ρόκας (MRA).



## Παράρτημα II

### Παράρτημα II – Πειραματικός σχεδιασμός

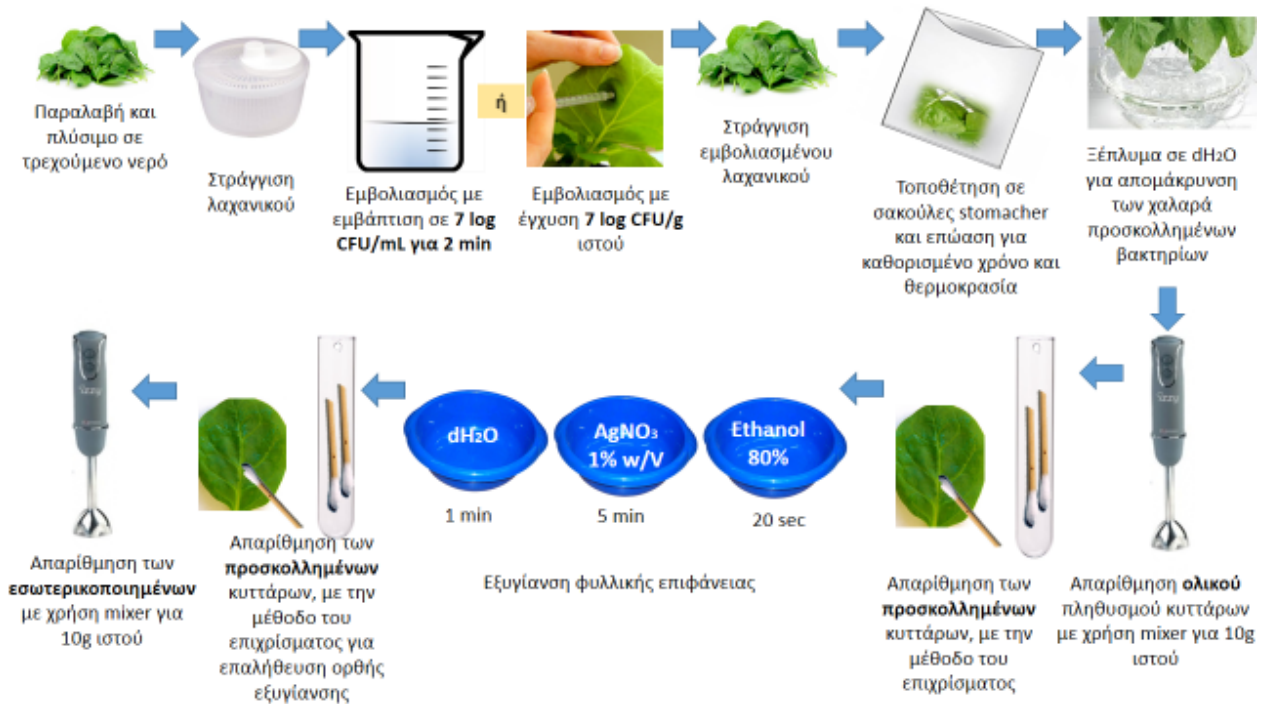
#### Εκτίμηση της ικανότητας των στελεχών *Salmonella spp.* να εποικίζουν φυλλικές επιφάνειες

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μικροβιακά στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Πίνακας 1), τα οποία διατηρούνταν, στους -20 °C σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, παρουσία γλυκερόλης 20% v/v, στην τράπεζα μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

**Πίνακας 1.** Στελέχη *Salmonella spp.* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Κωδικός	Στέλεχος	Εργαστηριακός αριθμός	Προέλευση
PS1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	4/74	Έντερα μοσχαριού
PS3	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Agona	23	Ζωοτροφές
PS4	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis	167	Ζωοτροφές
PS12	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis PTA P167807	PT4	Ζωοτροφές

Τα λαχανικά που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη ήταν το μαρούλι (*Lactuca sativa*), το σπανάκι (*Spinacia oleracea*), τα χόρτα βλήτα (*Amaranthus blitum*), η ρόκα (*Eruca sativa*) και τα ιταλικά χόρτα - ραδίκια (*Cichorium intybus*). Όλα τα λαχανικά προμηθεύονταν από την τοπική υπεραγορά. Τα λαχανικά ακολούθως πλένονταν σε νερό βρύσης και εμβολιάζονταν με κάθε στέλεχος *Salmonella spp.* ξεχωριστά, με εμβάπτιση (συγκέντρωση εμβολίου 7 log CFU/mL). Ακολουθούσε συντήρηση των λαχανικών για 2 και 48 ώρες στους 5 και 20°C υπό αερόβιες συνθήκες. Μετά τη συντήρηση εκτιμούνταν, όπως περιγράφεται παρακάτω, ο αριθμός των ολικών, προσκολλημένων και ενδοφυτικών κυττάρων του παθογόνου καθώς και η ολική μικροβιακή χλωρίδα (σε ανεμβολίαστα δείγματα). Αναλυτικά η πειραματική διαδικασία παρουσιάζεται στο διάγραμμα ροής στην **Εικόνα 1**.



Εικόνα 1. Διαγραμματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας.

Η παραλαβή των διαφορετικών κυττάρων του παθογόνου (ολικών ενδοφυτικών και προσκολλημένων) από τον εκάστοτε φυτικό ιστό πραγματοποιούνταν ως εξής:

- Προσδιορισμός συνολικού πληθυσμού (total): 10 g λαχανικού αραιώθηκαν σε Ringer (1:10) και ομογενοποιήθηκαν με χρήση ομογενοποιητή χειρός.
- Προσδιορισμός του πληθυσμού των προσκολλημένων κυττάρων: έγινε με τη μέθοδο επιχρίσματος (swabbing). Χρησιμοποιήθηκαν 2 μπατονέτες για 10 g φύλλων λαχανικού οι οποίες εμβάπτιστηκαν σε 10 mL Ringer.
- Προσδιορισμός του ενδοφυτικού πληθυσμού: η επιφάνεια των εκάστοτε φύλλων εξυγιανόταν με εμβάπτιση για χρόνο 20 δευτ. σε αιθανόλη 80% v/v, ακολούθως για 5 λεπτά σε υδατικό διάλυμα νιτρικού αργύρου (1% w/v) και τέλος σε νερό για 1 λεπτό. Στη συνέχεια 10 g λαχανικού αραιώνονταν σε Ringer (1:10) και ομογενοποιούνταν με χρήση ομογενοποιητή χειρός.

Η καταμέτρηση του μικροβιακού πληθυσμού έγινε με επίστρωση σε κατάλληλα στερεά θρεπτικά μέσα όπως περιγράφεται παρακάτω:

- Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ): Ποσότητα 0.1 mL από την κατάλληλη δεκαδική αραιώση επίστρωθηκε (spread) σε τρυβλία με μη επιλεκτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Agar (TSA). Ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 48 ώρες και καταμέτρηση όλων των αποικιών που αναπτύχθηκαν.
- *Salmonella* spp: Ακολουθήθηκε η τεχνική διπλής στρώσης (TSA-μη επιλεκτικό υλικό, XLD-επιλεκτικό υλικό) με σκοπό την καλύτερη ανάκτηση τραυματισμένων κυττάρων. Συγκεκριμένα, ποσότητα 0.1 mL από την κατάλληλη δεκαδική αραιώση επίστρωθηκε (spread) σε τρυβλία με

μη επιλεκτικό υπόστρωμα TSA. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1-2 ώρες και εφαρμογή δεύτερη στρώσης επιλεκτικού υποστρώματος XLD (Xylose lysine deoxycholate agar) και επώαση στους 37 °C για 22 – 23 ώρες.

#### Εκτίμηση της οξεοανθεκτικότητας του παθογόνου *Salmonella* spp.

Η υποβολή σε όξινη καταπόνηση των εμβολιασμένων με *Salmonella* λαχανικών πραγματοποιούταν ύστερα από συντήρηση αυτών για 2 και 48 ώρες σε θερμοκρασίες 5 και 20°C. Εκτίμηση της οξεοανθεκτικότητας του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. πραγματοποιήθηκε μόνο για το στέλεχος *S. Enteritidis* (PS12). Πιο συγκεκριμένα η όξινη καταπόνηση διενεργούταν στους 37 °C σε προθερμασμένο TSB με pH 2.7, το οποίο ρυθμιζόταν υπό ασηπτικές συνθήκες με χρήση HCl (6N), με σκοπό να προσομοιάζονται οι συνθήκες του ανθρώπινου στομάχου. Η όξινη καταπόνηση για κάθε τύπο κυττάρων (ολικά, ενδοφυτικά και προσκολλημένα) γινόταν ως εξής:

- Συνολικός πληθυσμός (total) του παθογόνου μικροοργανισμού: 10 g λαχανικού αραιώθηκαν (1:10) σε TSB με χαμηλό pH και ομογενοποιήθηκαν με χρήση ομογενοποιητή χειρός.

- Προσκολλημένα κύτταρα του παθογόνου στην επιφάνεια του λαχανικού έγινε με τη μέθοδο επιχρίσματος (swabbing). Χρησιμοποιήθηκαν 2 βαμβακοφόροι στειλεοί για κάθε 10 g λαχανικού οι οποίοι στη συνέχεια τοποθετούνταν σε 10 mL TSB με χαμηλό pH και ομογενοποιημένο ιστό λαχανικού. Ο ομογενοποιημένος ιστός λαχανικού προστίθετο ώστε τα κύτταρα να εκτεθούν στις ίδιες συνθήκες με τα ολικά και ενδοφυτικά κύτταρα καθώς η παρουσία ιστού ενδέχεται να έχει προστατευτικό ρόλο για τα κύτταρα κατά την έκθεσή τους σε όξινη καταπόνηση. Επιπλέον, η έκθεση του παθογόνου σε ακραία όξινη καταπόνηση παρουσία φυτικού ιστού προσομοιάζει καλύτερα το περιβάλλον στο οποίο θα εκτεθούν τα βακτηριακά κύτταρα στο εσωτερικό του ανθρώπινου στομάχου, δεδομένου ότι η μάσηση του λαχανικού και συνεπώς η ομογενοποίησή του θα έχει ήδη προηγηθεί σε προηγούμενο στάδιο.

- Ενδοφυτικά κύτταρα του παθογόνου αφότου είχε προηγηθεί η εξυγίανση της επιφάνειας του λαχανικού. 10 g λαχανικού αραιώνονταν (1:10) σε TSB με χαμηλό pH και ομογενοποιήθηκαν με χρήση ομογενοποιητή χειρός.

Σε κάθε περίπτωση, η όξινη καταπόνηση πραγματοποιούταν στους 37 °C για συνολικό χρόνο έως 90 λεπτά, ενώ η καταμέτρηση των επιβιωσάντων κυττάρων του παθογόνου λάμβανε χώρα ανά 15 λεπτά με επίστρωση του παθογόνου σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ακολουθώντας την τεχνική διπλής στρώσης (TSA, XLD) όπως περιγράφεται παραπάνω. Η επιβίωση του παθογόνου εκφράστηκε ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε χρόνο  $t_x$  προς τον αρχικό πληθυσμό σε χρόνο  $t_0$ .

#### Εκτίμηση της μεταβολής των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης

##### Απομόνωση ολικού RNA

Με σκοπό τη μελέτη της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται είτε με απόκριση του παθογόνου έναντι καταπονήσεων, είτε με τη λοιμωξιόγρο δράση του παθογόνου *Salmonella* spp όταν έχει προσκολληθεί ή βρίσκεται στο εσωτερικό του φυτικού ιστού των υπό μελέτη λαχανικών, 9 mL λαμβάνονταν από το εκάστοτε δείγμα στο οποίο γινόταν προσθήκη 1/10 του όγκου RNA Stop solution (95 % v/v EtOH/ 5 % v/v phenol-water saturated). Στη συνέχεια, η

βιομάζα συλλεγόταν με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 3600 rpm, απορριπτόταν το υπερκείμενο και τα βακτηριακά ιζήματα φυλάσσονταν στους -20 °C.

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο hot phenol/ SDS, όπως περιγράφεται από τους Jahn *et al*, (2008), με μικρές τροποποιήσεις. Αρχικά προηγείτο λύση των κυττάρων με προσθήκη 500 µL διαλύματος λύσης (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 και 0.5 mg/mL λυσοζύμη). Στη συνέχεια, προστίθετο 50 µL SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, 10 % w/v) και επώαση στους 65 °C για 3 λεπτά. Ακολούθως, προστίθετο 18 µL CH<sub>3</sub>COONa (3M, pH 5.2) και 600 µL προθερμασμένη όξινη φαινόλη και επώαζονταν στο 65 °C για 6 λεπτά. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνταν άμεσα στον πάγο, όπου και παρέμεναν για 1-2 λεπτά. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 5 λεπτά. Έπειτα το υπερκείμενο μεταφερόταν σε νέο σωλήνα errendorf και προστίθεντο μία συγκεκριμένη αναλογία φαινόλης: χλωροφορμίου: ισοαμυλική αλκοόλης (24:24:1), αναδευόταν και φυγοκεντρούνταν στις 12000 rpm για 3 λεπτά. Επαναλαμβάνονταν το προηγούμενο βήμα και ακολούθως το υπερκείμενο μεταφερόταν σε 1 V χλωροφορμίου: ισοαμυλική αλκοόλη (24:1 v/v) και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 3 λεπτά. Η κατακρήμνιση του RNA πραγματοποιούνταν με την προσθήκη 2.5 V αιθανόλης (100%) και 1/10 V CH<sub>3</sub>COONa (3 M, pH 5.2) και ακόλουθη τοποθέτηση στους -80 °C O/N(over night). Η παραλαβή των νουκλεϊνικών οξέων γινόταν με φυγοκέντρηση στους 4 °C, στις 13000 rpm για 30 λεπτά, καθαρισμό με 500 µL αιθανόλη 70% v/v και φυγοκέντρηση στους 4 °C, στις 12000 rpm για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρυνόταν και τα ιζήματα αφήνονταν να στεγνώσουν για περίπου 20 λεπτά. Το RNA επαναδιαλυόταν σε 25 µL ddH<sub>2</sub>O και φυλασσόταν στους -80 °C. Η συγκέντρωση του RNA προσδιοριζόταν φωτομετρικά (Implen, NanoPhotometer) με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm. Η καθαρότητα των νουκλεϊνικών οξέων προσδιοριζόταν από το λόγο  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ .

Στη συνέχεια τα δείγματα RNA υποβάλλονταν σε χειρισμό με DNase (Promega), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, για την απομάκρυνση του DNA από το δείγμα και κατόπιν καθαρίζονταν με φαινόλη – χλωροφόρμιο, όπως περιγράφεται παραπάνω, καθώς και ο ποσοτικός προσδιορισμός αυτών. Ακολούθως, τα δείγματα RNA ελέγχονταν για την παρουσία υπολειμμάτων DNA πραγματοποιώντας Real time PCR και εξειδικευμένους εκκινητές (16S rRNA), όπως περιγράφεται σε ακόλουθη παράγραφο.

Η ανάστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε σε όγκο 20 µl, χρησιμοποιώντας 300ng ολικό RNA, 50ng τυχαία εξαμερή (random hexamers) και το σύστημα SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

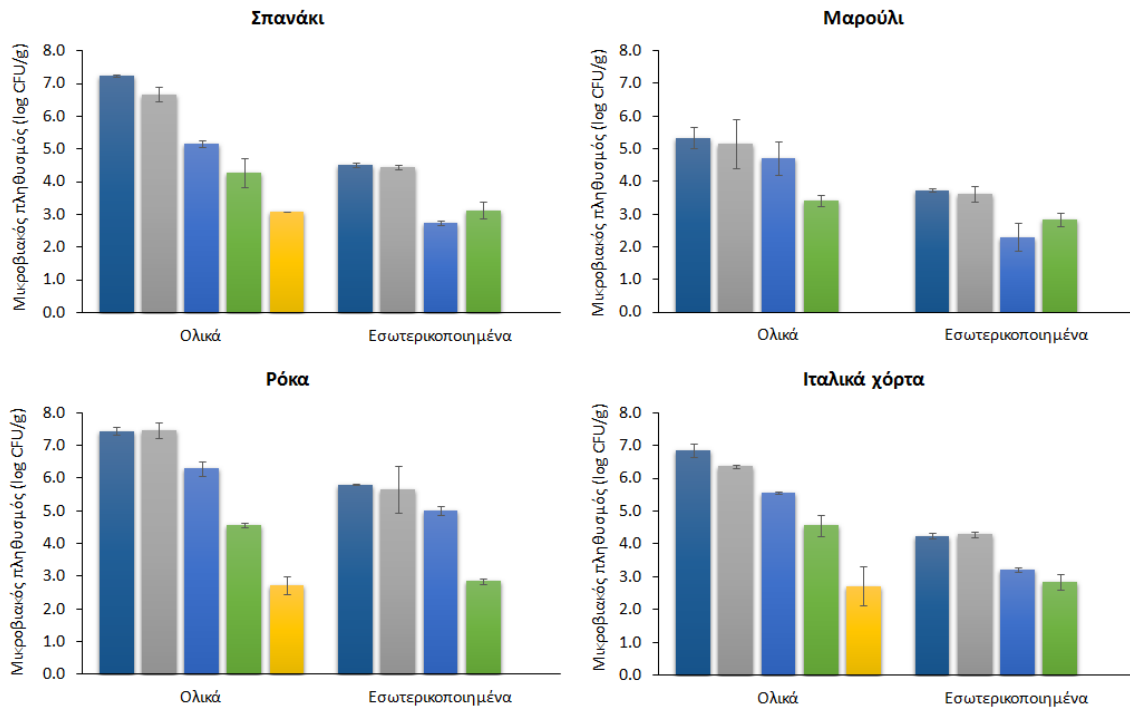
#### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR)

Η Real time PCR πραγματοποιήθηκε στη συσκευή StepOne Plus (Applied Biosystems). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα υπό μελέτη γονίδια, προέκυψαν μετά από βιβλιογραφική αναζήτηση και φαίνονται στον Πίνακα 2. Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης PCR (PCR efficiency, E) για κάθε ζεύγος εκκινητών προσδιορίστηκε βάσει της εξίσωσης  $E=10^{-1/\text{slope}}$  (Pfaffl 2004), χρησιμοποιώντας διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις cDNA. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνταν σε όγκο 10µl, χρησιμοποιώντας 1µl cDNA ως μήτρα, 2X KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X)ABI

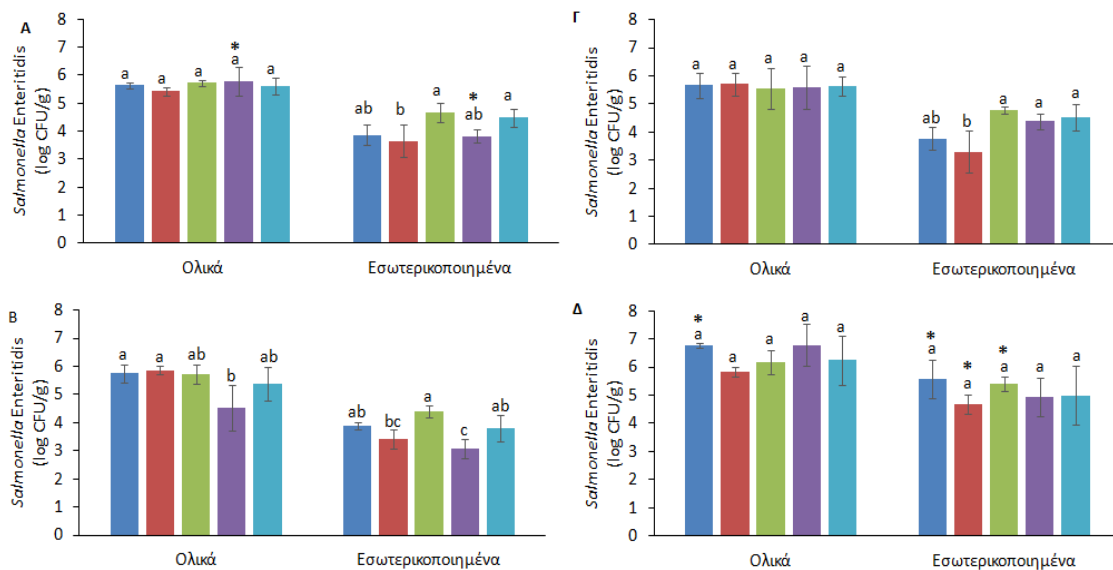
Prism™ (Κατα Biosystems) και τους εξειδικευμένους για κάθε γονίδιο εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0,2μmol. Για όλα τα γονίδια ακολουθήθηκε τα παρακάτω θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 95 °C για 1 λεπτό, 40 κύκλοι 95 °C για 3 δευτ., 55 °C για 30 δευτ., 72 °C για 30 δευτ., ενώ ακολουθούσε ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης (Melting Curve Analysis) ως εξής: 95 °C για 15 δευτ., 60 °C για 1 λεπτό και 95 °C (ρυθμό αύξησης θερμοκρασίας 0.3 °C δευτ.<sup>-1</sup> για 15 δευτ.). Για κάθε γονίδιο, περιλαμβάνονταν θετικός και αρνητικός μάρτυρας.

Τα επίπεδα έκφρασης των διαφορετικών γονιδίων κανονικοποιήθηκαν ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς *16SrRNA*, ως καθολικά εκφραζόμενο γονίδιο (reference gene). Ο προσδιορισμός των επιπέδων σχετικής έκφρασης υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του Pfaffl (2001), η οποία λαμβάνει υπ' όψη τις διαφορετικές αποδόσεις PCR (PCR Efficiencies) των υπό μελέτη γονιδίων. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για κάθε περίπτωση είναι ο μέσος όρος τριών βιολογικών επαναλήψεων, ενώ διενεργηθήκαν και τεχνικές επαναλήψεις (technical replicates), επιλεκτικά, για κάποια δείγματα.

## Παράρτημα II – Αποτελέσματα

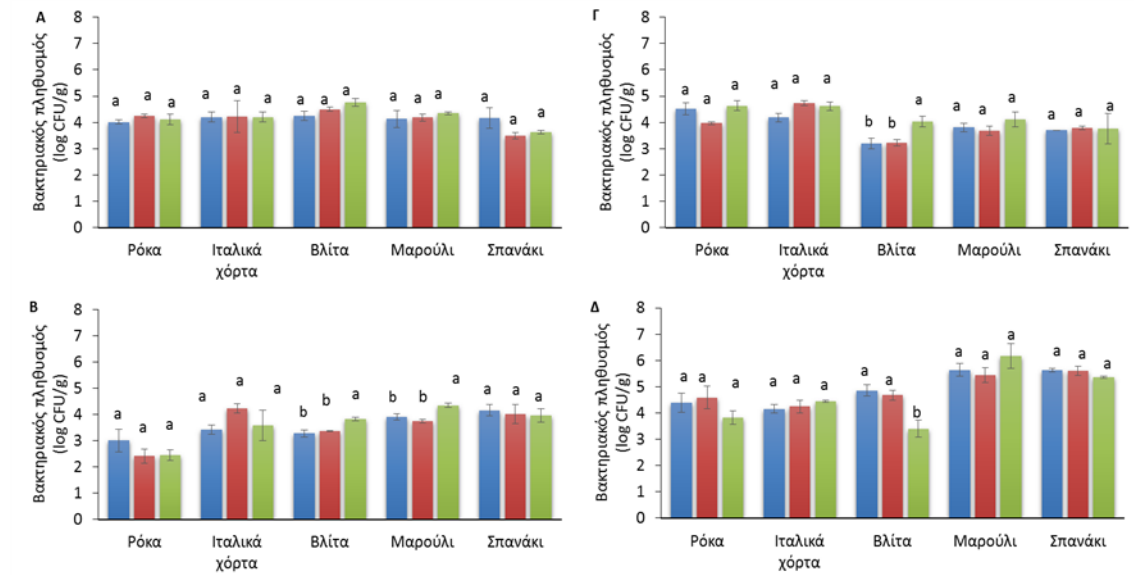


**Γράφημα 1.** Διαγραμματική απεικόνιση του ολικού και ενδοφυτικού πληθυσμού (log CFU/g) των μικροοργανισμών που απαντώνται στα λαχανικά (σπανάκι, μαρούλι, ρόκα, ιταλικά χόρτα). Τα επίπεδα των διαφορετικών μικροοργανισμών που εντοπίστηκαν στα λαχανικά επισημαίνονται με διαφορετικό χρώμα: ολική μεσόφιλη χλωρίδα (μπλε), ψευδομονάδες (γκρι), μύκητες/ζύμες (γαλάζιο), εντεροβακτήρια (πράσινο) και οξυγαλακτικά βακτήρια (κίτρινο).

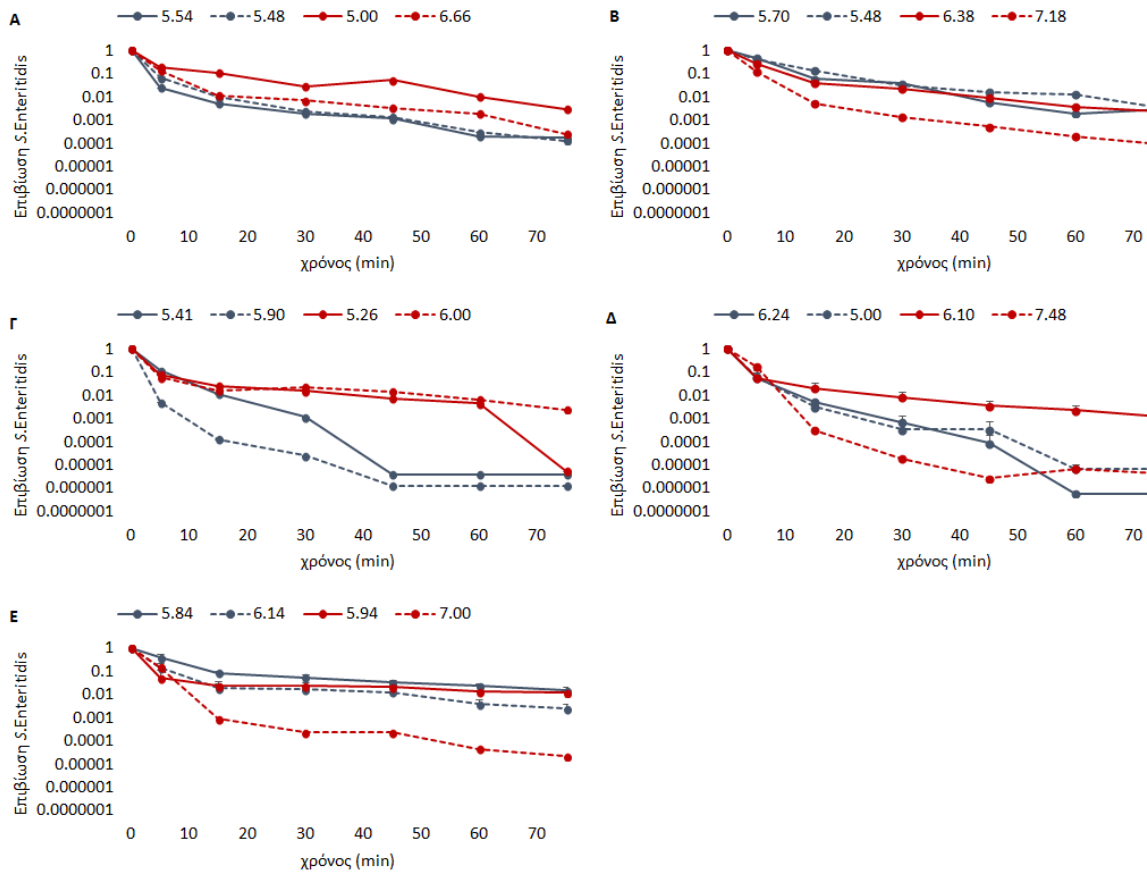


**Γράφημα 2.** Διαγραμματική απεικόνιση του ολικού και ενδοφυτικού πληθυσμού (log CFU/g) *S. Enteritidis* σε μαρούλι (μπλε), βλήτα (κόκκινο), σπανάκι (πράσινο), ρόκα (μωβ) και ιταλικά χόρτα

(γαλάζιο) μετά από συντήρηση στους 5 °C για 2 (Α) ή 48 ώρες (Β) και στους 20 °C για 2 (Γ) ή 48 ώρες (Δ). Η στατιστική ανάλυση εντός των ίδιων πληθυσμών απεικονίζονται με γράμματα, όπου οι περιπτώσεις που δεν έχουν κοινό κάποιο γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0.05$ ). Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές όμοιων πληθυσμών σε κάθε λαχανικό μεταξύ των χρόνων συντήρησης.

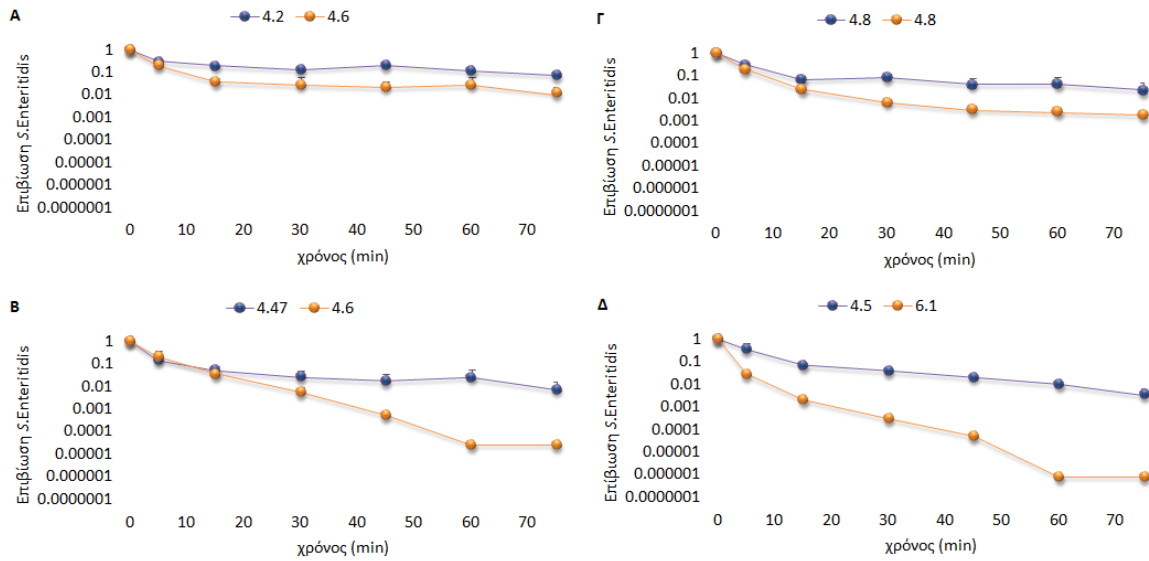


**Γράφημα 3.** Διαγραμματική απεικόνιση του ενδοφυτικού πληθυσμού (log CFU/g) του *S. Enteritidis* (μπλε), *S. Infantis* (κόκκινο) και *S. Typhimurium* (πράσινο) σε ρόκα, ιταλικά χόρτα, βλίτα, μαρούλι και σπανάκι μετά από συντήρηση στους 5 °C για 2 (Α) ή 48 ώρες (Β) και στους 20 °C για 2 (Γ) ή 48 ώρες (Δ). Η στατιστική ανάλυση εντός των ίδιων πληθυσμών απεικονίζονται με γράμματα, όπου οι περιπτώσεις που δεν έχουν κοινό κάποιο γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0.05$ ).

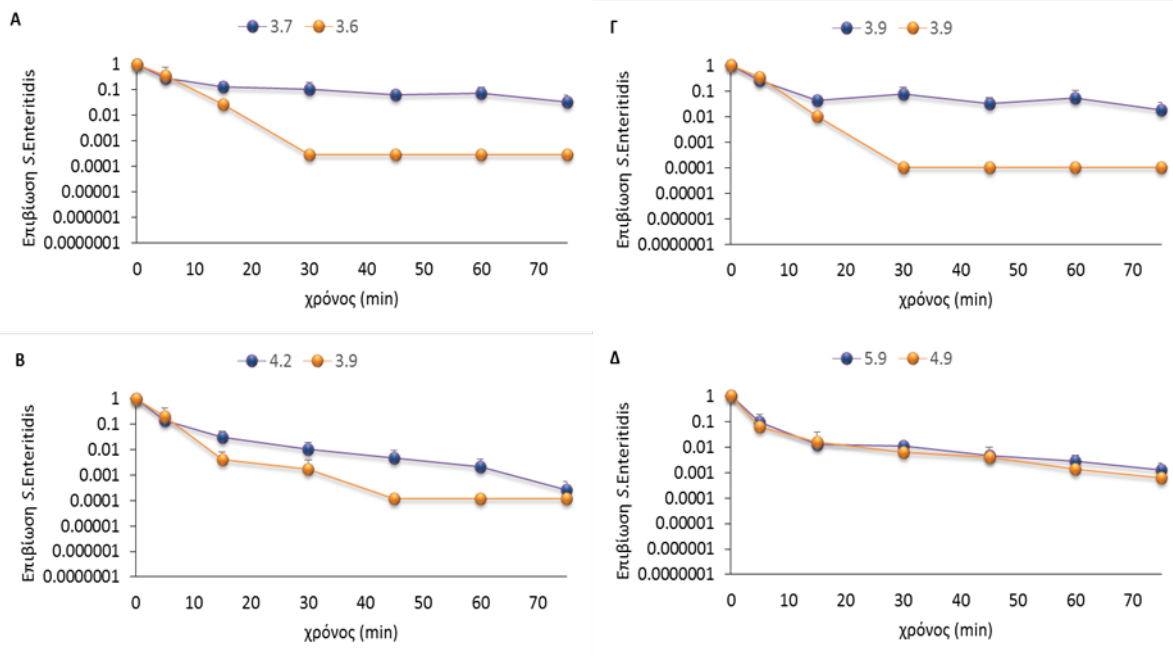


**Γράφημα 4.** Επιβίωση των ολικών κυττάρων του *S. Enteritidis* που ετοιμάζονται μαρούλι (Α), σπανάκι (Β), βλήτα (Γ), ρόκα (Δ) και ιταλικά χόρτα (Ε) ως προς τον χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) μετά από συντήρηση του λαχανικού στους 5 °C για 2 (μπλε) ή 48 ώρες (μπλε διακεκομμένη) και στους 20 °C για 2 (κόκκινο) ή 48 ώρες (κόκκινη διακεκομμένη). Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή ( $t_x$ ) προς τον αρχικό πληθυσμό  $t_0$ , ενώ στο επάνω μέρος κάθε γραφήματος αναφέρονται οι αρχικοί πληθυσμοί του καθενός (log CFU/g).



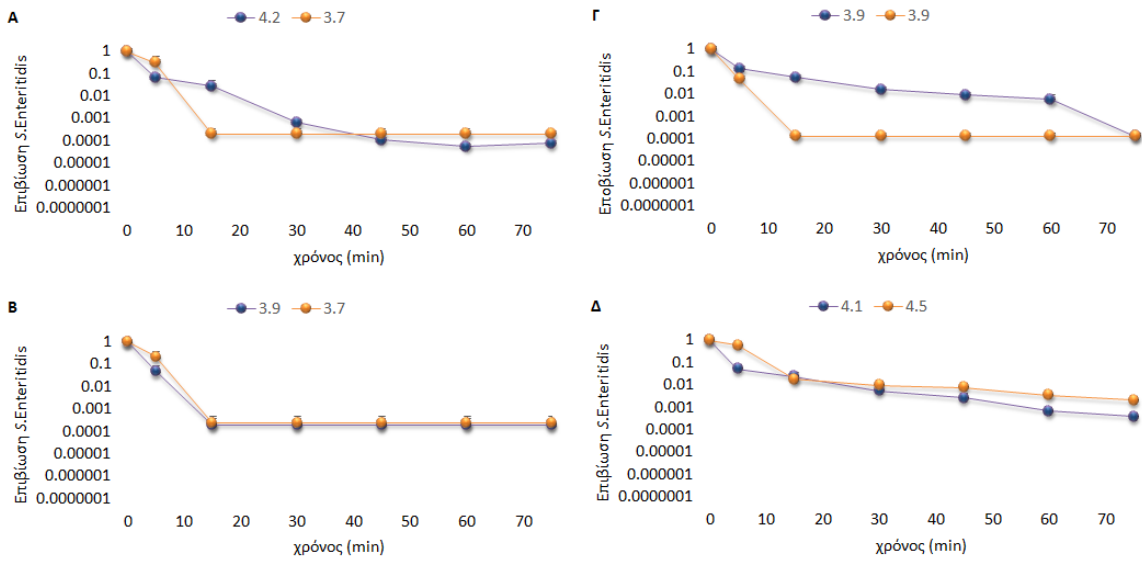


**Γράφημα 5.** Επιβίωση του *S. Enteritidis* που εποικίζει σπανάκι, ως προς το χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) μετά από συντήρηση του λαχανικού στους 5 °C για 2 (Α) ή 48 ώρες (Β) και στους 20 °C για 2 (Γ) ή 48 ώρες (Δ). Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή ( $t_x$ ) προς τον αρχικό πληθυσμό  $t_0$ . Με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται τα προσκολλημένα (μπλε) και ενδοφυτικά (κίτρινο) κύτταρα του παθογόνου, ενώ στο επάνω μέρος κάθε γραφήματος αναφέρονται οι αρχικοί πληθυσμοί του καθενός (log CFU/g).

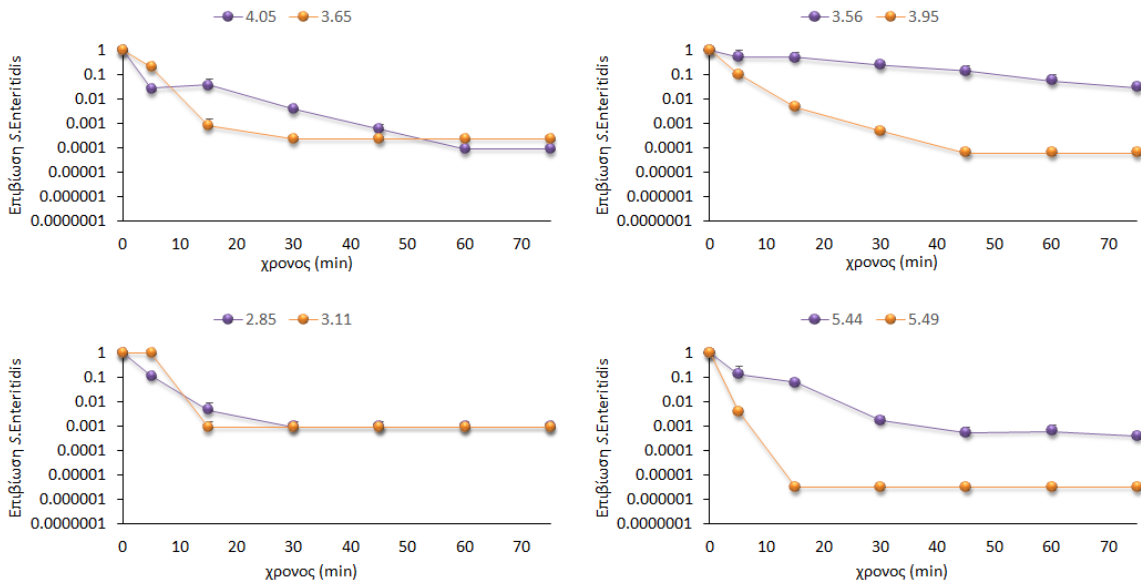


**Γράφημα 6.** Επιβίωση του *S. Enteritidis* που εποικίζει μαρούλι, ως προς το χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) μετά από συντήρηση του λαχανικού στους 5 °C για 2 (Α) ή 48 ώρες (Β) και στους 20 °C για 2 (Γ) ή 48 ώρες (Δ). Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή ( $t_x$ ) προς τον αρχικό πληθυσμό  $t_0$ . Με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται τα προσκολλημένα (μπλε) και ενδοφυτικά (κίτρινο) κύτταρα του παθογόνου,

ενώ στο επάνω μέρος κάθε γραφήματος αναφέρονται οι αρχικοί πληθυσμοί του καθενός (log CFU/g).

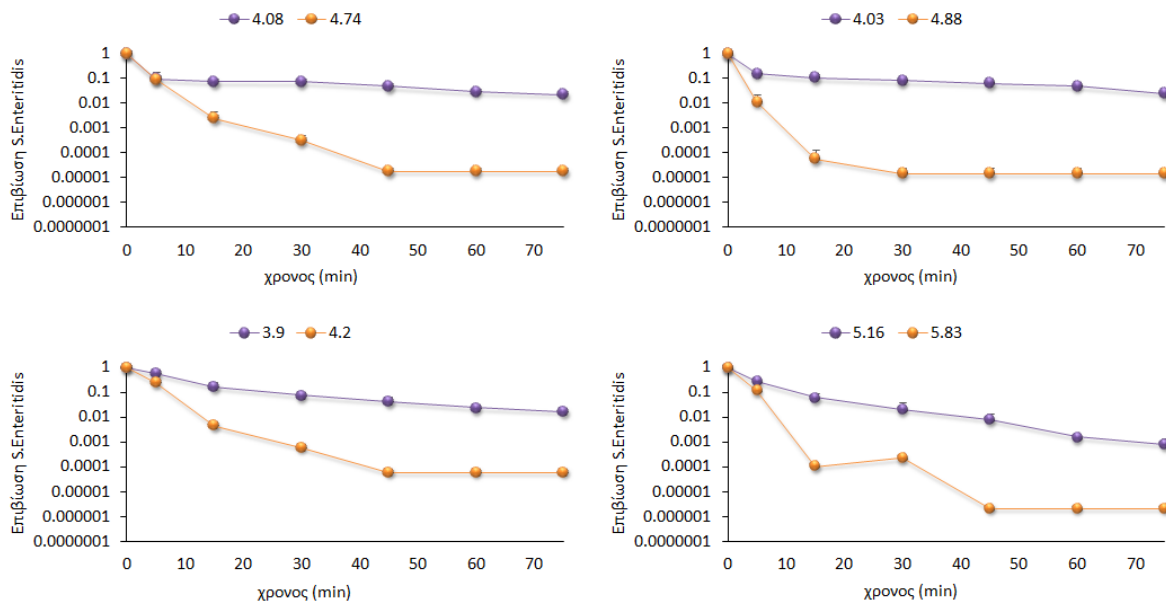


**Γράφημα 7.** Επιβίωση του *S. Enteritidis* που εποικίζει βλήτα, ως προς το χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) μετά από συντήρηση του λαχανικού στους 5 °C για 2 (Α) ή 48 ώρες (Β) και στους 20 °C για 2 (Γ) ή 48 ώρες (Δ). Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή ( $t_x$ ) προς τον αρχικό πληθυσμό  $t_0$ . Με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται τα προσκολλημένα (μπλε) και ενδοφυτικά (κίτρινο) κύτταρα του παθογόνου, ενώ στο επάνω μέρος κάθε γραφήματος αναφέρονται οι αρχικοί πληθυσμοί του καθενός (log CFU/g).



**Γράφημα 8.** Επιβίωση του *S. Enteritidis* που εποικίζει ρόκα, ως προς το χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) μετά από συντήρηση του λαχανικού στους 5 °C για 2 (Α) ή 48 ώρες (Β) και στους 20 °C για 2 (Γ) ή 48 ώρες (Δ). Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή ( $t_x$ ) προς τον αρχικό πληθυσμό  $t_0$ . Με διαφορετικό

χρώμα απεικονίζονται τα προσκολλημένα (μπλε) και ενδοφυτικά (κίτρινο) κύτταρα του παθογόνου, ενώ στο επάνω μέρος κάθε γραφήματος αναφέρονται οι αρχικοί πληθυσμοί του καθενός (log CFU/g).



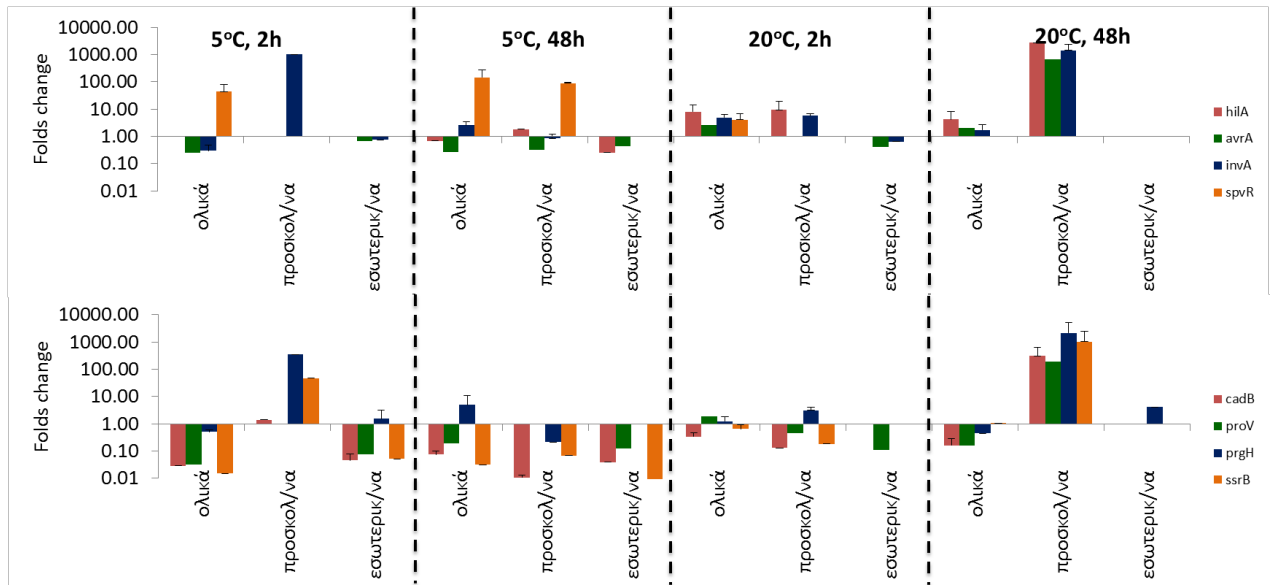
**Γράφημα 9.** Επιβίωση του *S. Enteritidis* που εποικίζει ιταλικά χόρτα, ως προς το χρόνο κατά την έκθεσή του παθογόνου σε όξινη καταπόνηση (pH 2.7) μετά από συντήρηση του λαχανικού στους 5 °C για 2 (Α) ή 48 ώρες (Β) και στους 20 °C για 2 (Γ) ή 48 ώρες (Δ). Η επιβίωση εκφράζεται ως ο λόγος των επιβιωσάντων κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή ( $t_x$ ) προς τον αρχικό πληθυσμό  $t_0$ . Με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται τα προσκολλημένα (μπλε) και ενδοφυτικά (κίτρινο) κύτταρα του παθογόνου, ενώ στο επάνω μέρος κάθε γραφήματος αναφέρονται οι αρχικοί πληθυσμοί του καθενός (log CFU/g).

**Πίνακας 2.** Ανακτώμενος ολικός, προσκολλημένος και ενδοφυτικός πληθυσμός *S. Enteritidis* (log CFU/g) σε μαρούλι, βλήτα και σπανάκι, ρόκα και ιταλικά χόρτα την χρονική στιγμή  $t=60$  λεπτά της όξινης καταπόνησης. ΥΟΑ: υπό του ορίου ανίχνευσης.

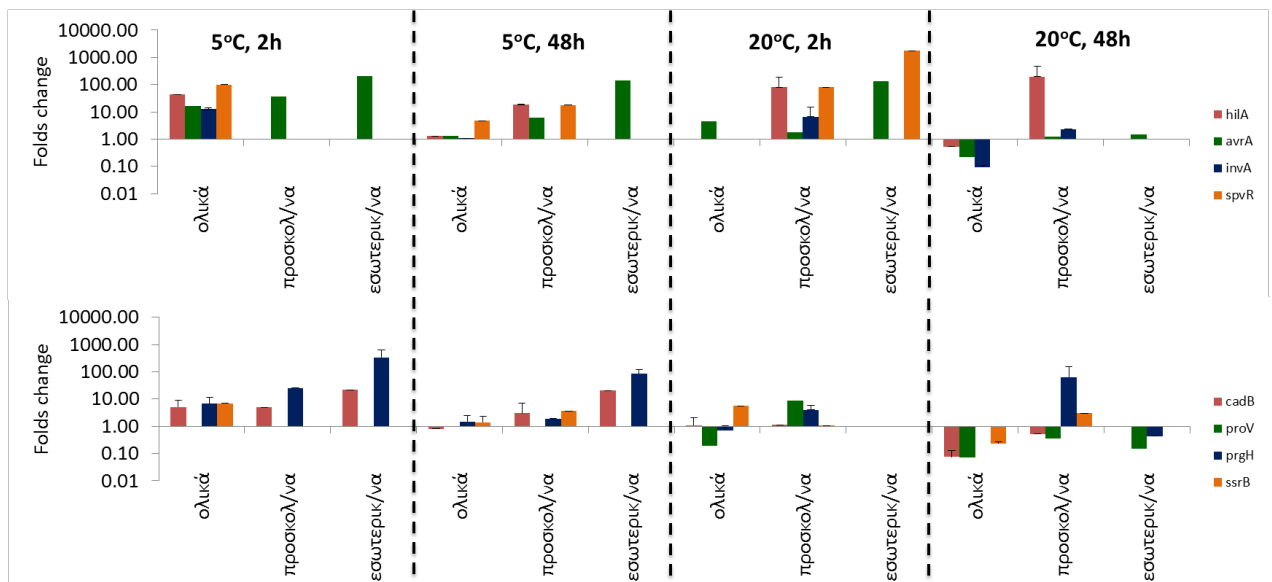
Λαχανικό	Μαρούλι				Βλήτα				Σπανάκι			
	5°C		20°C		5°C		20°C		5°C		20°C	
Θερμοκρασία												
Χρόνος	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h
Ολικά	1.84±0.00	1.95±0.00	3.02±0.00	3.92±0.00	ΥΟΑ	ΥΟΑ	2.90±0.00	3.81±0.00	3.00±0.00	3.60±0.00	3.95±0.00	3.47±0.00
Προσκολλημένα	2.48±0.24	1.38±0.09	2.51±0.21	3.25±0.39	ΥΟΑ	ΥΟΑ	1.59±0.28	0.96±0.12	3.26±0.08	2.67±0.12	3.12±0.55	2.44±0.39
Εσωτερικοποιημένα	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ	0.92±1.30	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ	1.03±1.47	2.88±0.15	ΥΟΑ	2.15±0.10	ΥΟΑ
Λαχανικό	Ρόκα				Ιταλικά χόρτα							
	5°C		20°C		5°C		20°C					
Θερμοκρασία												
Χρόνος	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h	2 h	48 h				
Ολικά	ΥΟΑ	ΥΟΑ	3.53±0.15	2.28±0.17	4.14±0.10	3.43±0.10	4.04±0.04	2.48±0.46				
Προσκολλημένα	ΥΟΑ	ΥΟΑ	2.24±0.18	2.17±0.58	2.54±0.04	2.26±0.09	2.74±0.10	2.33±0.26				
Εσωτερικοποιημένα	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ	ΥΟΑ				

**Πίνακας 3.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Γονίδιο στόχος	Ορθός εκκινητής (5'→3')	Ανάστροφος εκκινητής (3'→5')	Μήκος προϊόντος (bp)	Απόδοση PCR	Πηγή
<i>RpoS</i>	GAATCTGACGAACACGCTCA	CCACGCAAGATGACGATATG	171	1.93	Yang et al., 2014
<i>spvR</i>	GAGAGCCGTTAACAGCCAAA	ATATCAGGTTGCCGAGAG	171	2.0	Yang et al., 2014
<i>hilA</i>	ATTAAGGCGACAGAGCTGGA	GCAGAAATGGGCGAAAGTAA	134	1.91	Yang et al., 2014
<i>avrA</i>	GAGCTGCTTTGGTCCTCAAC	AATGGAAGGCGTTGAATCTG	173	1.93	Yang et al., 2014
<i>16SrRNA</i>	CAGAAGAAGCACCGGCTAAC	GACTCAAGCCTGCCAGTTTC	167	1.92	Yang et al., 2014
<i>invA</i>	CAACGTTTCCTGCGTACTGT	CCCGAACGTGGCGATAATT	116	1.95	Gonzales-Escalona et al, 2009
<i>ssrB</i>	GCGTTGGCCAGCAATGAATA	TTGCAATGCCGCTAACAGAA	136	1.93	Tomjenovic-Berube PhD thesis, 2012
<i>prgH</i>	GCTCTTTCTTGCTCATCGT	ATCTCTATCTGGCTGGATACCT	121	1.92	Brunelle et al., 2013
<i>proV</i>	CCACAATGGTACGCCTTCTCA	GCATGAGCGCAAATGACTGGA	153	1.9	Finn et al., 2013
<i>cadB</i>	TCCAGACCGGCGTTCTTTAT	ATGCCGGAAGAACGTAGAA	96	1.95	Alvarez-Oldorez et al., 2010



**Γράφημα 10.** Σχετική μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων *hilA*, *avrA*, *invA*, *spvR*, *cadB*, *proV*, *prgH* και *ssrB* κατά την συντήρηση βλήτων στους 5 ή 20 °C για 2 ή για 48 ώρες. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν τη σχετική μεταβολή των επιπέδων έκφρασης κάθε γονιδίου για κάθε περίπτωση ως προς πλαγκτονικών κυττάρων *S. Enteritidis* μετά από 2 ώρες στους 20 °C, χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Pfaffl. Το ενδογενές γονίδιο αναφοράς *16SrRNA* χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν την τυπική απόκλιση στα επίπεδα μεταβολής της έκφραση των γονιδίων μεταξύ τριών βιολογικών επαναλήψεων.

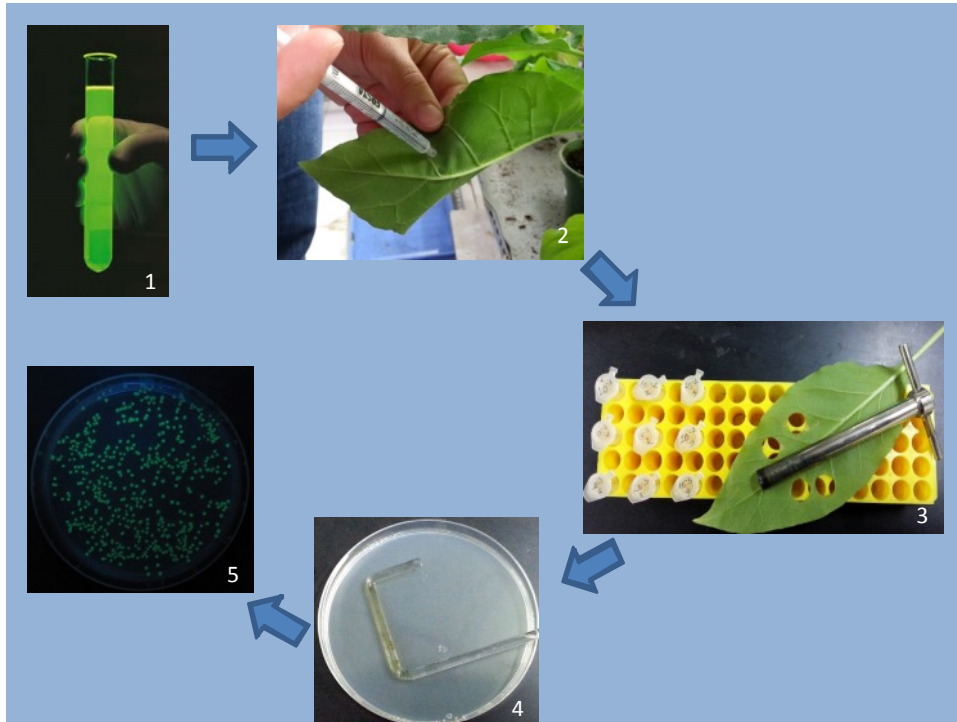


**Γράφημα 11.** Σχετική μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων *hilA* (κόκκινο), *avrA* (πράσινο), *invA* (μπλε), *spvR* (πορτοκαλί), *cadB* (κίτρινο), *proV* (μωβ), *prgH* (γαλάζιο) και *ssrB* (κόκκινο) κατά την συντήρηση σπανακίου στους 5 ή 20 °C για 2 ή 48 ώρες. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν τη σχετική

μεταβολή των επιπέδων έκφρασης κάθε γονιδίου για κάθε περίπτωση ως προς πλαγκτονικών κυττάρων *S. Enteritidis* μετά από 2 ώρες στους 20 °C, χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Pfaffl. Το ενδογενές γονίδιο αναφοράς *16SrRNA* χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν την τυπική απόκλιση στα επίπεδα μεταβολής της έκφραση των γονιδίων μεταξύ τριών βιολογικών επαναλήψεων.

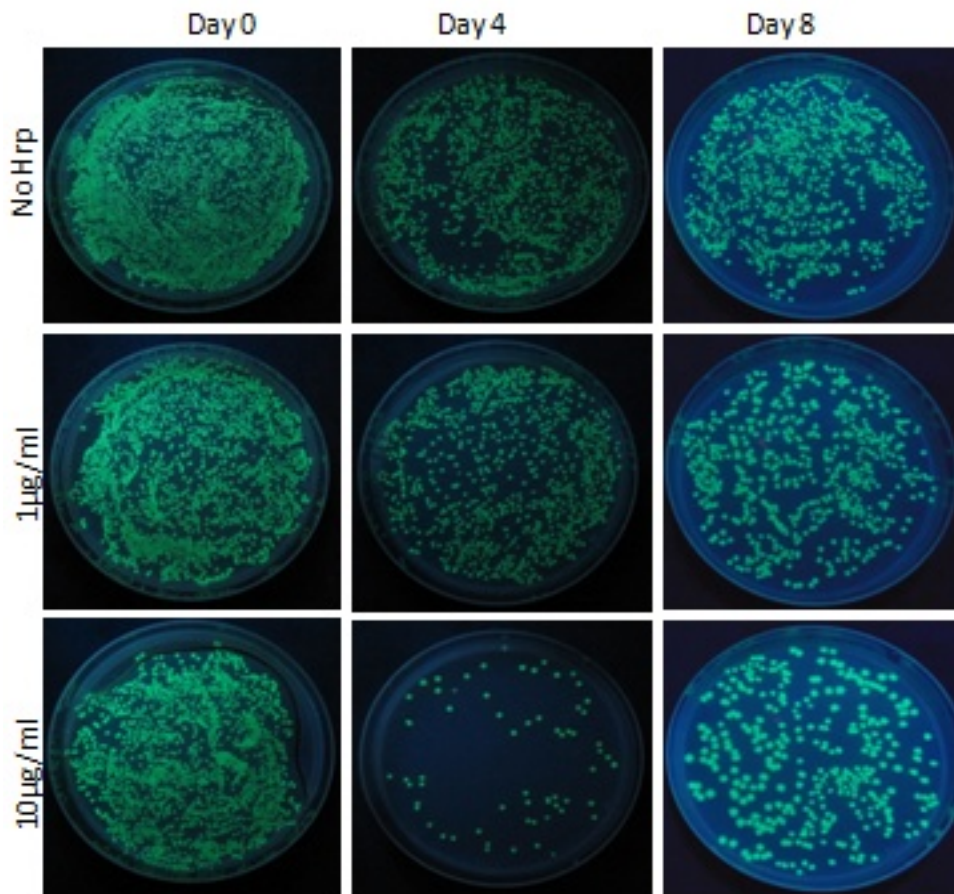
### Παράρτημα III

#### Παράρτημα III – Πειραματικός σχεδιασμός



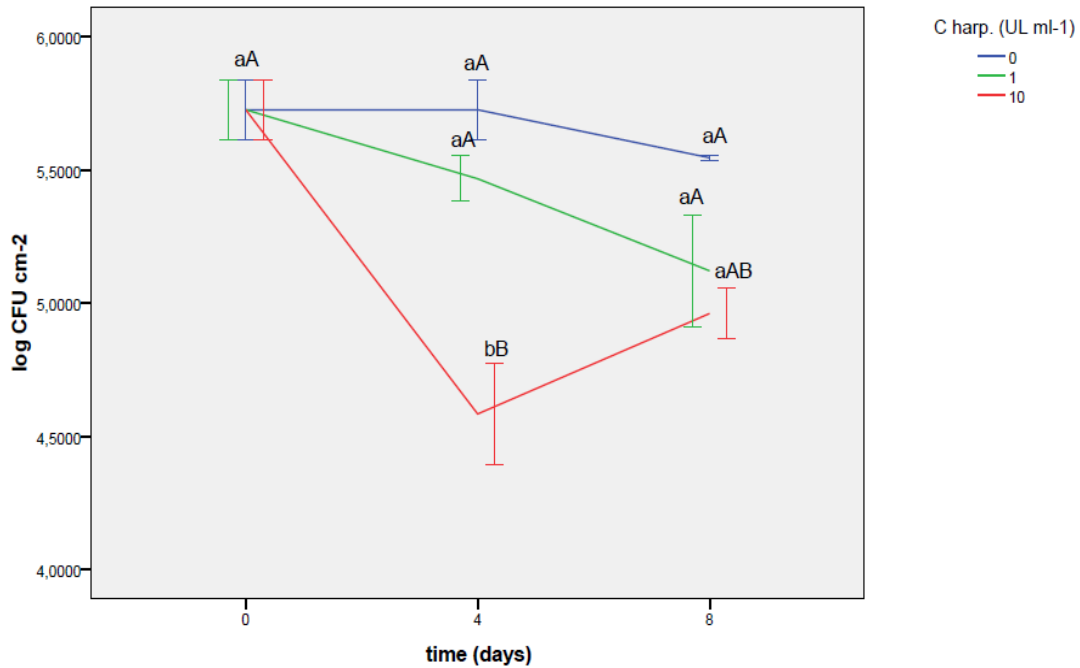
**Εικόνα 1.** Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής πορείας ελέγχου παραμονής της σαλμονέλας κατά την ενδοφυτική της ανάπτυξη στα φύλλα του καπνού. 1. Ολονύχτια ανάπτυξη καλλιέργειας σαλμονέλας σημασμένης με GFP, 2. Εγχυση φύλλων καπνού με διαφορετικές συγκεντρώσεις καλλιέργειας σαλμονέλας. 3. Αποκοπή δισκίων φύλλου έπειτα από 20 ημέρες με χρήση φελοτρυπητήρα (cockboger), λειοτρίβιση των δισκίων για ελευθέρωση των ενδοφυτικών βακτηρίων και πραγματοποίηση διαδοχικών αραιώσεων. 4. Επίστρωση των αραιώσεων σε τρυβλία XLD και LB με καναμκίνη, 5. Έλεγχος ανάπτυξης της σαλμονέλας υπό την ορατή και υπεριώδη ακτινοβολία.

### Παράρτημα III – Αποτελέσματα

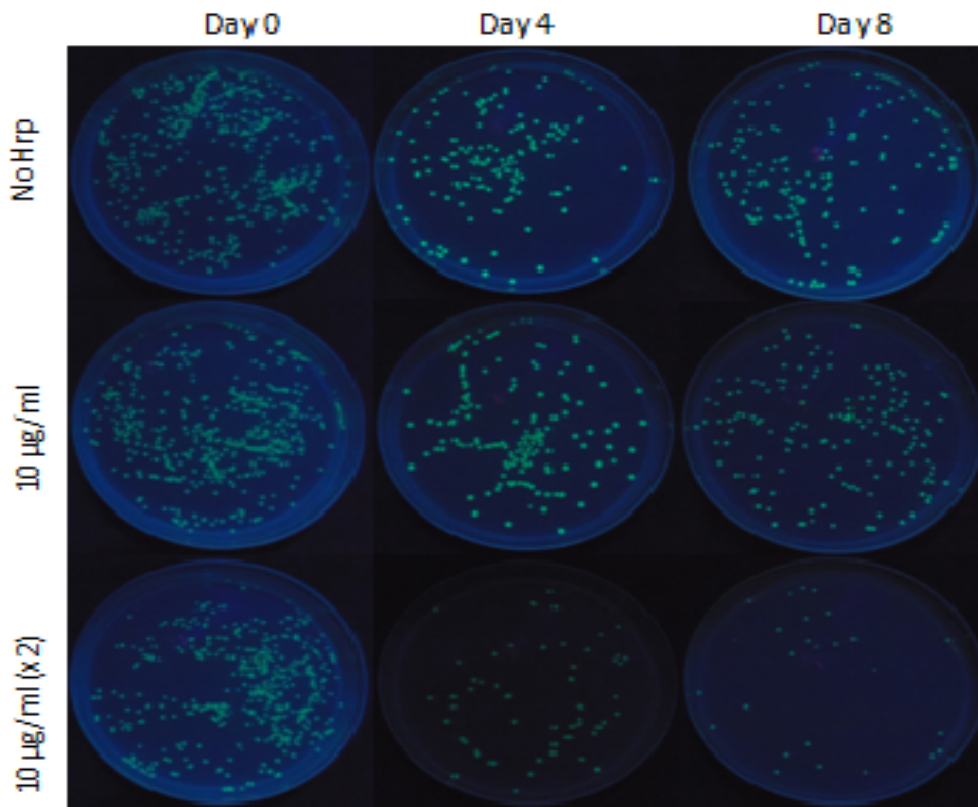


Εικόνα 2. Ενδοφυτική αναπτυξιακή πορεία της σαλμονέλας σε φύλλα καπνού Ξάνθης υπό την επίδραση της χαρπίνης.

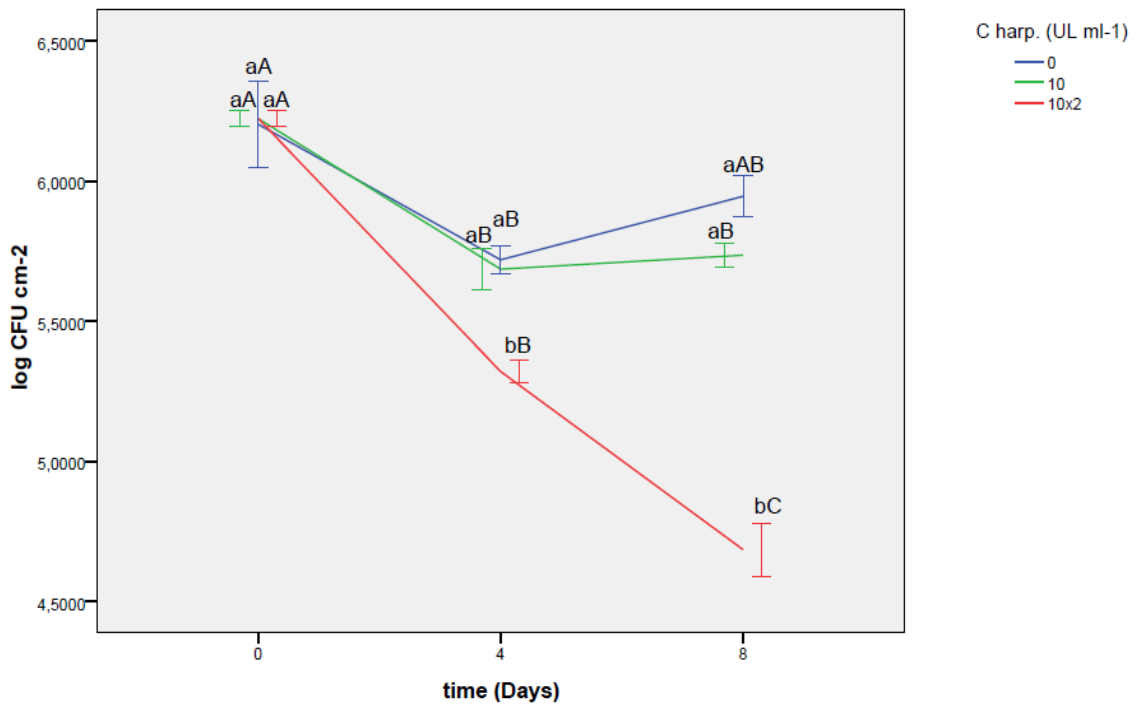




**Εικόνα 3.** Έλεγχος επίδρασης της καθαρής χαρπίνης στην παραμονή της σαλμονέλας στην φυλλική επιφάνεια καπνού Ξάνθης. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η μεταχείριση των φύλλων χωρίς χαρπίνη, με πράσινο χρώμα η μεταχείριση με 1 μg/ml χαρπίνης και με κόκκινο χρώμα η μεταχείριση με 10 μg/ml χαρπίνης. Πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος με το πρόγραμμα SPSS statistics 7.0 (ver. 18). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσες τιμές κάθε μεταχείρισης με το τυπικό σφάλμα με κάθετες μπάρες. Η ανάλυση της διακύμανσης πραγματοποιήθηκε με το Gabriel's t-test σε επίπεδο σημαντικότητας 5% για την σύγκριση των μέσων τιμών. a: στατιστικά μη σημαντικές διαφορές των τριών μεταχειρίσεων την κάθε ημέρα, b: στατιστικά σημαντικές διαφορές των τριών ποικιλιών την κάθε ημέρα, A: στατιστικά μη σημαντικές διαφορές της κάθε ποικιλίας ξεχωριστά ανά τον χρόνο, B: στατιστικά σημαντικές διαφορές της κάθε ποικιλίας ξεχωριστά ανά τον χρόνο σε σχέση με το A, C: στατιστικά σημαντικές διαφορές της κάθε ποικιλίας ξεχωριστά ανά τον χρόνο σε σχέση με το A και το B, AB: στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση είτε με το A είτε με το B.



Εικόνα 4. Ενδοφυτική αναπτυξιακή πορεία της σαλμονέλας σε φύλλα καπνού υπό την επίδραση της χαρπίνης.



**Εικόνα 5.** Έλεγχος επίδρασης της χαρπίνης στην παραμονή της σαλμονέλας στην φυλλική επιφάνεια καπνού. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η αναπτυξιακή πορεία της σαλμονέλας στον αποπλάστη των φύλλων του καπνού, όπου και είχε πραγματοποιηθεί η μόλυνση. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η μεταχείριση των φύλλων χωρίς χαρπίνη, με πράσινο χρώμα η μεταχείριση με 10 µg/ml χαρπίνης και με κόκκινο χρώμα η μεταχείριση με 10 µg/ml χαρπίνης όπου προστέθηκε ξανά 10 µg/ml χαρπίνης την τέταρτη ημέρα από τη μόλυνση με τη σαλμονέλα. Πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος με το πρόγραμμα SPSSstatistics 7.0 (ver. 18).

## Βιβλιογραφία

1. Abdou I. A., Abou – Zeid A. A., El Sherbeeney R. M., Abou – El – Gheat H. Z. (1972). Antimicrobial activities of *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Raphanus sativus*, *Capsicum Frutescens*, *Eruca sativa* and *Allium kurrat* on bacteria. *Qual. Plant. Mater. Veg.*, 12(1), 29-35
2. Adarsh P. V., Geetanjali R., Tarunpreet S. T., Saroj A. (2009). Bio-protective effects of glucosinolates – A review. *Food Science and Technology*, 42, 1561-1572
3. Berger C. N., Sodha, V. S. Shaw R. K., Griffin P. M., Pink D., Hand P., Frankel G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2385-2397
4. Bremer, P. J., I. Monk, and R. Butler. 2002. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/Flavobacterium spp. biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. *Lett. Appl. Microbiol.* 35:321-325.
5. Chaco, N., Saldan, Z., Freer, E., Xicohtencatl-cortes, J., Sa, E., 2009. Interaction of *Escherichia coli* O157 : H7 with Leafy Green Produce. *J. Food Prot.* 72, 1531–1537
6. Chorianopoulos, N. G., E. D. Giaouris, P. N. Skandamis, S. A. Haroutounian, and G.-J. E. Nychas. 2008. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *J. Appl. Microbiol.* 104:1586-1596
7. Deering J. A., Mauer J. L., Pruitt E. R. (2012). Internalization of *E.coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. In plants:A review. *Food Research International*, 45, 567-575
8. ECDC (European Center of Disease Control), 2008, online. Scientific Report of EFSA: The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1496.htm> EFSA, (2013). Food of plant origin: production methods and microbiological hazards linked to food-borne disease. Reference: CFT/EFSA/BIOHAZ/2012/01 Lot 1 (Food of plant origin with high water content such as fruits, vegetables, juices and herbs). Supporting Publications 2013:EN-402
9. Franz, E., Visser, A. a, Van Diepeningen, A.D., Klerks, M.M., Termorshuizen, A.J., van Bruggen, A.H.C., 2007. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Food Microbiol.* 24, 106–12. doi:10.1016/j.fm.2006.03.002
10. Fatemi, P., and J. F. Frank. 1999. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *J. Food Prot.* 62:761-765.

11. Golberg, D., Kroupitski, Y., Belausov, E., Pinto, R., Sela, S., 2011. Salmonella Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 250–7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.031
12. Gulfranz M., Sadiq A., Tariq A., Tariq H., Imran M., Qureshi R., Zeenat A. (2011). Phytochemical Analysis and Antibacterial activity of *Eruca sativa* seed. *Pakistan Journal of Botany*, 43(2), 1351–1359
13. Guo, X., Chen, J., Brackett, R.E., Beuchat, L.R., 2002. Survival of Salmonella on Tomatoes Stored at High Relative Humidity, in Soil, and on Tomatoes in Contact with Soil 65, 274–279
14. Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., Garrett, E.H., Busta, F.F. (2003). Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 2, 78–141 Isara AR, Isah EC, Lofor PVO and Ojide CK, 2010. Food contamination in fast food restaurants in Benin City, Edo State, Nigeria: Implications for food hygiene and safety. *Public health*, 124, 467-471
15. Ibarra-Sanchez, L.S., Alvarado-Casillas, S., Rodriguez-Garcia, M.O., Martinez-Gonzales, N.E., Castillo, A., 2004. Internalization of Bacterial Pathogens in Tomatoes and Their Control by Selected Chemicals. *J. Food Prot.* 67, 1353–1358
16. Kroupitski, Y., Pinto, R., Brandl, M.T., Belausov, E., Sela, S., 2009. Interactions of Salmonella enterica with lettuce leaves. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1876–85. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04152.x
17. Norwood, D. E., and A. Gilmour. 2000. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *J. Appl. Microbiol.* 88:512-520.
18. Olaimat A., Holley R. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiology*, 32, 1-19 Pui CF, Wong WC, Chai LC, Nillian E, Ghazali FM, Cheah YK, Nakaguchi Y, Nishibuchi M and Radu S, 2011. Simultaneous detection of Salmonella spp, Salmonella Typhi and Salmonella Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. *Food Control*, 22, 337-342
19. Rani I., Akhund S., Suhail M.m Abro H. (2010). Antimicrobial potential of seed extract of *Eruca sativa*. *Pakistan Journal of Botany*, 42(4), 2949-2953
20. Sagoo SK, Little CL and Mitchell RT, 2003a. Microbiological quality of open ready-to-eat salad vegetables: Effectiveness of food hygiene training of management. *Journal of Food Protection*, 66, 1581-1586.
21. Sagoo SK, Little CL, Ward L, Gillespie IA and Mitchell RT, 2003b. Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. *Journal of Food Protection*, 66, 403-409. Tiedink H. G. M., Malingre C. E., van Broekhoven L. W., Jongen W. M., Lewis J., Fenwick G. R. (1991). Role of glucosinolates in the formation of N-nitroso compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 922-926

22. Schikora, A., Virlogeux-Payant, I., Bueso, E., Garcia, A. V, Nilau, T., Charrier, A., Pelletier, S., Menanteau, P., Baccharini, M., Velge, P., Hirt, H., 2011. Conservation of Salmonella infection mechanisms in plants and animals. PLoS One 6, e24112. doi:10.1371/journal.pone.0024112
23. Wetzel K, Lee J, Lee CS and Binkley M, 2010. Comparison of microbial diversity of edible flowers and basil grown with organic versus conventional methods. Canadian Journal of Microbiology, 56, 943-951