



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ

ΥΓΙΕΙΝΗ: ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ

ΥΓΕΙΑ»

ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

«ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΤΥΡΙΟΥ ΑΝΕΒΑΤΟ»



ΑΝΤΩΝΙΟΥ Γ. ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2018



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ

ΥΓΙΕΙΝΗ: ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ

ΥΓΕΙΑ»

ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

«ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΤΥΡΙΟΥ ΑΝΕΒΑΤΟ»



ΑΝΤΩΝΙΟΥ Γ. ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Γκόβαρης Αλέξανδρος: Καθηγητής, Υγιεινή Τροφίμων Ζωική Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γκόβαρης Αλέξανδρος: Καθηγητής, Υγιεινή Τροφίμων Ζωική Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Πεξará Ανδρέα: Επίκουρη καθηγήτρια, Υγιεινή Τροφίμων Ζωική Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Σολωμάκος Νικόλαος: Επίκουρος καθηγητής, Υγιεινή Τροφίμων Ζωική Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη της μικροβιολογικής κατάστασης τυριών τύπου «ανεβατό» απευθείας από παραγωγούς, αλλά και από σημεία λιανικής πώλησης στην Περιφέρεια Θεσσαλίας. Για το σκοπό αυτό, λήφθηκαν 40 δείγματα τυριού, εκ των οποίων τα 20 δείγματα προέρχονταν από παραγωγούς και τα υπόλοιπα από τα ράφια των σούπερ-μάρκετ. Επίσης, η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε τους μήνες Απρίλιο, Μάιο, Οκτώβριο και Νοέμβριο, που οι υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες του περιβάλλοντος, σε συνδυασμό με τους λανθασμένους χειρισμούς - κακή συντήρηση πιθανόν να επηρεάσουν την μικροβιολογική κατάσταση του τυριού.

Υλικά & Μέθοδοι

Σε χρονικό διάστημα 4 μηνών (Απρίλιος, Μάιος, Οκτώβριος και Νοέμβριος 2017), συλλέχθηκαν συνολικά 40 δείγματα τυριού (20 δείγματα από παραγωγούς της Θεσσαλίας και τα υπόλοιπα 20 από σημεία λιανικής πώλησης). Το κάθε δείγμα (βάρους περίπου 140gr) τοποθετούνταν από τους παραγωγούς και τους πωλητές σε πλαστικά δοχεία (αποστειρωμένους ουροσυλλέκτες) που προορίζονταν για το σκοπό αυτό και μεταφέρονταν άμεσα μετά τη δειγματοληψία σε ισοθερμικό δοχείο υπό συνθήκες ψύξης (4°C) στο Εργαστήριο Υγιεινής & Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Εκεί πραγματοποιούνταν η μικροβιολογική τους ανάλυση, για να προσδιοριστούν οι πληθυσμοί της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX), των Enterobacteriaceae, των ζυμών και μυκήτων και τέλος, ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* spp. Πραγματοποιήθηκε επίσης και η μέτρηση της τιμής του pH καθώς και της ενεργότητας του νερού a_w .

Αποτελέσματα μικροβιολογικών εξετάσεων

Η μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων έδειξε ότι οι πληθυσμοί για την O.M.X. ήταν $7,18 \pm 0,46 \log \text{ cfu/g}$. Επίσης, από τα 40 δείγματα που εξετάστηκαν, τα 35 (87,5%) είχαν πληθυσμούς εντεροβακτηριοειδών <102 και τα 5 (12,5%) $>102 \text{ cfu/g}$, ενώ και τα 5 δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί εντεροβακτηριοειδών $>102 \text{ cfu/g}$ ήταν από σημεία λιανικής πώλησης. Η εξέταση των δειγμάτων ανεβατού για ζύμες και μύκητες έδειξε ότι οι πληθυσμοί τους κυμαίνονταν από 3,1 έως $5,5 \log \text{ cfu/g}$ και ο μέσος όρος ήταν $4,11 \pm 0,65 \log \text{ cfu/g}$. Από τα 40 δείγματα ανεβατού, στα 24 ταυτοποιήθηκε *Candida lambica* (60%), σε 13 απομονώθηκε *Geotrichum silvicola* (32,5%) και τέλος, σε 9 δείγματα ταυτοποιήθηκε *Yarrowia lipolytica* (22,5%). Σε κανένα από τα 40 δείγματα τυριών που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί των παθογόνων *Salmonella* spp, *L. monocytogenes* και *S. aureus*.

Σημαντικοί όροι - λέξεις κλειδιά: Ανεβατό, Ανεβατό ΠΟΠ, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, Enterobacteriaceae, Ζύμες, Μύκητες.

Microbiological status of Anevato, a traditional PDO Greek cheese

ABSTRACT

Aim

Aim of this work was to study the microbiological status of the cheese “Anevato”, a traditional PDO Greek cheese, from producers and products sold in supermarkets in the Region of Thessaly, Greece.

Materials and Methods

40 samples of Anevato cheese (20 samples from producers and 20 samples sold in supermarkets), **were collected during a four (4) months period (April, May, October and November 2017)**, when high (or low) environmental temperatures are traditionally recorded. The samples were transported under refrigeration to the laboratory and subsequently subjected to bacteriological analyses. All samples were analysed for Enterobacteriaceae, Total Viable Counts (TVC), yeasts and molds, Staphylococcus aureus, Salmonella spp. and Listeria monocytogenes.

Results

Results showed that high mean log counts per gram of cheese for TVC (7.18 ± 0.46 log cfu/g) and yeasts and molds (4.11 ± 0.65 log cfu/g) were found, while Enterobacteriaceae were detected in only 5 (12.5%) of the 40 samples analyzed. *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. were not detected in any of the examined samples.

Important terms - Keywords: Anevato, Anevato PDO, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Salmonella spp, Enterobacteriaceae, Yeasts, Fungi.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	I
Εισαγωγή	II
Σκοπός διπλωματικής εργασίας	III

1^ο ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1^ο

1. Ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα	1
1.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα	2
i) Ενδογενείς παράγοντες	
ii) Εξωγενείς παράγοντες	

1.2.Μικροοργανισμοί - δείκτες της υγιεινής και της ασφάλειας των τροφίμων	12
i) Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)	
ii) Εντεροβακτήρια	
iii) Κολοβακτηρίδια (E.coli)	
iv) Εντερόκοκκοι	

Κεφάλαιο 2^ο

2. Τροφιμογενή Παθογόνα Βακτήρια	15
2.1.Salmonella spp.	15
2.2.Staphylococcus spp.	19
2.3.Listeria spp.	25
2.4.Ζύμες	29
2.5.Μύκητες	30

Κεφάλαιο 3^ο

3. Τυρί: Ορισμός, Τρόπος παρασκευής και παραγωγή - Ιστορική αναδρομή	30
3.1.Ανεβατό Π.Ο.Π.	32
3.2.Τεχνολογία παρασκευής του τυριού	32
i) Πρώτες ύλες	
ii) Πυτιά	
iii) Οξυγαλακτική καλλιέργεια	
iv) Αλάτι	
3.3.Νομοθετικές Ρυθμίσεις	35
3.4.Μικροβιολογική κατάσταση του τυριού - Σχετικές έρευνες	38

2^ο ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4^ο

4. Υλικά και μέθοδοι	42
4.1. Συλλογή δειγμάτων	42
4.2. Μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων	42
i. Καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 4833	
ii. Καταμέτρηση των Εντεροβακτηριοειδών σύμφωνα με τη μέθοδο BS 5763 Part:10 1993, ISO 7402:1993	
iii. Καταμέτρηση του Staphylococcus aureus, σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 6889, 1:1999/A1:2004	
iv. Ανίχνευση και καταμέτρηση της Listeria monocytogenes, σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 11290-2	
v. Ανίχνευση της Salmonella spp, σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 6579:2002	
vi. Ανίχνευση των ζυμών και των μυκήτων, σύμφωνα με τη μέθοδο ISO	

21527-1:2008

4.3. Ταυτοποίηση μικροοργανισμών	44
4.4 Μέτρηση της τιμής του pH	46

Κεφάλαιο 5^ο

5. Αποτελέσματα - Συζήτηση	47
5.1.Φυσικοχημικός Έλεγχος	47
5.2.Μικροβιολογική Εξέταση	47
5.3.Συμπεράσματα - Προτάσεις	51
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53

Ευχαριστίες

Πριν ξεκινήσω την παρουσίαση της έρευνας με την οποία ασχολήθηκα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους για την αμέριστη βοήθειά που μου προσέφεραν όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Αλέξανδρο Γκόβαρη Καθηγητή της Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης στη Σχολή Επιστημών Υγείας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα.

Θερμές ευχαριστίες στον κο Χατζηχριστοδούλου Χρήστο, Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την παροχή των υποδομών για την εκτέλεση του πειραματικού μέρους.

Στην κα Μαρία Κυρίτση καθώς και σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συνεργασία, την καθοδήγηση και την υποστήριξή τους κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους.

Θερμές ευχαριστίες σε όλα τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής: στον κο Γκόβαρη Αλέξανδρο, Καθηγητή Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΠΘ, στην κα Πεξάρá Ανδρεάνα, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και στον κο Σολωμάκο Νικόλαο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη βοήθειά τους και τις γνώσεις που μου παρείχαν, καθώς στάθηκαν σημαντικοί αρωγοί στην προσπάθειά μου και με υποστήριξαν σε κάθε φάση της πορείας μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τους γονείς μου για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου μελέτης καθώς και τον αδερφό μου Νίκο, για τη βοήθειά του στην εύρεση ορισμένων επιστημονικών πηγών.

Τέλος, να ευχαριστήσω και γενικά όλους τους αναγνώστες της συγκεκριμένης μελέτης, η οποία και ελπίζω να αποβεί χρήσιμη για την εξέλιξη και βελτίωση του τομέα της Υγιεινής και Ασφάλειας των Τροφίμων.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το τυρί είναι μεγάλης θρεπτικής αξίας τροφή για τον άνθρωπο, του οποίου η πρώτη του δημιουργία χρονολογείται περίπου 8.000 χρόνια πριν, στην εύφορη κοιλάδα μεταξύ του Τίγρη και του Ευφράτη (Ανυφαντάκης, 2004). Από εκείνη την περίοδο μέχρι σήμερα, έχουν παρασκευαστεί πολλά είδη τυριών και με διαφορετικούς τρόπους. Το τυρί εξακολουθεί να αποτελεί ένα πολύ θρεπτικό προϊόν διατροφής το οποίο εφοδιάζει τον άνθρωπο με ενέργεια και με πολλά απαραίτητα δομικά συστατικά.

Στη συγκεκριμένη μελέτη θα εξετάσουμε τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά ενός τυριού, του τυριού «Ανεβατό». Το «Ανεβατό» είναι μαλακό λευκό τυρί, κοκκώδους υφής

(Ζερφυρίδης, 2001), με υπόξινη ευχάριστη γεύση και άρωμα (ΚΤΠ, 2009), που παράγεται παραδοσιακά από γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγματα αυτών. Έχει μέγιστη υγρασία 60% κατά βάρος και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 45% κατά βάρος. Το παραδοσιακό αυτό τυρί έχει πολύ ευχάριστη γεύση, ειδικά εάν παρασκευαστεί από γίδινο γάλα (Catherine W. Donnelly, 2014).

Παραδοσιακά το Ανεβατό παράγονταν από Έλληνες ποιμένες με μεγάλα κοπάδια αιγοπροβάτων στις περιοχές της Δυτικής Μακεδονίας, οι οποίοι λάμβαναν το γάλα από τα ζώα το πρωί, πριν εκείνα ακόμα σιτιστούν, και προσθέτανε σε αυτό πυτιά. Κατά τη διάρκεια της ημέρας, το γάλα έπηξε και το πήγμα ανέβαινε προς την επιφάνεια (έτσι προέκυψε και η ονομασία του), και το απόγευμα, που επέστρεφαν με τα κοπάδια τους, ήταν έτοιμο για στράγγιση (Hatzikamari et al., 1999).

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, η ονομασία «ΑΝΕΒΑΤΟ» (ΑΝΕΒΑΤΟ) αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π) για το τυρί που παράγεται παραδοσιακά στο Νομό Γρεβενών και στην επαρχία Βοΐου Νομού Κοζάνης, από γάλα πρόβειο, γίδινο ή μίγματα αυτών. Στο ΚΤΠ ορίζεται επίσης και η τεχνολογία παρασκευής και περιγράφονται τα χαρακτηριστικά του προϊόντος (Κ.Τ.Π, Απόφ. 313060/18.1.94, ΦΕΚ 24/Β/18.1.94).

Στα σύγχρονα τυροκομεία, για την παραγωγή του τυριού Ανεβατό, το γάλα επωάζεται στους 18-22°C μέχρι η οξύτητα του φθάσει στους 35°D ή pH=6,2. Στη συνέχεια, μεταφέρεται σε ψυκτικούς χώρους θερμοκρασίας 2-4°C, όπου παραμένει για 24 ώρες. Ακολουθεί θέρμανση στους 12-14°C και προσθήκη λίγης πυτιάς ώστε να γίνει η πήξη σε 12 ώρες. Ακολουθεί διαίρεση του τυροπήγματος (2x2 cm), παραμονή στον τυρολέβητα για 12 ώρες, στράγγιση, επιφανειακή αλάτιση και ωρίμανση του τυριού, για 2 τουλάχιστον μήνες (Hatzikamari et al., 1999; Xanthopoulos et al., 2000).

Μέχρι σήμερα το τυρί Ανεβατό πωλείται αποκλειστικά σε τοπικά μαγαζιά με γαλακτοκομικά προϊόντα. Ωστόσο, προσπάθειες γίνονται για την αύξηση της παραγωγής του έτσι ώστε να καλυφθούν οι ανάγκες του Έλληνα καταναλωτή αλλά και για την προώθηση του προϊόντος στην ξένη αγορά (Hatzikamari et al., 1999).

Οι έρευνες σχετικά με το τυρί Ανεβατό είναι πολύ λίγες και αναφέρονται στα μικροβιολογικά (Hatzikamari et al., 1999, Xanthopoulos et al., 2000, Ζώτου Α, 2009) οργανοληπτικά (Ζώτου Α, 2009), ρεολογικά (Ζάνδε Ν, Μητρογιάννη Κ, 2013) και χημικά του χαρακτηριστικά (Xanthopoulos et al., 2000). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την μικροβιολογική ποιότητα του τυριού “Ανεβατό” που παράγεται στη χώρα μας. Καθώς είναι ένα τυρί Π.Ο.Π. που γίνεται προσπάθεια για την αύξηση της παραγωγής του στην Ελληνική αγορά αλλά και για την προώθηση του σε ξένες αγορές, έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον να μελετηθεί η μικροβιολογική ποιότητα του τυριού τόσο αμέσως μετά την παραγωγή του όσο και κατά τη διακίνηση του στη λιανική πώληση.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της μελέτης είναι ο μικροβιολογικός έλεγχος του τυριού Ανεβατό. Να διευκρινιστεί επίσης ότι ο σκοπός της εργασίας ήταν ο έλεγχος της μικροβιολογικής ποιότητας του τυριού, τόσο αμέσως μετά την παραγωγή του, όσο και κατά τη διακίνηση του στη λιανική πώληση.

Τα δείγματα εξετάστηκαν λαμβάνοντας υπόψη τα κριτήρια υγιεινής και ασφάλειας που ορίζονται στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, όπως τροποποιήθηκε και ισχύει.

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε τους μήνες Απρίλιο, Μάιο, Οκτώβριο και Νοέμβριο, που οι υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες του περιβάλλοντος πιθανόν να επηρεάσουν την μικροβιολογική κατάσταση του τυριού.

Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε και η μέτρηση της τιμής του pH.

1^ο ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

1. Ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα

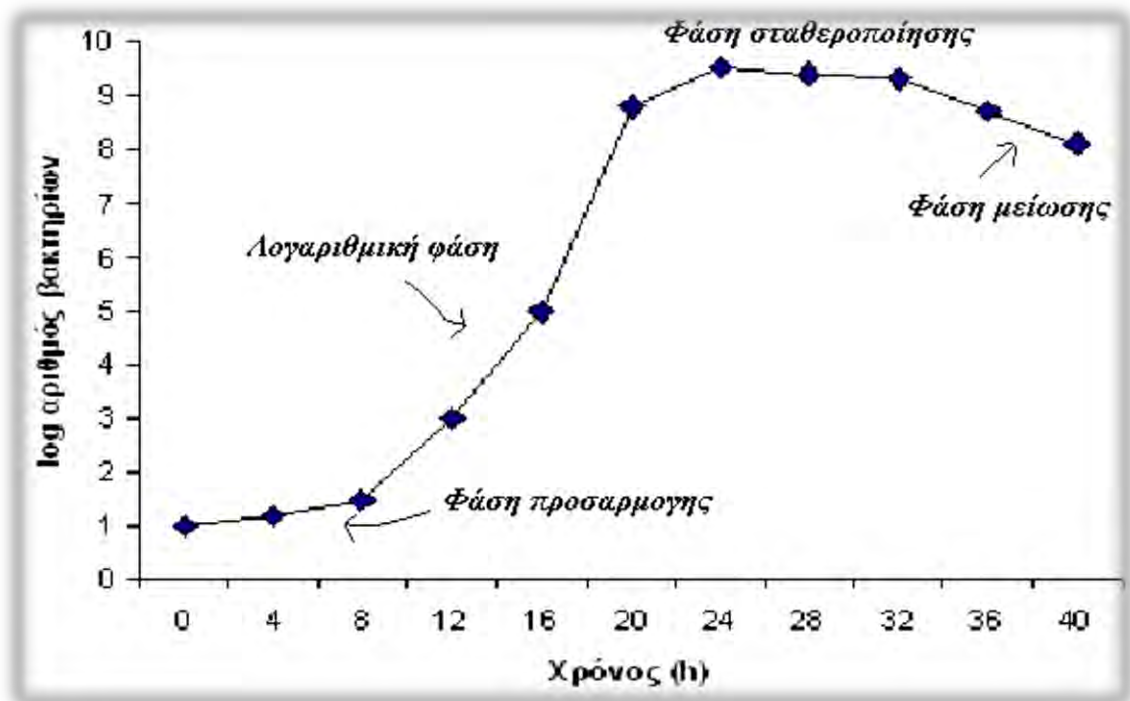
Με τον όρο ανάπτυξη των μικροοργανισμών αναφερόμαστε στην αύξηση του αριθμού των κυττάρων ενός μικροοργανισμού σε ένα πληθυσμό, η οποία γίνεται μέσω της κυτταρικής διαίρεσης.

Ο πολλαπλασιασμός των μικροβίων ακολουθεί μια γεωμετρική πρόοδο κατά την οποία η αλλαγή στο μικροβιακό πληθυσμό σε συνάρτηση με το χρόνο είναι ευθέως ανάλογη με τον αρχικό πληθυσμό των μικροβίων και εκφράζεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$dN/dt = k \cdot N_0$$

όπου, dN η αλλαγή στο μικροβιακό πληθυσμό, dt ο χρόνος που χρειάστηκε για την κυτταρική διαίρεση και k η σταθερά ανάπτυξης (Σαββαΐδης, 2014).

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε ένα τρόφιμο μπορεί να παρουσιαστεί γραφικά στην καμπύλη ανάπτυξης (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Καμπύλη ανάπτυξης των μικροοργανισμών στα τρόφιμα.

Η καμπύλη ανάπτυξης περιλαμβάνει έναν πλήρη κύκλο ανάπτυξης και χωρίζεται σε πέντε φάσεις:

- την φάση προσαρμογής (λανθάνουσα φάση ή φάση καθυστέρησης, lag phase),
- την φάση εκθετικής ανάπτυξης (εκθετική φάση, exponential phase),
- την φάση σταθεροποίησης (stationary phase), και
- την φάση μείωσης ή θανάτου (death phase).

Στη λανθάνουσα φάση ο μικροβιακός πληθυσμός που βρίσκεται σε ένα τρόφιμο προσαρμόζεται στο καινούριο περιβάλλον. Στη φάση αυτή δηλαδή, δεν υπάρχει μεταβολή του αριθμού των κυττάρων, ενώ η διάρκειά της εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν στο νέο περιβάλλον. Εάν οι συνθήκες είναι βέλτιστες, τότε η περίοδος προσαρμογής μπορεί να είναι σύντομη. Σε αντίθετη περίπτωση αυτή η φάση μπορεί να παραταθεί, καθώς ο πληθυσμός χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να προσαρμοστεί (Pirt, 1975).

Η φάση που ακολουθεί της λανθάνουσας είναι η εκθετική φάση. Είναι μία περίοδος λογαριθμικής αύξησης του μεγέθους του πληθυσμού, όπως φαίνεται και από τη θετική κλίση της καμπύλης στην **Εικόνα 1**. Στο αρχικό στάδιο της φάσης παρατηρείται μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης, ενώ προς το τέλος του σταδίου αυτού ο ρυθμός ανάπτυξης αρχίζει να ελαττώνεται, καθώς μειώνονται σταδιακά τα θρεπτικά συστατικά και αρχίζουν να συσσωρεύονται προϊόντα του μεταβολισμού των μικροβίων, τα οποία που είναι τοξικά για τα μικρόβια (Σαββαΐδης, 2014).

Στην φάση της στασιμότητας που ακολουθεί ο ρυθμός ανάπτυξης μηδενίζεται και καθώς ο αριθμός των μικροοργανισμών παραμένει σταθερός, ο λογάριθμος του πληθυσμού αποκτά σταθερή τιμή. Η διάρκεια αυτής της φάσης ποικίλλει. Στο τέλος, η συσσώρευση τοξινών στο περιβάλλον, σε συνδυασμό με την έλλειψη θρεπτικών συστατικών, οδηγεί στο σταδιακό θάνατο των κυττάρων και τη μετάβαση στην επόμενη φάση.

Στη φάση μείωσης ή θανάτου οι μικροοργανισμοί πεθαίνουν και ο ρυθμός θανάτου είναι μεγαλύτερος από την ικανότητα του υποστρώματος να υποστηρίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με αποτέλεσμα ο πληθυσμός να μειώνεται και αντίστοιχα η καμπύλη να αποκτά πλέον αρνητική κλίση.

1.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα

Τα τρόφιμα αποτελούν σύνθετα οικοσυστήματα που αποτελούνται από τα συστατικά που τα αποτελούν και τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν σε αυτά ή μπορούν να τα επιμολύνουν. Πολλοί παράγοντες, ενδογενείς ή εξωγενείς, μπορούν να ευνοήσουν, να εμποδίσουν ή να περιορίσουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε αυτά (Montville and Matthews, 2010). Οι ενδογενείς σχετίζονται με το είδος και τη σύνθεση των τροφίμων (pH, νερό, οξυγόνο και οξειδοαναγωγικό δυναμικό, θρεπτικά συστατικά, αντιμικροβιακοί παράγοντες, ανταγωνιστική χλωρίδα, βιολογικές δομές) και οι εξωγενείς σχετίζονται με την

επεξεργασία, το χειρισμό και τη συντήρηση των τροφίμων (θερμοκρασία συντήρησης, συνθήκες συντήρησης (σχετική υγρασία/υγρασία), συσκευασία / είδος ατμόσφαιρας, παρουσία και δράση άλλων μικροοργανισμών) (Morris, 2000).

Για κάθε παράγοντα που επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων οποιουδήποτε μικροβίου, έχουν προσδιορισθεί τρεις τιμές:

- ❖ Η ελάχιστη (minimum) και η μέγιστη (maximum) τιμή. Είναι θεωρητικά η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή του παράγοντα στην οποία ο μικροοργανισμός μπορεί να αναπτύσσεται και
- ❖ Η βέλτιστη (optimum) που περιγράφει την τιμή ή το εύρος των τιμών όπου παρατηρείται η μέγιστη ανάπτυξη.

Να τονιστεί επίσης ότι οι παράγοντες που επηρεάζουν, ή καλύτερα προσδιορίζουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των μικροβιακών κυττάρων, βρίσκονται σε συνεχή μεταξύ τους αλληλεξάρτηση και αλληλεπίδραση. Έτσι, το τελικό αποτέλεσμα δεν εξαρτάται μόνο από την απόλυτη τιμή καθενός από τους υπεύθυνους για την ανάπτυξη των μικροβίων παράγοντες, αλλά και από τον βαθμό στον οποίο ο παράγοντας αυτός επηρεάζει ή επηρεάζεται από τους υπόλοιπους.

i) Ενδογενείς παράγοντες

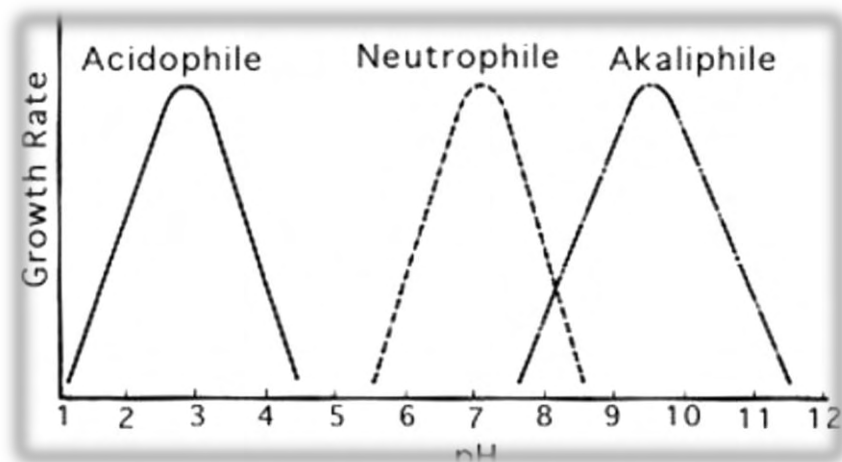
pH

Το pH εκφράζεται ως ο αρνητικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου:

$$\text{pH} = (-\log \text{ of the } [\text{H}^+])$$

Οι τιμές του κυμαίνονται από το 0 έως το 14, με 7 το ουδέτερο. Το pH δείχνει πόσο όξινα είναι τα τρόφιμα. Τρόφιμα με $\text{pH} \leq 4,6$ θεωρούνται υψηλής οξύτητας, όπως πχ είναι οι χυμοί φρούτων, τα αναψυκτικά, το κρασί κ.λπ., ενώ τρόφιμα με $\text{pH} > 4,6$ θεωρούνται χαμηλής οξύτητας, όπως για παράδειγμα το κρέας (Jay, 2000).

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται καλύτερα σε τιμές pH 6,5 έως 7,5, ενώ λίγοι μικροοργανισμοί μπορούν και αναπτύσσονται σε τιμές pH χαμηλότερες από 4. Αυτοί ονομάζονται οξεόφιλοι μικροοργανισμοί και αναπτύσσονται σε pH κάτω από 4 ενώ ορισμένα βακτήρια παραμένουν ενεργά ακόμη και σε $\text{pH}=1$. Αντίθετα, οι αλκαλόφιλοι μικροοργανισμοί προτιμούν τιμές pH μεταξύ 9-10 και οι περισσότεροι δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε ουδέτερο ή χαμηλότερο pH (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Τιμές pH που αναπτύσσονται οι διάφορες κατηγορίες μικροοργανισμών.

Το εύρος των τιμών που παρατηρείται η βέλτιστη ανάπτυξη για κάθε μικροοργανισμό είναι ιδιαίτερα στενό, και μικρές αλλαγές στο pH επηρεάζουν σημαντικά τον ρυθμό ανάπτυξης. Τόσο το χαμηλό pH, όσο και το υψηλό pH, έχουν μεγάλη σημασία και μπορεί να οδηγήσουν σε αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, η ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* αναστέλλεται σε τρόφιμα με υψηλές τιμές pH.

Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στην επίδραση αυξημένης οξύτητας διαφέρει ανάλογα με το μικροοργανισμό. Ορισμένοι μικροοργανισμοί διαθέτουν ορισμένους μηχανισμούς διατήρησης του ενδοκυτταρικού pH τους για την επιβίωσή τους σε όξινα περιβάλλοντα. Σε γενικές γραμμές οι ζύμες και οι μύκητες είναι περισσότερο ανθεκτικά σε όξινο περιβάλλον από τα βακτήρια. Μπορούν να αναπτύσσονται μέχρι και σε pH 2-3, ενώ τα βακτήρια εντός ενός πιο περιορισμένου εύρους τιμών. Τα Gram (+) βακτήρια αναπτύσσονται σε pH εύρους από 4 έως 8,5, ενώ τα Gram (-) βακτήρια μεταξύ 4,5 – 9,0 (Doyle et al., 1997; Μπαλατσούρας, 2006).

Επίσης η τιμή του pH του τροφίμου επηρεάζει την ευαισθησία των βακτηρίων στην επίδραση της θερμικής επεξεργασίας, αλλά και την αποτελεσματικότητα ορισμένων συντηρητικών ουσιών (Mossel et al., 1995). Στη συντήρηση των τροφίμων το pH συνήθως δρα σε συνδυασμό και με άλλους παράγοντες των τροφίμων για την επιβράδυνση ή αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Νερό (Ενεργότητα ύδατος, a_w)

Η αποξήρανση των τροφίμων αποτελεί μια από τις παλαιότερες μεθόδους συντήρησης των τροφίμων. Στηρίζεται στο γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να αναπτυχθούν στο καθαρό νερό ή απουσία νερού. Το νερό είναι το συστατικό του κυττάρου με τη μεγαλύτερη αναλογία, διευκολύνει την είσοδο διαλυτών θρεπτικών συστατικών και την αποβολή προϊόντων του μεταβολισμού των θρεπτικών ουσιών.

Το νερό που υπάρχει στα διάφορα τρόφιμα διακρίνεται σε ελεύθερο και χημικά συνδεδεμένο. Το ελεύθερο νερό είναι διαθέσιμο για τις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο τρόφιμο καθώς και τον εφοδιασμό των βακτηρίων και των ενζύμων, ενώ το χημικά συνδεδεμένο νερό διακρίνεται σε δομικό (1%), που συμμετέχει στη δομή των πρωτεϊνών και σε νερό ενυδάτωσης (4%) που βρίσκεται γύρω από τις πρωτεΐνες (Πεξαρά και συν., 2016).

Η ποσότητα του νερού των τροφίμων που είναι διαθέσιμη για την εκδήλωση των βιοχημικών και κυρίως των βακτηριακών δράσεων, εκφράζεται από την ενεργότητα του νερού ή το συντελεστή ενεργού ύδατος (ΣΕΥ ή a_w) και αφορά στη ποσότητα του νερού των τροφίμων που είναι διαθέσιμη για τις βιοχημικές και βακτηριακές δράσεις, δηλαδή το ελεύθερο μέρος του νερού που είναι διαθέσιμο για τους μικροοργανισμούς (Corlett et al., 1980; Μπαλατσούρας, 2006). Ως ενεργότητα νερού ορίζεται η σχέση της τάσης των υδρατμών του τροφίμου δια της τάσης των υδρατμών του καθαρού νερού στην ίδια θερμοκρασία και λαμβάνει τιμές από 0 έως 1 (Jay, 2000). Το a_w του καθαρού νερού είναι 1,0. Στο καθαρό νερό δεν αναπτύσσονται τα μικρόβια, λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Το a_w ενός τροφίμου απόλυτα αφυδατωμένου είναι 0. Το a_w των περισσότερων νωπών τροφίμων είναι περίπου 0,99 (Jay, 2000).

Στο καθαρό νερό, τα μόρια είναι χαλαρά διατεταγμένα με αποτέλεσμα να είναι εύκολα διαθέσιμα για τους μικροοργανισμούς. Όταν προστίθενται ουσίες όπως άλας και σάκχαρα, τα μόρια του ύδατος προσανατολίζονται προς την προστιθέμενη ουσία. Με τον τρόπο αυτό, το νερό δεσμεύεται και συνεπώς καθίσταται λιγότερο διαθέσιμο για τους μικροοργανισμούς (Gorris, 2005).

Τα περισσότερα βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμές a_w χαμηλότερες από 0,90. Τα Gram αρνητικά βακτήρια έχουν γενικά υψηλότερες απαιτήσεις από τα Gram θετικά βακτήρια (Mossel και συν. 1995). Οι ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν μέχρι a_w 0,87 και οι μύκητες μέχρι και a_w 0,80. Ωστόσο ορισμένα βακτήρια που καλούνται «αλόφιλα» μπορούν να αναπτυχθούν σε κορεσμένο διάλυμα NaCl (a_w περίπου 0,75) και ορισμένα είδη ζυμών και μυκήτων αναπτύσσονται, ωστόσο εξαιρετικά αργά, σε διαλύματα σακχάρων ή σε αποξηραμένα τρόφιμα σε τιμές μέχρι 0,65-0,60 (Πεξαρά και συν., 2016).

Από τα τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε χαμηλές τιμές a_w παρουσιάζει ο *Staphylococcus aureus*, που μπορεί να αναπτυχθεί σε τιμές a_w μέχρι και 0,86, ενώ το *Clostridium botulinum* αναπτύσσεται σε τιμές μέχρι 0,94 (Πεξαρά και συν., 2016 ; Mossel et al., 1995).

Πυκνά διαλύματα αλάτων ή σακχάρων ασκούν ωσμωτική πίεση στα μικροβιακά κύτταρα με αποτέλεσμα την έξοδο του νερού και τη λύση του κυττάρου. Το φαινόμενο της όσμωσης εφαρμόζεται στη συντήρηση των τροφίμων. Ιδιαίτερη σημασία στην ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στη μείωση του a_w έχει ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται (Gorris 2005; Corlett, 1980). Αναφέρεται ότι για την ανάπτυξη του *Clostridium perfringens* οι ελάχιστες τιμές a_w ήταν 0,97 και 0,95 όταν χρησιμοποιήθηκαν σουκρόζη και NaCl αντίστοιχα (Kang et al., 1969).

Εκτός από την προσθήκη αλάτων ή σακχάρων και την αφυδάτωση, μείωση της τιμής του a_w επιτυγχάνεται επίσης με την κατάψυξη, καθώς το νερό στη μορφή του πάγου, λόγω κρυσταλλώσεως δεν είναι διαθέσιμο για τους μικροοργανισμούς (International Commission on Microbiological Specification for Foods–ICMSF, 1996).

Τέλος οι τιμές του a_w για την ανάπτυξη των μικροβίων επηρεάζονται και από άλλους παράγοντες. Μεταβολές του pH και της θερμοκρασίας αυξάνουν τις ελάχιστες τιμές a_w που είναι αναγκαίες για την ανάπτυξη των μικροβίων. Αυτό σημαίνει ότι η προσθήκη άλατος, που μεμονωμένα δεν μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, όταν δρα συνεργικά με άλλους παράγοντες, μειώνει το a_w , σε τιμές που αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Corlett et al., 1980).

Οξυγόνο και οξειδοαναγωγικό δυναμικό του τροφίμου

Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Eh) μπορεί γενικά να χαρακτηριστεί ως η τάση με την οποία το τρόφιμο χάνει ή λαμβάνει ηλεκτρόνια. Όταν ηλεκτρόνια μεταφέρονται από μια ουσία σε μια άλλη τότε δημιουργείται δυναμικό το οποίο μπορεί να μετρηθεί και εκφράζεται σε mV (milliVolt). Όταν μια ουσία ή ένωση χάνει ηλεκτρόνια οξειδώνεται, ενώ αντίστοιχα όταν λαμβάνει, ανάγεται. Όταν μια ουσία οξειδώνεται, αποκτά θετικό ηλεκτρικό δυναμικό, ενώ όταν ανάγεται αποκτά αρνητικό δυναμικό (Mossel et al., 1995).

Η οξείδωση είναι δυνατόν να συμβεί και παρουσία οξυγόνου. Συγκεκριμένα η παρουσία οξυγόνου ως οξειδωτικός παράγοντας εξασφαλίζει υψηλή οξειδοαναγωγική δράση στα τρόφιμα ευνοώντας την ανάπτυξη των αερόβιων μικροβίων, ενώ η παρουσία ενός αναγωγικού παράγοντα, όπως το ασκορβικό οξύ, προκαλεί πτώση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού ευνοώντας την ανάπτυξη των αναερόβιων μικροβίων (Αμβροσιάδης, 2004).

Με βάση το Eh του τροφίμου, μπορούμε να ταξινομήσουμε τους μικροοργανισμούς σε μικροαερόφιλλους, αναερόβιους ή προαιρετικά αναερόβιους. Οι αερόβιοι μικροοργανισμοί απαιτούν θετικές τιμές Eh (οξείδωση) ενώ οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί απαιτούν αρνητικές τιμές Eh (αναγωγή). Μικροαερόφιλα ονομάζονται τα βακτήρια που μπορούν να αναπτυχθούν καλύτερα σε ήπιες συνθήκες αναγωγής, όπως οι λακτοβάκιλλοι και τα καμπυλοβακτηρίδια. Τέλος, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια ονομάζονται αυτά που μπορούν να αναπτύσσονται τόσο σε αερόβιες, όσο και σε αναερόβιες συνθήκες. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται τα εντεροβακτήρια, τα *Corynebacteriaceae* κ.α. (Morris 2000).

Το Eh ενός τροφίμου συνδέεται με τη χημική σύσταση του τροφίμου (pH, συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων, ασκορβικού οξέος κλπ) και την μερική πίεση του οξυγόνου (pO_2) στην διάρκεια της συντήρησης, η οποία είναι εξαιρετικά μεταβλητή και συχνά τροποποιείται σκόπιμα (αποκλεισμός του αέρα από τα τρόφιμα κατά τη διάρκεια της κονσερβοποίησης).

Τέλος, το Eh ενός τροφίμου δεν παραμένει σταθερό, αλλά επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Ένας παράγοντας είναι η παρουσία μικροοργανισμών στο τρόφιμο. Τα αερόβια βακτήρια, κατά τον πολλαπλασιασμό τους καταναλώνουν οξυγόνο με

αποτέλεσμα την πτώση του Eh του τροφίμου. Επίσης, η παρουσία οξειδωτικών ή αναγωγικών ουσιών επηρεάζει το Eh. Τα νωπά τρόφιμα, όπως τα φρούτα και το κρέας κατά τη διάρκεια της συντήρησης του συνεχίζουν τις μεταβολικές τους δράσεις με αποτέλεσμα τη πτώση του Eh. Αντίθετα, σε θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα, όπου καταστρέφονται οι οξειδωτικές και αναγωγικές ουσίες, διαχέεται το οξυγόνο στο τρόφιμο με αποτέλεσμα την αύξηση του Eh (Jay, 2000; Morris, 2000).

Θρεπτικά συστατικά

Οι μικροοργανισμοί απαιτούν ορισμένα βασικά θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη και τη διατήρηση των βασικών μεταβολικών τους λειτουργιών. Τα τρόφιμα παρέχουν αυτά τα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των μικροβίων. Η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών καθορίζει ποια μικρόβια θα αναπτυχθούν στα τρόφιμα και κατά συνέπεια επηρεάζει τις μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που θα παρατηρηθούν στο τρόφιμο κατά την αλλοίωση του. (ICMSF, 1996).

Τα ουσιώδη θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για τους μικροοργανισμούς είναι το νερό, οι πηγές ενέργειας, οι πηγές αζώτου, οι βιταμίνες και τα ιχνοστοιχεία.

Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε ένα τρόφιμο είναι αυτοί που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα θρεπτικά συστατικά που υπάρχουν στο τρόφιμο. Για παράδειγμα, στο γάλα αναπτύσσονται μικροοργανισμοί που μπορούν να ζυμώσουν τη λακτόζη, ενώ στο κρέας, μικροοργανισμοί που διασπούν τις πρωτεΐνες (Jay, 2000). Όμως, οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν σε ένα τρόφιμο βρίσκονται σε συνεχή αλληλεπίδραση με τις υπόλοιπες παραμέτρους που σχετίζονται με τα ενδογενή χαρακτηριστικά του τροφίμου αλλά και μεταξύ τους. Δηλαδή, Έτσι μπορεί να ευνοηθεί η ανάπτυξη μικροοργανισμών που δεν είναι ικανοί να αναπτυχθούν σε ένα τρόφιμο, από θρεπτικά συστατικά που προέρχονται από την βιοχημική δραστηριότητα άλλων μικροοργανισμών που προϋπήρχαν στο τρόφιμο (Πεξαρά και συν, 2016).

Τα τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας υδατάνθρακες, αλκοόλες και αμινοξέα. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν απλά σάκχαρα των τροφίμων, όπως η γλυκόζη. Άλλοι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν πιο σύνθετα σάκχαρα, όπως το άμυλο ή το γλυκογόνο που βρίσκεται στο κρέας. Τέλος, λίγοι μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν και τα λίπη ως πηγή ενέργειας (Πεξαρά και συν, 2016).

Μεταξύ των θρεπτικών συστατικών που απαιτούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι και οι βιταμίνες. Οι απαιτήσεις σε βιταμίνες διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, αρκετοί μικροοργανισμοί δεν μπορούν να αναπτυχθούν απουσία βιταμινών, κυρίως του συμπλέγματος Β (Πεξαρά και συν, 2016).

Τα ιχνοστοιχεία που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι ο φώσφορος, το μαγνήσιο, ο σίδηρος, το μαγγάνιο, το ασβέστιο κ.α. Γενικά, οι απαιτήσεις

των μικροοργανισμών σε ιχνοστοιχεία δεν είναι σημαντικές και τα περισσότερα τρόφιμα αποτελούν πλούσιες πηγές ιχνοστοιχείων. Ωστόσο υπάρχουν και μικροοργανισμοί με ιδιαίτερες απαιτήσεις σε ιχνοστοιχεία όπως π.χ. η *Salmonella* Enteritidis. Η ανάπτυξη της *S. Enteritidis* εξαρτάται από τη διαθέσιμη συγκέντρωση του σιδήρου. Μελέτες αναφέρουν ότι αυξημένη συγκέντρωση σιδήρου σε λεύκωμα αβγού οδήγησε σε αυξημένους πληθυσμούς του παθογόνου σε σχέση με λεύκωμα αβγού που δεν περιείχε σίδηρο (Clay και Board 1991).

Ανασταλτικές ουσίες

Ορισμένα τρόφιμα περιέχουν ενδογενώς φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες. Παραδείγματα τέτοιων φυσικών ουσιών με αντιμικροβιακή δράση είναι η ευγενόλη στο γαρίφαλο, η αλίνη στο σκόρδο, η ευγενόλη και η θυμόλη στο φασκόμηλο, η καρβακρόλη και θυμόλη στη ρίγανη κ.α. (Jay 2000).

Από τους σημαντικότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες που υπάρχουν στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης είναι η λυσοζύμη, που υδρολύει το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων και η λακτοφερίνη, μια πρωτεΐνη που δεσμεύει το σίδηρο και το στερεί από τα βακτήρια (Πεξάρá και συν, 2016).

Στο λεύκωμα του αβγού περιέχονται επίσης πολλές ανασταλτικές για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ουσίες, όπως η λυσοζύμη, η αβιδίνη, η συναλβουμίνη και η ωαλβουμίνη (Board et al., 1986). Στο κρέας, τα πουλερικά και τα ψάρια υπάρχουν η λυσοζύμη, η προγεστερόνη και ορισμένα λιπαρά οξέα (Πεξάρá και συν, 2016).

Εκτός όμως από τις ουσίες που βρίσκονται ως φυσικά συστατικά σε διάφορα τρόφιμα ουσίες με ανασταλτική για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών παράγονται και κατά την επεξεργασία και συντήρηση των τροφίμων. Η αντίδραση Maillard, για παράδειγμα, που συμβαίνει κατά την θέρμανση των τροφίμων, μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό ουσιών με ανασταλτική δράση (Πεξάρá και συν, 2016). Επίσης, είναι γνωστό ότι η επεξεργασία των τροφίμων όπως η κάπνιση του κρέατος και των αλιευμάτων έχουν ως αποτέλεσμα το εμπλουτισμό των τροφίμων με ουσίες με αντιμικροβιακή δράση όπως οι φαινόλες, οι αλδεΐδες κ.α (Mossel et al., 1995).

Βιολογικές δομές

Ορισμένα τρόφιμα φυτικής και ζωικής προέλευσης, ιδιαίτερα όταν είναι νωπά, μπορεί να διαθέτουν βιολογικές δομές που αποτρέπουν την είσοδο και ανάπτυξη μικροοργανισμών. Παραδείγματα τέτοιων βιολογικών δομών αποτελούν το κέλυφος των αβγών, η φλούδα των φρούτων, το κέλυφος των φιστικιών κ.α. (Πεξάρá και συν, 2016).

Οι βιολογικές αυτές δομές δεν αποτρέπουν την επιβίωση των μικροοργανισμών στην επιφάνειά τους με αποτέλεσμα η μερική ή πλήρη καταστροφή τους σε κάποιο στάδιο της

συλλογής, μεταφοράς, επεξεργασίας ή αποθήκευσής τους να συνεπάγεται την είσοδο και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο τρόφιμο (Jay 2000).

ii) Εξωγενείς παράγοντες

Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος είναι από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροβίων στα τρόφιμα. Ο έλεγχος της θερμοκρασίας στην οποία συντηρούνται τα τρόφιμα είναι από τους κυριότερους τρόπους ελέγχου της ανάπτυξης των μικροοργανισμών στα τρόφιμα.

Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών (Jay, 2000). Για κάθε μικροοργανισμό υπάρχει μια μέγιστη και μια ελάχιστη θερμοκρασία και μία βέλτιστη θερμοκρασία, όπου παρατηρείται η μέγιστη ανάπτυξη. Ανάλογα με τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης οι μικροοργανισμοί χωρίζονται σε τρεις κύριες: θερμόφιλοι, μεσόφιλοι και ψυχρόφιλοι (Montiville et al., 2001):

- Οι *θερμόφιλοι* αναπτύσσονται σε υψηλές θερμοκρασίες (βέλτιστη ανάπτυξη μεταξύ 55-65°C). Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι σπορογόνοι μικροοργανισμοί (*Clostridium*, *Bacillus*), οι οποίοι παρουσιάζουν ιδιαίτερη σημασία για τα τρόφιμα και κυρίως στα κονσερβοποιημένα τρόφιμα (Mossel et al., 1995).
- Οι *μεσόφιλοι* αναπτύσσονται σε μια μέση θερμοκρασία (βέλτιστη ανάπτυξη μεταξύ 30-45°C). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν διάφοροι μικροοργανισμοί που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα καθώς και πολλά από τα σημαντικότερα τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια, όπως *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus* (Gorris, 2005).
- Τέλος, οι *ψυχρόφιλοι* μικροοργανισμοί, όπως τα *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Shewanella* κ.α., μπορούν και αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες ψύξης, με αποτέλεσμα να προκαλούν αλλοιώσεις σε τρόφιμα που συντηρούνται υπό ψύξη, όπως το κρέας, το γάλα και τα αλιεύματα (Μπαλατσούρας, 2006).

Πολλοί ερευνητές (Doyle, et al., 1997; Barer et al., 1999; Jay, 2000) χρησιμοποιούν επίσης και τον όρο *ψυχρότροφοι* για μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά έχουν μεγαλύτερη μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης από τα ψυχρόφιλα. Τέτοιοι μικροοργανισμοί, όπως η *L. monocytogenes*, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα τρόφιμα που συντηρούνται στην ψύξη.

Σε θερμοκρασία χαμηλότερη από την ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης επιβραδύνεται η ενζυμική λειτουργία και μειώνεται η διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται ο πολλαπλασιασμός των

μικροοργανισμών. Αντίστοιχα, σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, επέρχεται μετουσίωση των πρωτεϊνών των κυττάρων (Montiville et al., 2001).

Συνθήκες συντήρησης (Σχετική υγρασία)

Μια σημαντική παράμετρος των συνθηκών συντήρησης των τροφίμων είναι η *σχετική υγρασία* (ΣΥ) του περιβάλλοντος στο χώρο που συντηρούνται τα τρόφιμα (Πεξαρά και συν, 2016). Η σχετική υγρασία του περιβάλλοντος έχει άμεση σχέση με την ενεργότητα ύδατος a_w του τροφίμου.

Τα τρόφιμα θα πρέπει να βρίσκονται σε ισορροπία με την υγρασία που υπάρχει στο περιβάλλον τους. Γενικά τα τρόφιμα είναι σημαντικό να συντηρούνται σε σωστά ρυθμισμένες συνθήκες ΣΥ ανάλογα με το είδος του τροφίμου, αλλά και το στάδιο της συντήρησης του για την αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών ή την απώλεια των επιθυμητών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του. Έτσι, τρόφιμα με χαμηλό a_w δεν πρέπει να συντηρούνται σε περιβάλλον με υψηλή σχετική υγρασία, ενώ τρόφιμα με υψηλό a_w δεν πρέπει να συντηρούνται σε περιβάλλον με χαμηλή σχετική υγρασία (Πεξαρά και συν, 2016).

Συσκευασία

Μια από τις σημαντικότερες επιδράσεις της συσκευασίας των τροφίμων είναι ότι λειτουργεί σαν φραγμός ανάμεσα στο περιβάλλον και το τρόφιμο. Έτσι, αποτρέπει την μόλυνση των τροφίμων από μικροοργανισμούς ή από άλλους φυσικούς παράγοντες, όπως σκόνη κ.α.

Στον τομέα της τεχνολογίας τροφίμων έχει αναπτυχθεί μια πληθώρα από τεχνολογίες που αφορούν στη συσκευασία των τροφίμων με στόχο τον περιορισμό της ανάπτυξης των μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα και την αύξηση της ασφάλειάς τους (Mossel et al., 1995).

Στη συσκευασία των τροφίμων υπό κενό επιτυγχάνεται η απομάκρυνση όλου του αέρα από τη συσκευασία και το ερμητικό κλείσιμο αυτής. Η απομάκρυνση του O_2 μειώνει τις οξειδωτικές διεργασίες στο τρόφιμο, ενώ παράλληλα αποτρέπει την ανάπτυξη των αερόβιων μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα την παράταση της διάρκειας συντήρησής του. Παρ' όλα αυτά, η συσκευασία των τροφίμων υπό κενό μπορεί να δημιουργήσει ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη και την παραγωγή τοξινών από αναερόβιους μικροοργανισμούς, όπως το *C. Botulinum*, ενώ η απουσία (αερόβιας) ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας λειτουργεί ευνοϊκά για την ανάπτυξη του παθογόνου (Πεξαρά και συν, 2016).

Μια μέθοδο συντήρησης των τροφίμων με διαρκώς αυξανόμενες εφαρμογές, ιδιαίτερα όσο αφορά το κρέας και τα κρεατοσκευάσματα, είναι η τεχνολογία της συσκευασίας των τροφίμων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP), η οποία στηρίζεται στην

αντικατάσταση του αέρα με μίγμα αερίων σε διαφορετική αναλογία από τον ατμοσφαιρικό αέρα. Για το σκοπό αυτό συνήθως χρησιμοποιείται μίγμα αερίων διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και αζώτου (N₂) ή οξυγόνου και είναι επίσης δυνατό να χρησιμοποιηθούν και άλλα μη τοξικά αέρια, όπως π.χ. τα ευγενή αέρια (Πεξαρά και συν, 2016).

Παρουσία και δράση άλλων μικροοργανισμών

Στα τρόφιμα ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι η αλληλεπίδραση των διαφόρων μικροοργανισμών που υπάρχουν στο τρόφιμο. Ιδιαίτερη σημασία έχουν οι ανταγωνιστικές διεργασίες μεταξύ των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε ένα τρόφιμο και συνήθως περιλαμβάνουν τον ανταγωνισμό για τα θρεπτικά συστατικά, για τις θέσεις συνδέσεως / προσκόλλησης κ.α. Επίσης η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να συνδέεται με τις μεταβολές των ενδογενών χαρακτηριστικών του τροφίμου λόγω της ανάπτυξης και βιοχημικής δραστηριότητας μιας ομάδας μικροοργανισμών (Montville and Matthews, 2010).

Η ανάπτυξη σε ένα τρόφιμο μικροοργανισμών με έντονη μεταβολική δραστηριότητα μπορεί να καταναλώσει τα απαιτούμενα θρεπτικά συστατικά, μειώνοντας τα διαθέσιμα συστατικά και να αναστείλει την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Ένα παράδειγμα είναι ο *S. aureus*, ένα από τα πιο σημαντικά τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια. Ο *S. aureus* μπορεί να βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα, όμως η παραγωγή εντεροτοξινών που είναι απαραίτητες για την πρόκληση της σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης δεν είναι το ίδιο συχνή. Τα *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *S. epidermidis*, *Enterobacteriaceae* και *Lactobacillaceae* συγκαταλέγονται μεταξύ των βακτηρίων που είναι γνωστό ότι δρουν ως ανταγωνιστές στον *S. aureus* (Mossel, 1975), καταναλώνοντας πολύ πιο γρήγορα τα θρεπτικά συστατικά που βρίσκονται στο τρόφιμο, με αποτέλεσμα να μην αναπτύσσεται ο *S. aureus* σε πληθυσμούς που να επιτρέπουν την παραγωγή τοξινών.

Ωστόσο η αλληλεπίδραση αυτή μεταξύ των μικροοργανισμών μπορεί να έχει και θετική επίδραση για την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών. Για παράδειγμα πολλοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα προϊόντα μεταβολισμού άλλων βακτηρίων για την ανάπτυξή τους. Για παράδειγμα, σε όξινα τρόφιμα η ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων έχει ως αποτέλεσμα την άνοδο του pH, επιτρέποντας την ανάπτυξη και άλλων μικροοργανισμών, που φυσιολογικά δε θα ευνοούνταν η ανάπτυξή τους σε τέτοιες συνθήκες.

Συνεπώς η ανάπτυξη παθογόνων ή άλλων μικροοργανισμών στα τρόφιμα επηρεάζεται από τη μικροχλωρίδα του τροφίμου ή από τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται στη τεχνολογία παρασκευής τους, όπως η οξυγαλακτική καλλιέργεια. Τα βακτήρια αυτά ανταγωνίζονται τους άλλους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στο τρόφιμο και συμβάλλουν στη συντήρηση του προϊόντος, κυρίως λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος, αλκοόλης, CO₂, H₂O₂ καθώς και βακτηριοσινών (Ross et al., 2002).

1.2. Μικροοργανισμοί - δείκτες της υγιεινής και της ασφάλειας των τροφίμων

Τα τρόφιμα θεωρούνται ασφαλή για κατανάλωση όταν είναι απαλλαγμένα από κάποιους παθογόνους μικροοργανισμούς ή προϊόντα αυτών, όπως οι τοξίνες. Για ορισμένους παθογόνους μικροοργανισμούς δεν απαιτείται η απουσία τους ώστε το τρόφιμο να θεωρηθεί ασφαλές, αλλά πρέπει οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών αυτών να είναι χαμηλότεροι από ένα όριο ασφαλείας. Καθώς όμως ο προσδιορισμός των παθογόνων βακτηρίων είναι μια πολύπλοκη, ακριβή και χρονοβόρος διαδικασία, προσδιορίζεται συνήθως σε ένα τρόφιμο ο πληθυσμός κάποιων μικροοργανισμών που χαρακτηρίζονται ως «δείκτες». Μικροοργανισμοί δείκτες είναι ομάδες ή είδη μικροοργανισμών οι οποίοι εύκολα μπορούν να ανιχνευθούν και να προσδιοριστεί ο πληθυσμός του σε ένα τρόφιμο. Η απουσία ή ο χαμηλός πληθυσμός τους σημαίνει ότι τα τρόφιμα έχουν παραχθεί κάτω από σωστές συνθήκες υγιεινής και ότι από μικροβιολογικής άποψης είναι ασφαλή για να καταναλωθούν (Jay, 2000; Montville and Matthews, 2010; Πεξάρá και συν, 2016).

Οι μικροβιολογικοί αυτοί δείκτες είναι χαρακτηριστικοί για κάθε είδος τροφίμου και τα όρια τους είναι προκαθορισμένα ανάλογα με το είδος του τροφίμου. Πρέπει εύκολα και με ακρίβεια να ανιχνεύονται, να προσδιορίζεται ο πληθυσμός τους και να διαφοροποιούνται, ακόμη και σε χαμηλούς πληθυσμούς, από άλλους μικροοργανισμούς. Ο προσδιορισμός και ο υπολογισμός των πληθυσμών τους θα πρέπει να γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα και να απαιτεί σχετικά χαμηλό κόστος. Η ανάπτυξή τους δεν θα πρέπει να επηρεάζεται δυσμενώς από συστατικά των τροφίμων ή άλλους μικροοργανισμούς της μικροχλωρίδας του τροφίμου (Jay, 2000; FDA, 2001; Jay et al., 2005).

Οι κυριότερες ομάδες μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως δείκτες της υγιεινής κατάστασης και ασφάλειας των περισσότερων τροφίμων είναι οι εξής:

i) Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)

Η μέτρηση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας αντανακλά στο συνολικό αριθμό των μικροοργανισμών σε ένα τρόφιμο και η καταμέτρησή της βασίζεται στην υπόθεση ότι κάθε μικροβιακό κύτταρο θα σχηματίσει μια ορατή αποικία, όταν καλλιεργηθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα. Πιο συχνά στα τρόφιμα προσδιορίζεται ο αριθμός των αερόβιων μεσόφιλων βακτηρίων, για τον οποίο χρησιμοποιείται ο όρος Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) και περιλαμβάνει αερόβιους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται μεταξύ 20 – 45°C, με βέλτιστη θερμοκρασία τους 32°C (Freitas et al., 2009).

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα (όπως τροποποιήθηκε από τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ.1441/2007) ο προσδιορισμός των αερόβιων αποικιών αποτελεί κριτήριο υγιεινής για τα σφάγια βοοειδών, προβάτων, αιγών, αλόγων και χοίρων μετά τον καθαρισμό και πριν την ψύξη.

Ωστόσο η OMX μπορεί να αποτελέσει δείκτη της υγιεινής κατάστασης ορισμένων μόνο τροφίμων, κυρίως αυτών που δεν ευνοείται η ανάπτυξη μικροοργανισμών, όπως τα αφυδατωμένα και κατεψυγμένα τρόφιμα. Στα νωπά τρόφιμα ο αριθμός των μεσόφιλων βακτηρίων συνδέεται κυρίως με το χρόνο συντήρησης των τροφίμων. Αυτό οφείλεται στο ότι τέτοια προϊόντα φέρουν συνήθως μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών. Στα νωπά τρόφιμα ο προσδιορισμός μικρού αριθμού OMX δεν μπορεί να αποκλείσει την ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών ή προϊόντων τους, όπως οι τοξίνες. Η OMX επίσης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης υγιεινής στα ζυμούμενα τρόφιμα όπου υπάρχει φυσιολογικά μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών.

Γενικά, μεγάλος αριθμός OMX ($>10^6$ - 10^8 cfu/g) σε ένα τρόφιμο συνδέεται με μη σωστή τήρηση των κανόνων υγιεινής στην παραγωγική διαδικασία και αποτελεί ένδειξη πιθανής αλλοίωσης.

ii) Εντεροβακτήρια (οικ. *Enterobacteriaceae*)

Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει πολλά γένη βακτηρίων (*Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Yersinia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* κ.α.) μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και ορισμένα από τα πιο σημαντικά τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια, όπως η *Salmonella*, η *Yersinia enterocolitica*, η *Escherichia coli* και *Shigella* spp. Εκτός από την σημασία τους στην πρόκληση τροφιμογενούς νόσου, ορισμένα μέλη της οικογενείας συνδέονται επίσης με την αλλοίωση πολλών τροφίμων, όπως φρούτα και λαχανικά, κρέας, αβγά, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς και ψάρια και άλλα αλιεύματα (Baylis et al., 2011).

Το επίπεδο μόλυνσης των πρώτων υλών από εντεροβακτήρια μπορεί να περιοριστεί μέσω της τήρησης των κανόνων της Ορθής Γεωργικής Πρακτικής (Good Agricultural Practice, GAP) κατά την πρωτογενή παραγωγή και την τήρηση των κανόνων υγιεινής (Ορθή Υγιεινή Πρακτική, GHP) κατά τη διάρκεια της σφαγής των ζώων στο σφαγείο. Περαιτέρω κατά μήκος της αλυσίδας τροφίμων, η μόλυνση από *Enterobacteriaceae*, συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων βακτηρίων, πρέπει να ελέγχεται μέσω της εφαρμογής των αρχών του Συστήματος Ανάλυσης Επικινδυνότητας Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (Hazard Analysis Critical Control Point, HACCP) και της Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής (GMP). Η μέτρηση των εντεροβακτηριακών αποτελεί δείκτη υγιεινής και για τα επεξεργασμένα τρόφιμα, όπως τα μαγειρεμένα τρόφιμα, τα τρόφιμα με βάση το κρέας και τα αυγά, στα οποία η παρουσία των εντεροβακτηριακών υποδεικνύει μόλυνση μετά την επεξεργασία.

iii) Κολοβακτηρίδια (*E.coli*)

Τα κολοβακτηρίδια είναι Gram αρνητικά βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*, ζυμώνουν τη λακτόζη και παράγουν αέριο εντός 48 ωρών σε θερμοκρασία 35°C. Τα κολοβακτηρίδια αναπτύσσονται σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων και υποστρωμάτων. Αναφέρεται ότι μπορεί να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες από -2°C μέχρι

50°C. Στα τρόφιμα που συντηρούνται στην ψύξη παρουσιάζουν περιορισμένη ανάπτυξη. Επίσης, αναφέρεται ότι μπορούν να αναπτυχθούν σε pH 4,4 - 9,0. Στα κολοβακτηρίδια ανήκει μια υποκατηγορία μικροοργανισμών, τα κολοβακτηρίδια εντερικής προέλευσης, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται στους 44°C, και η παρουσία τους στα τρόφιμα είναι ενδεικτική κοπρανώδους μόλυνσης.

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1441/2007 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα τα κολοβακτηρίδια συστήνονται ως δείκτες της υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που συντηρούνται υπό ψύξη όπως γαρίδες και κρέας καβουριού, ιδιαίτερα σε σχέση με την επιμόλυνση από το περιβάλλον ή τη μη σωστή τήρηση των συνθηκών συντήρησης.

Στα κολοβακτηρίδια εντερικής προέλευσης ανήκει η *E. coli*, η οποία διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα κολοβακτηρίδια εντερικής προέλευσης με τη δοκιμή της ινδόλης και της β-γλυκουρονιδάσης. Αποτελεί δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης στα τρόφιμα και παρότι αποτελεί μικροοργανισμό της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου του ανθρώπου και των ζώων, μερικά στελέχη είναι παθογόνα. Στα νωπά τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης μπορεί να βρεθεί κατά τη διαδικασία της σφαγής. Η παρουσία της στα λαχανικά και τα φρούτα αποτελεί ένδειξη επιμόλυνσης, στα θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα ένδειξη προβλήματος στην παραγωγική διαδικασία ή επιμόλυνσής τους κατά τους χειρισμούς τους στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων (Jay, 2000).

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) 2073/2005, η *E. coli* αποτελεί κριτήριο ασφάλειας για τα δίθυρα μαλάκια, ζώντα εχινόδερτα χιτωνόζωα, και γαστερόποδα. Αποτελεί κριτήριο υγιεινής για τον κιμά, το μηχανικά διαχωρισμένο κρέας και τα παρασκευάσματα κρέατος ως δείκτης κοπρανώδους επιμόλυνσης. Για τα τυριά από γάλα ή ορό γάλακτος που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία, το βούτυρο και την κρέμα από νωπό γάλα ή γάλα που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία σε θερμοκρασία μικρότερη της παστερίωσης αποτελεί δείκτη υγιεινής στο τέλος της παραγωγικής διαδικασίας. Για τα προϊόντα με ή χωρίς κέλυφος βρασμένων μαλακόστρακων και μαλακίων, τα κομμένα φρούτα και λαχανικά και τους μη παστεριωμένους χυμούς φρούτων και λαχανικών που είναι έτοιμα προς κατανάλωση αποτελεί κριτήριο υγιεινής.

iv) Εντερόκοκκοι

Στο γένος *Enterococcus* περιλαμβάνει περισσότερα από 30 είδη. Είναι Gram θετικά βακτήρια που μπορούν να αναπτύσσονται και να επιβιώνουν κάτω από δύσκολες συνθήκες. Αποτελούν μέρος της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου ζώων και ανθρώπων και είναι ευρέως διαδεδομένα στο περιβάλλον, καθώς απομονώνονται συχνά από το έδαφος, το νερό, τα νωπά τρόφιμα φυτικής και ζωϊκής προέλευσης, κυρίως ως συνέπεια της επιμόλυνσης με κόπρανα ζώων.

Οι 2 κλασσικοί εντερόκοκκοι *Enterococcus faecium* και *Enterococcus faecalis* είναι τα κυριότερα είδη που απομονώνονται από τα τρόφιμα (Foulquié Moreno et al., 2006) και

είναι κυρίως εντερικής προέλευσης. Από τα άλλα είδη ο *E. gallinarum* βρίσκεται μόνο στα πουλερικά, ενώ οι *E. hirae* και *E. durans* απομονώνονται συχνότερα από τα πουλερικά και τα βοοειδή σε σχέση με άλλα ζώα (Mundt 1982). Ο *E. faecium* βρίσκεται συχνότερα στους χοίρους και ο *E. faecalis* απομονώνεται συχνότερα από ανθρώπινα κόπρανα σε σχέση με άλλα είδη. Ο *E. saccharolyticum* βρίσκεται στις αγελάδες, ενώ ο *E. mynuttii* απομονώνεται από αγελάδες, χέρια αμελκτών, χόμα και φυτά. Ο *E. avium* εντοπίζεται σε κόπρανα θηλαστικών και πτηνών.

Οι εντερόκοκκοι μπορούν να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 10 και 45 °C, σε τιμές pH μεταξύ 4 and 9,6 και είναι ανθεκτικά στην παρουσία NaCl (μπορούν να αναπτυχθούν σε συγκεντρώσεις NaCl 5 έως 10%). Τα περισσότερα είδη των εντερόκοκκων είναι σχετικά ανθεκτικά στην κατάψυξη, ενώ ορισμένα είδη εντεροκόκκων (*E. faecalis* και *E. faecium*) είναι σχετικά ανθεκτικά στη θέρμανση.

Στα τρόφιμα οι εντερόκοκκοι αποτελούν καλύτερο δείκτη υγιεινής κοπρανώδους μόλυνσης. Οι Burton και συν. (1949) βρήκαν ότι ενώ τα κολοβακτηρίδια ήταν καλύτεροι δείκτες της υγιεινής πριν την κατάψυξη των τροφίμων, μετά την κατάψυξη τους και κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους οι εντερόκοκκοι ήταν καλύτεροι δείκτες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

2. Τροφιμογενή Παθογόνα Βακτήρια

2.1. Salmonella spp.

Χαρακτηριστικά

Το γένος *Salmonella* spp περιλαμβάνει προαιρετικά αναερόβια, Gram αρνητικά βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* (D'Aoust και συν., 2001). Μπορούν να κινούνται με τη βοήθεια περίτριχων μαστιγίων. Πρόκειται για χημειοργανότροφα βακτήρια (χρησιμοποιούν οργανικά υποστρώματα), με την ικανότητα να μεταβολίζουν τα θρεπτικά συστατικά μέσω της αναπνευστικής και ζυμωτικής οδού. Η *Salmonella* διασπά τη γλυκόζη, τη μαννιτόλη και τη σορβιτόλη με παραγωγή αερίου, ενώ δε ζυμώνουν τη σακχαρόζη και την αδονιτόλη. Λίγα στελέχη *Salmonella* διασπούν τη λακτόζη. Δεν παράγουν ινδόλη και ουρεάση και είναι αρνητικές στην οξειδάση. Τέλος, παράγουν υδρόθειο και αποκαρβοξυλιώνουν τη λυσίνη και την ορνιθίνη. (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004). Το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει δύο είδη, τα *S. enterica* και *S. bongori* (superspecies V) καθένα από τα οποία περιλαμβάνει πολλούς οροτύπους. Η *S. enterica* διακρίνεται σε 6 υποείδη. Από τη *Salmonella*, είναι γνωστό ότι υπάρχουν περίπου 2.300 ορότυποι, και επικρατούν τα *S. Enteritidis* και *S. Typhimurium*.

i) Ανάπτυξη

Η ομάδα των σαλμονελών αποτελείται από μικροοργανισμούς που προσαρμόζονται σε εξαιρετικά ακραίες συνθήκες περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα, ορισμένα στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν σε υψηλές θερμοκρασίες ($\leq 54^{\circ}\text{C}$) και άλλα εμφανίζουν ιδιότητες ψυχρότροφων με ικανότητα να αναπτύσσονται σε τρόφιμα σε θερμοκρασία 2 έως 4°C (Droffn and Yamamoto, 1992). Ως βέλτιστη θεωρείται η θερμοκρασία των 37°C . Η ικανότητα των *Salmonella* spp. να προσαρμόζονται σε διάφορα περιβάλλοντα φαίνεται επίσης και από την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται σε εύρος τιμών pH από 4,5 έως 9,5, με την βέλτιστη ανάπτυξη να παρατηρείται σε τιμές από 6,5 έως 7,5 (D'Aoust, 1989).

Επιπλέον, αναπτύσσεται σε τρόφιμα με τιμές a_w 0,93 – 0,95 και τιμή pH από 4,5 - 9, ενώ σε τιμές $a_w \leq 0,93$ αναστέλλεται η ανάπτυξη των σαλμονελών (Jay, 2000). Τέλος, αν και η ανάπτυξη των σαλμονελών αναστέλλεται σε παρουσία 3-4% NaCl, η ανθεκτικότητα των στελεχών στο αλάτι αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας στο εύρος $10-30^{\circ}\text{C}$.

ii) Επιβίωση στα τρόφιμα

Η *Salmonella* θανατώνεται ύστερα από θέρμανση στους 55°C για 1 ώρα ή στο 60°C για μισή ώρα. Για προστασία από *Salmonella*, συνίσταται η θέρμανση του τροφίμου στους 75°C για 10 λεπτά ώστε να φτάσει η θερμοκρασία μέχρι το γεωμετρικό κέντρο του τροφίμου (D'Aoust, 1991).

Η κατάψυξη προκαλεί μείωση του αρχικού πληθυσμού των σαλμονελών κατά 1-2 λογαρίθμους. Η επιβίωση κατά την κατάψυξη είναι μεγαλύτερη σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (-30°C) συγκριτικά με τις υψηλότερες (-10°C) (Jay, 2000).

iii) Κατανομή

Η *Salmonella* είναι βακτήριο του εντερικού σωλήνα των ανθρώπων, των θηλαστικών και των πτηνών. Το έντερο των ανθρώπων, των θηλαστικών και των πουλερικών είναι η φυσική δεξαμενή του βακτηρίου. Απαντάται ευρεία στο περιβάλλον, στο χώμα, στο νερό, στα θηλαστικά, στα τρωκτικά, τα ερπετά, τα έντομα και τον άνθρωπο. Συνήθως μεταδίδεται στον άνθρωπο με κατανάλωση τροφίμων που μολύνονται από κόπρανα ζώων. Τα ζώα μολύνονται από τα πτηνά και τα ερπετά, στη συνέχεια η κοπριά των ζώων, στην οποία αφθονεί η *Salmonella*, χρησιμοποιείται στα λαχανικά και με αυτόν τον τρόπο μεταφέρεται στον άνθρωπο. Τα αλιεύματα μολύνονται από τα απόβλητα που χύνονται στη θάλασσα (Fricker, 1987; Montville and Matthews, 2010).

Τα μολυσμένα τρόφιμα είναι συχνά ζωικής προέλευσης, αλλά μπορεί να επιμολυνθούν και φυτικά τρόφιμα όπως τα λαχανικά. Η κύρια πηγή *Salmonella* για τον άνθρωπο είναι τα πουλερικά και τα αυγά είναι ο συχνότερος φορέας. Τα αυγά μολύνονται

εξωτερικά στο κέλυφος από τα κόπρανα των πουλερικών και εσωτερικά από το μολυσμένο γεννητικό σύστημα των πουλερικών (Yasmine et al., 2014).

Η ύπαρξη φορέων είναι ιδιαίτερης σημασίας για την μόλυνση, καθώς υπάρχει ο κίνδυνος επιμόλυνσης των τροφίμων από τους μολυσμένους χειριστές. Η αποβολή με τα κόπρανα σαλμονελών από τον άνθρωπο ακολουθεί συνήθως την οξεία φάση της ανθρώπινης σαλμονέλλωσης και μπορεί να είναι μικρής διάρκειας ή μπορεί να διαρκέσει ένα ή περισσότερα χρόνια εάν δεν εφαρμοστεί η κατάλληλη θεραπεία (χρόνιοι φορείς). Η μέση διάρκεια της αποβολής που ακολουθεί την οξεία μη τυφοειδή σαλμονέλλωση είναι περίπου 5 εβδομάδες και λιγότεροι από 1% των ασθενών παραμένουν χρόνιοι φορείς (Συμινελάκης και συν., 1986).

iv) Υπεύθυνα τρόφιμα

Τα περιστατικά των σαλμονελλώσεων που προκαλούνται από τα τρόφιμα τις τελευταίες δεκαετίες παρουσιάζουν ενδιαφέρον καθώς υπογραμμίζουν την ποικιλομορφία των φαγητών και των οροτύπων της *Salmonella* που εμπλέκονται στην ανθρώπινη νόσο.

Το κρέας μολύνεται (επιφανειακή μόλυνση) από το περιεχόμενο του εντέρου, κυρίως κατά τη διαδικασία σφαγής. Το ποσοστό μόλυνσης των σφαγίων χοίρου παγκοσμίως είναι αρκετά υψηλό και κυμαίνεται μεταξύ 0,4 και 76,3% (D'Aoust 1989, Frederick et al., 1994, Laubach και συν. 1998), όμως τα τελευταία χρόνια η εφαρμογή των αρχών ορθής υγιεινής πρακτικής και του συστήματος HACCP στη βιομηχανία του κρέατος έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού μολύνσεων.

Επιπλέον, και το βόειο κρέας αποτελεί, αν και λιγότερο συχνά, πηγή μόλυνσης του ανθρώπου (D' Aoust, 1994).

Τα τελευταία χρόνια, το κρέας των πουλερικών και τα αυγά τείνουν να υπερκαλύψουν την σημασία των άλλων ειδών κρέατος ως πιθανά αίτια της μόλυνσης (D'Aoust, 1989). Τα περιστατικά που οφείλονται στον ορότυπο στην *S. Enteritidis* συνδέονται με την κατανάλωση νωπών ή ελαφρώς μαγειρεμένων αυγών και προϊόντων με αυγά, τονίζοντας τη σημασία των αυγών ως αίτιο της ανθρώπινης σαλμονέλλωσης και την ανάγκη μείωσης του ποσοστού μόλυνσης.

Όλοι οι γνωστοί ορότυποι σαλμονελών είναι δυνατόν να βρεθούν στο γάλα ως αποτέλεσμα επιμόλυνσης από τα κόπρανα των ζώων, το περιβάλλον της εκτροφής, το νερό ή και τους ανθρώπους φορείς. Συχνά ανευρίσκονται ορότυποι που απαντούν στο έντερο των γαλακτοπαραγωγών ζώων. Αρκετά περιστατικά σαλμονέλλωσης αποδόθηκαν σε κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων. Κυρίως ενοχοποιείται το απαστερίωτο γάλα και η σκόνη γάλακτος. Οι σαλμονέλλες δεν επιζούν μετά την παστερίωση του γάλακτος ή ισοδύναμη θερμική επεξεργασία και η παρουσία τους συνήθως είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης μετά τη θερμική επεξεργασία. Επίσης τα τυριά και τα παγωτά έχουν προκαλέσει αρκετά ομαδικά κρούσματα. Από τα διάφορα είδη τυριών, το μεγαλύτερο κίνδυνο ενέχουν αυτά που δεν ωριμάζουν σωστά. Κατά τις πρώτες ώρες από την έναρξη της

πήξης, όταν δεν έχει αναπτυχθεί ικανοποιητική οξύτητα οι σαλμονέλλες μπορούν να πολλαπλασιαστούν, αλλά με την αύξηση της οξύτητας σε τιμές pH κάτω από 4,5 ο πληθυσμός μειώνεται (Μάντης, 2005).

Τα τελευταία χρόνια επίσης διαπιστώθηκε ότι συχνά στην εκδήλωση σαλμονέλλωσης στον άνθρωπο εμπλέκονται και άλλα τρόφιμα, όπως φρούτα και λαχανικά, που παλαιότερα δεν θεωρούνταν ύποπτα, γι' αυτό και πολλά περιστατικά σαλμονέλλωσης τα τελευταία χρόνια να συνδέονται με κατανάλωση λαχανικών (D'Aoust et al., 2001). Άλλες, επίσης, μη ζωϊκής προέλευσης πηγές μόλυνσης αποτελούν τα αμύγδαλα, τα μπαχαρικά, οι σοκολάτες (ICMSF, 1996).

v) Χαρακτηριστικά της νόσου

Επειδή είναι εμπλεκόμενοι πολλοί παράγοντες, δε μπορεί να καθοριστεί σαφώς η μολύνουσα δόση. Η ευαισθησία διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ομάδων του πληθυσμού (Blaser and Newman, 1982), με πιο ευπαθή τα βρέφη, οι ηλικιωμένοι και τα άτομα σε ανοσοκαταστολή. Σε μία μελέτη των ομαδικών κρουσμάτων, έδειξε ότι μερικά μόνο κύτταρα (1 - 10) είναι ικανά να προκαλέσουν μόλυνση (D'Aoust, 1985, Bollaerts et al., 2008).

Σημασία έχουν και οι παράγοντες που σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά του τροφίμου. Διαφορές σε τοξικότητα υπάρχουν και μεταξύ των διαφόρων στελεχών (D'Aoust, 1991). Δηλαδή, η μολύνουσα δόση της *S. Typhi* ή *S. Paratyphi* είναι μικρότερη από τη μολύνουσα δόση της *S. Enteritidis* (Blaser and Newman, 1982).

Τα *Salmonella* spp. προκαλούν εντερικές και εξωεντερικές εκδηλώσεις. Οι εντερικές εκδηλώσεις διακρίνονται στην εντεροκολίτιδα και στον τυφοειδή/παρατυφοειδή πυρετό. (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004). Η εντεροκολίτιδα οφείλεται στην πρόσληψη με την τροφή μεγάλου αριθμού βακτηρίων (μολυσματική δόση τουλάχιστον 10^6 κυττάρων). Οι πιο συχνοί ορότυποι που προκαλούν την εντεροκολίτιδα είναι η *S. enteritis* και η *S. typhimurium*. Ο χρόνος επώασης και η εμφάνιση των συμπτωμάτων κυμαίνεται από 6 - 48 ώρες και διαρκούν 1 - 4 ημέρες.

Ο τυφοειδής και παρατυφοειδής πυρετός προκαλείται από τη *S. Typhi* και τη *S. Paratyphi* A,B και C αντίστοιχα. Η μόλυνση γίνεται από ασθενείς ή μικροβιοφόρους, οι οποίοι αποβάλλουν με τα κόπρανα τη *Salmonella*. Λοίμωξη εγκαθίσταται με βακτήρια της τάξης $10^5 - 10^6$. Το στάδιο επώασης της νόσου είναι 7 - 14 ημέρες. Ο μικροοργανισμός διέρχεται από το βλεννογόνο του λεπτού εντέρου στο αίμα προκαλώντας μικροβαιμία, Στη συνέχεια τα βακτήρια μεταφέρονται στο ήπαρ, σπλήνα και χολή όπου πολλαπλασιάζονται. Από τη χολή αποβάλλονται τα βακτήρια από τα κόπρανα. Η αποβολή της *Salmonella* μπορεί να συνεχιστεί από τους φορείς για πολλούς μήνες, από τους οποίους μπορεί να ξεσπάσει επιδημία, ιδιαίτερα αν αυτοί εργάζονται στην παρασκευή και διανομή τροφίμων (Brenner et al., 2000).

Οι εξωεντερικές εκδηλώσεις που προκαλούνται από *Salmonella* είναι οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, μηνιγγίτιδα, ουρολοίμωξη, λοιμώξεις μαλακών μορίων (Montville and Matthews, 2010).

Καθοριστικός παράγοντας για την πρόκληση νόσου είναι ο αριθμός των κυττάρων που εισέρχονται στον οργανισμό. Σημαντικό ρόλο παίζουν οι προδιαθέτοντες παράγοντες για την ανάπτυξη της νόσου, όπως η παθογένεια του ορότυπου, η ευαισθησία του ατόμου και το ύποπτο τρόφιμο. 10 με 100 κύτταρα στις ευπαθείς ομάδες μπορεί να αποβεί μοιραία (Glynn et al., 1992).

vi) Πρόληψη

Για την πρόληψη των σαλμονελλώσεων, είναι σημαντικό να γίνεται επαρκής θερμική επεξεργασία του κρέατος και των αυγών. Πρέπει επίσης να αποφεύγεται η επιμόλυνση των τροφίμων, στα διάφορα στάδια της παραγωγής τους.

Τα νωπά κρέατα θα πρέπει να διατηρούνται χωριστά από τρόφιμα που καταναλώνονται. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται και στα αυγά, το κέλυφος των οποίων πρέπει να θεωρείται μολυσμένο (Πεξαρά και συν., 2016).

Τέλος, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στην τήρηση των κανόνων ατομικής υγιεινής από τους χειριστές τροφίμων. Οι πάγκοι κοπής, τα μαχαίρια και τα χέρια του χειριστή να πλένονται καλά μετά από χειρισμό ωμών κρεάτων. Τα χέρια πρέπει να πλένονται πριν το χειρισμό των τροφίμων, καθώς και μεταξύ των χειρισμών διαφορετικών τροφίμων.

vii) Νομοθεσία

Στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 (όπως τροποποιήθηκε και ισχύει) απαιτείται απουσία της *Salmonella* spp. σε 10 gr ή 25 gr τροφίμου σε προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους. Επίσης, σύμφωνα με τους Κανονισμούς (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 & αριθ. 1086/2011 απαιτείται απουσία της *S. Enteritidis* και της *S. Thyphimurium* σε 25gr νωπού κρέατος πουλερικών που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους.

2.2. Staphylococcus spp.

i) Χαρακτηριστικά

Το γένος *Staphylococcus* περιλαμβάνει περισσότερα από 30 είδη. Στα τρόφιμα παρουσιάζουν ενδιαφέρον κυρίως τα στελέχη του σταφυλόκοκκου που είναι θετικά στη νουκλεάση και πηκτάση, επειδή συνήθως παράγουν εντεροτοξίνες. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι υπάρχουν και ορισμένα νουκλεάση και πηκτάση αρνητικά στελέχη που παράγουν εντεροτοξίνες.

Αν και πολλά είδη σταφυλόκοκκων παράγουν εντεροτοξίνες, τα περισσότερα περιστατικά τοξίκωσης οφείλονται στο *Staphylococcus aureus*. Η τοξίνωση από *S. aureus* είναι ένα από τα πιο συχνά τροφιμογενή νοσήματα (Genigeorgis, 1989). Τις τελευταίες δεκαετίες αναφέρεται ως τρίτη αιτία μεταξύ των ασθενειών τροφιμογενούς αιτιολογίας παγκοσμίως (Zhang et al., 1998, Tirado and Schimdt, 2001, Asperger and Zangerl, 2003, Normanno et al., 2005, Boerema et al., 2006). Ωστόσο, πιστεύεται ότι η πραγματική συχνότητα είναι ακόμη μεγαλύτερη, γεγονός που οφείλεται στο ότι τα περισσότερα περιστατικά δεν λαμβάνουν ιατρική φροντίδα και δεν καταγράφονται (Smyth et al., 2004).

Η αυξημένη αυτή συχνότητα εκδήλωσης οφείλεται στη ευρύτατη διάδοση του μικροοργανισμού στο περιβάλλον και στην ικανότητα ορισμένων στελεχών του να παράγουν μία ή περισσότερες εντεροτοξίνες.

Ο *S. aureus* είναι μη κινητός, σφαιρικός, θετικός κατά Gram κόκκος, με διάμετρο 0,5-1,0 μm. Διασπά τη μαννιτόλη προς παραγωγή γαλακτικού οξέος (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004).

ii) Ανάπτυξη

Οι σταφυλόκοκκοι είναι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί, αλλά παρατηρείται ανάπτυξη σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών 7 – 47,8°C (Smith 1983) με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C.

Γενικά, πρόκειται για αερόβιο μικρόβιο, ωστόσο μπορεί να αναπτυχθεί και σε αναερόβιες συνθήκες. Σε ατμόσφαιρα 80% CO₂ η ανάπτυξη του *S. aureus* επιβραδύνεται. Ο *S. aureus* αναπτύσσεται σε pH 4.2 - 9.8 (Πεξαρά και συν., 2010).

Το εύρος τιμών ανάπτυξης ενεργότητας νερού για τον *S. aureus* κυμαίνεται από 0.83 - 0.99 (Μπαλατσούρας, 2006).

Γενικά, μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμές a_w χαμηλότερες από άλλα αλόφιλα βακτήρια. Μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμή a_w κάτω από 0.83 κάτω από ιδανικές συνθήκες. Ωστόσο η τιμή a_w 0.86 αναγνωρίζεται ως η ελάχιστη.

Πρόκειται για αλόφιλο βακτήριο που μπορεί να αναπτύσσεται σε παρουσία NaCl 7 – 10%, ενώ ορισμένα στελέχη έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να αναπτυχθούν και σε συγκέντρωση NaCl 20% (Πεξαρά και συν., 2010).

Γενικά, ισχύει πως όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του NaCl, αυξάνεται και ελάχιστη τιμή pH ανάπτυξης. Σε υποστρώματα χωρίς προσθήκη άλατος παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροβίου σε pH 4.00 - 9.83. Ενώ μετά από προσθήκη 4% NaCl το εύρος pH μειώθηκε στο 4.4 - 9.43 και σε υποστρώματα με τιμή pH 4.8 και συγκέντρωση 5% NaCl παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης. Αναστολή επίσης, παρατηρήθηκε σε συνδυασμό παραγόντων a_w 0.90, θερμοκρασία 12⁰ C και pH<5.5 (Pexara et al., 2010).

iii) Επιβίωση στα τρόφιμα

Οι τιμές D στους 60°C ποικίλουν από 2 έως 50 min, ανάλογα με το τρόφιμο. Τα κύτταρα είναι ευαίσθητα σε pH 7,2 με τιμή $D_{140^{\circ}\text{F}} = 0,11$ min και περισσότερα ανθεκτικά σε γάλα σε pH 6,9 με τιμή $D_{140^{\circ}\text{F}} = 10,0$ min. Σε αλλαντικά Φρανκφούρτης θέρμανση σε θερμοκρασία 71,1°C βρέθηκε να είναι καταστροφική για τα περισσότερα στελέχη του *S. aureus* (Palumbo et al., 1977).

iv) Κατανομή

Ο *S. aureus* είναι δυνητικά παθογόνος για τον άνθρωπο και τα ζώα και προκαλεί μια μεγάλη ποικιλία ασθενειών, από απλή λοίμωξη του δέρματος έως σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, όπως η πνευμονία και η σηψαιμία (Lowy, 1998). Αν και είναι παθογόνος για τον άνθρωπο, είναι ευρύτατα διαδεδομένος στο περιβάλλον. Ανευρίσκεται κυρίως στο βλεννογόνο του ρινοφάρυγγα και στο δέρμα του ανθρώπου και των ζώων. Στον άνθρωπο η κύρια θέση πολλαπλασιασμού είναι η μύτη, η οποία αποικίζεται τις πρώτες ημέρες της ζωής του. Η παρουσία του σταφυλόκοκκου στη μύτη στον υγιή πληθυσμό είναι 10-50%, ενώ σε ασθενείς φτάνει το 60-80% (Noble, 1981). Το 60% του πληθυσμού φιλοξενεί το μικροοργανισμό περιοδικά (Kluytsman et al., 1997).

Είναι επίσης παρών στο δέρμα και τους βλεννογόνους των γαλακτοπαραγωγικών ζώων που αποτελούν τη δεξαμενή του βακτηρίου στο περιβάλλον (Jablonsky and Bohach, 1997). Στα ζώα γαλακτοπαραγωγής προκαλεί ενδομαστικές λοιμώξεις (Akineden et al., 2001, Cabral et al., 2004) και είναι ο υπεύθυνος μικροοργανισμός για το 30-40% των περιστατικών μαστίτιδας (Asperger and Zangerl, 2003).

Ο μισός αριθμός των γνωστών ειδών του σταφυλόκοκκου ανευρίσκεται μόνο στον άνθρωπο (π.χ. *S. cohnii* subsp. *cohnii*) ή στον άνθρωπο και σε άλλα ζώα (π.χ. *S. aureus*). Τα περισσότερα κατοικίδια ζώα φιλοξενούν το *S. aureus*. Αν και πολλά από τα πηκτάση-θετικά προσαρμόζονται κυρίως σε είδη εκτός του ανθρώπου, η παρουσία τους σε ανθρώπινα τρόφιμα είναι πιθανή. Η ανάπτυξη τους σε ευπαθή τρόφιμα μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή τοξίνης.

Γενικά οι σταφυλόκοκκοι είναι ευαίσθητοι στον ανταγωνισμό σε σχέση με τους μικροοργανισμούς που αποτελούν τη χλωρίδα των περισσότερων τροφίμων. Στις θερμοκρασίες που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό του σταφυλόκοκκου, η φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα δρα ανταγωνιστικά στην ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου μέσω της διεκδίκησης θρεπτικών συστατικών ή διαμορφώνοντας συνθήκες στο περιβάλλον που δεν ευνοούν το πολλαπλασιασμό του. Μεταξύ των βακτηρίων που είναι γνωστό ότι δρουν ως ανταγωνιστές στον *S. aureus* περιλαμβάνονται τα *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *S. epidermidis*, *Enterobacteriaceae* και *Lactobacillaceae* (Mossel, 1975).

Τρόφιμα που περιέχουν μεγάλους αριθμούς οξυγαλακτικών βακτηρίων εμποδίζουν την ανάπτυξη των σταφυλόκοκκων. Η ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων έχει διαπιστωθεί ότι επηρεάζει και την παραγωγή των εντεροτοξινών (Chordash and Potter, 1976).

ν) Σταφυλοκοκκικές τοξίνες

Οι σταφυλοκοκκικές τοξίνες είναι εξωκυττάρειες διαλυτές πρωτεΐνες, σχηματίζονται από απλή πεπτιδική αλυσίδα μοριακού βάρους 26.000 – 29.600 Da (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, 2004; Normanno et al., 2005). Ανήκουν σε μια μεγάλη ομάδα αντιγόνων, η παραγωγή των οποίων ελέγχεται από γονίδια στους φάγους, χρωμόσωμα και πλασμίδια (Johnson et al., 1991; Zhang et al., 1998; Balaban and Rasooly, 2000; Proft and Fraser, 2003). Παράγονται ιδιαιτέρως από στελέχη του *S. aureus* τα οποία αναπτύσσονται σε τρόφιμα πλούσια σε υδατάνθρακες και πρωτεΐνες, και αποτελούν από τα σπουδαιότερα αίτια σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης (Dinges et al., 2000; Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, 2004).

Έχουν αναγνωρισθεί 6 κλασικοί τύποι σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών SEA, SEB, SEC (SEC1, SEC2, SEC3), SED, SED και TSST-1 (toxic shock syndrome toxin – 1). Πρόσφατα περιγράφηκαν επιπλέον νέες σταφυλοκοκκικές τοξίνες, ο ρόλος των οποίων δεν έχει διευκρινιστεί (Omoe et al., 2003; Boerema et al., 2006). Για το λόγο αυτό προτάθηκε να καλούνται ως "τοξίνες όμοιες με τις σταφυλοκοκκικές" (Morandi et al., 2007).

Από τα στελέχη *S. aureus* ζωικής προέλευσης παράγονται όλες οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες (εκτός της SEE), γεγονός που καταδεικνύει το ρόλο που παίζουν τα ζώα στην πρόκληση της σταφυλοκοκκικής τροφικής δηλητηρίασης και την ανάγκη τήρησης των κανόνων υγιεινής στην πρωτογενή παραγωγή (Smyth et al., 2004).

Οι εντεροτοξίνες είναι ανθεκτικές στην πρωτεολυτική πέψη που πραγματοποιείται από τα ένζυμα θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, πεψίνη, ρενίνη και παπαΐνη. Η ανθεκτικότητα αυτή τις επιτρέπει να περνούν άπεπτες από το στομάχι, αν και είναι πρωτεϊνικής φύσης, και να δρουν ως εντεροτοξίνες. Είναι αρκετά θερμοανθεκτικές. Η βιολογική δράση της SEB διατηρείται μετά από θέρμανση για 16 ώρες στους 60°C σε τιμή pH 7,3 (Schantzetal., 1965). Η θέρμανση της SEA στους 80°C για 3 min ή στους 100°C για 1 min είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητάς της να αντιδρά ορολογικά (Bergdoll, 1967). Οι σταφυλοκοκκικές τοξίνες έχουν μια ενδεικτική τιμή D στους 121°C, 3-8 min (Asperger & Zangerl, 2003). Το γεγονός ότι οι εντεροτοξίνες είναι περισσότερο θερμοανθεκτικές από ότι τα κύτταρα του σταφυλοκόκκου από τα οποία προήλθαν είναι ιδιαίτερα σημαντικό, γιατί μπορεί να είναι παρούσες στο τρόφιμο όταν οι σταφυλόκοκκοι δεν ανιχνεύονται στο τρόφιμο (Jorgensen et al., 2005).

Ο μικρότερος αριθμός *S. aureus* που απαιτείται για την παραγωγή της ελάχιστης δόσης εντεροτοξίνης ικανής να προκαλέσει νόσο στον άνθρωπο εξαρτάται από το υπόστρωμα ανάπτυξης του μικροβίου και την εντεροτοξίνη. Όταν τα επίπεδα του *S. aureus* είναι $>10^5$ κύτταρα/gr τροφίμου, τότε υπάρχει αρκετή εντεροτοξίνη να προκαλέσει ασθένεια. Το τυπικό εύρος κυμαίνεται από 10^5 – 10^8 κύτταρα, ωστόσο σε μερικές περιπτώσεις

ενοχοποιούνται και μικρότεροι πληθυσμοί . Ανιχνεύσιμη SEA σε θρεπτικό υπόστρωμα βρέθηκε όταν ο πληθυσμός ήταν 10^4 cfu/g (Hirookaetal., 1987). Σε γάλα SEA και SED ανιχνεύθηκαν σε πληθυσμούς μόνο πάνω από 10^7 (Noieto and Bergdoll, 1980).

Γενικά η παραγωγή εντεροτοξινών ευνοείται από συνθήκες που σχετίζονται με τα ενδογενή χαρακτηριστικά του τροφίμου. Η ανάπτυξη των σταφυλόκοκκων δεν συνεπάγεται και την παραγωγή τοξινών, καθώς μπορούν να αναπτύσσονται και σε συνθήκες που γενικά δεν ευνοούν την παραγωγή εντεροτοξινών.

Η βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή τοξίνης είναι μεταξύ $40-45^{\circ}\text{C}$, με ένα εύρος $10-46^{\circ}\text{C}$ και ευνοείται σε τιμές pH μεταξύ 5,3-7,0. Η ελάχιστη τιμή που επιτρέπεται η παραγωγή είναι 4,8 ενώ η μέγιστη περίπου 9,0 (Pexara et al., 2010).

Η παραγωγή εντεροτοξίνης γενικά παρατηρείται σε στενότερο εύρος τιμών aw από ό,τι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Ιδανική τιμή aw για παραγωγή τοξίνης είναι 0,90, ενώ παραγωγή παρατηρείται σε ένα εύρος 0,86 έως 0,99 (Pexara et al., 2010).

Τοξίνη παράχθηκε σε συγκέντρωση NaCl 10% ή υψηλότερη σε pH 5,45, αλλά δεν είναι δυνατή παραγωγή τοξίνης σε συγκέντρωση NaCl 12% (Genigeorgis et al., 1971).

Πρόσληψη με τα τρόφιμα 20 ng έως 1 μg σταφυλοκοκκικής εντεροτοξίνης επαρκεί για την εκδήλωση συμπτωμάτων στον άνθρωπο (Berdgoll, 1989). Η συχνότητα εκδήλωσης εξαρτάται από την ποσότητα του υπεύθυνου τροφίμου που καταναλώνεται και εν μέρει από την ηλικία. Οι ηλικιωμένοι και τα παιδιά (5-9 ετών) είναι περισσότερο ευαίσθητα.

vi) Υπεύθυνα τρόφιμα

Μία ποικιλία των τροφίμων εμπλέκονται στη σταφυλοκοκκική τοξίνωση (Le Loir et al, 2003). Αυτό οφείλεται στην ικανότητα του *S. aureus* να αναπτύσσεται και να παράγει τοξίνες κάτω από ποικίλες συνθήκες.

Συχνότερα εμπλέκονται μαγειρεμένα τρόφιμα που επιμολύνονται από το χειρισμό τους μετά την θερμική επεξεργασία και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου ή υπό ψύξη, σε μεγάλους όγκους για αρκετές ώρες (Genigeorgis, 1989).

Μεταξύ των τροφίμων που εμπλέκονται πιο συχνά στη πρόκληση της τοξίνωσης είναι το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το γάλα αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι τα τρόφιμα που πιο συχνά προκαλούν σταφυλοκοκκική τοξίνωση (De Buyser et al., 2001, Jorgensen et al., 2005). Ωστόσο, η μόλυνση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων προέρχεται αρκετά συχνά από τον ανθρώπινο χειρισμό ή από το περιβάλλον κατά την επεξεργασία. Τα χέρια των αμελκτών διαπιστώθηκε ότι έχουν ιδιαίτερη σημασία στην μετάδοση του *S. aureus* στα γαλακτοπαραγωγά ζώα αλλά και στην μόλυνση του γάλακτος (Pexara et al., 2010). Αν και η παστερίωση καταστρέφει τα κύτταρα του *S. aureus*, οι θερμοανθεκτικές τοξίνες δεν καταστρέφονται (Morandi et al, 2007, Evenson et al, 1988). Από τα τυριά, ιδιαίτερη σημασία

για τη δημόσια υγεία έχουν τα τυριά τυρογάλακτος (μανούρι, ανθότυρος, μυζήθρα), καθώς θεωρούνται ευνοϊκό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *S. aureus*, λόγω του υψηλού pH ($\approx 6,0$), της έλλειψης οξυγαλακτικής ζύμωσης και του υψηλού ποσοστού υγρασίας τους.

Η μόλυνση από τον άνθρωπο κατά τον χειρισμό τροφίμων είναι πρωταρχική αιτία της σταφυλοκοκκικής τοξίκωσης, καθώς από πολλούς ερευνητές έχει διαπιστωθεί ότι η πλειοψηφία των στελεχών του *S. aureus* που απομονώνονται από τα τρόφιμα που υφίστανται χειρισμό προέρχονται από τον άνθρωπο (Devriese, 1984; Berdggoll, 1989). Επιπλέον, οι επιφάνειες του εξοπλισμού μπορεί να είναι πηγή επιμόλυνσης από *S. aureus* (Kusumaningrum et al, 2003).

Οι σταφυλοκοκκικές τοξίνες που συχνότερα εμπλέκονται σε περιπτώσεις σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης είναι η SEA και η SED, και ακολουθεί η SEB (Balaban και Rasooly, 2000, Manfred et al, 2005). Η λιγότερα συχνά εμπλεκόμενη τοξίνη είναι η SEE.

Μεταξύ των τοξινών σε περιπτώσεις σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης από την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων, συχνότερα ενοχοποιείται η SEC (Tamarapu et al, 2001, Manfreda et al, 2005).

vii) Χαρακτηριστικά της νόσου

Τα συμπτώματα της σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης εμφανίζονται μέσα σε λίγες ώρες (1 - 6 ώρες) μετά την κατανάλωση του μολυσμένου τροφίμου. Ο σύντομος χρόνος που παρεμβάλλεται μεταξύ της πρόσληψης της προσχηματισμένης τοξίνης με το τρόφιμο και της εκδήλωσης των συμπτωμάτων είναι ένα χαρακτηριστικό της τοξίνωσης (Pexara et al., 2010). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν εμετό και διάρροια χωρίς πυρετό. Η πρόκληση του εμετού οφείλεται στον ερεθισμό του κέντρου του εμετού του κεντρικού νευρικού συστήματος μετά τη δράση της τοξίνης σε νευρικούς υποδοχείς του εντέρου (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004). Τα συμπτώματα υποχωρούν μέσα σε 24-48 ώρες, ενώ θάνατοι παρατηρούνται σπάνια, κυρίως σε ηλικιωμένους και λόγω επιλοκών (Martin and Iandolo, 2000).

viii) Πρόληψη

Σημαντικό για την πρόληψη της σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης είναι η επαρκής θερμική επεξεργασία, η επαρκής ψύξη των τροφίμων, η παρασκευή τροφίμων σε χώρους με κατάλληλες προδιαγραφές, η τήρηση των κανόνων υγιεινής από τα άτομα που χειρίζονται τα τρόφιμα και η διατήρηση των τροφίμων σε θερμαινόμενες συσκευές που ευνοούν την βακτηριακή ανάπτυξη (Bryan, 1974).

Ευπαθή τρόφιμα που παράγονται με χαμηλούς πληθυσμούς σταφυλοκόκκων μπορούν να παραμείνουν απαλλαγμένα εντεροτοξινών εάν διατηρηθούν σε θερμοκρασία είτε χαμηλότερη από 4,4°C είτε υψηλότερη από 60°C μέχρι να καταναλωθούν.

ix) Νομοθεσία

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θέσει κριτήρια για την παρουσία των σταφυλοκοκκικών τοξινών σε τυριά, γάλα σε σκόνη και σκόνη ορού γάλακτος. Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής της Ευρωπαϊκής Ένωσης, δείγματα με coagulase - θετικό σταφυλοκόκκο που υπερβαίνουν τα 10^5 cfu/gr θα πρέπει να ελεγχθούν περαιτέρω για τη παρουσία της σταφυλοκοκκικής τοξίνης. Σε αυτή την περίπτωση, η σταφυλοκοκκική τοξίνη δεν πρέπει να ανιχνεύεται σε 25 gr τροφίμου.

2.3. Listeria spp.

i) Χαρακτηριστικά

Η λιστερίωση είναι μια νόσος με μεγάλη σημασία για τη δημόσια υγεία. Η *Listeria monocytogenes* ως τροφιμογενές παθογόνο βακτήριο προκαλεί στον άνθρωπο την λιστερίωση, ένα πολύ σημαντικό για την Δημόσια υγεία τροφιμογενές νόσημα. Η *L. monocytogenes* είναι το περισσότερο συχνό παθογόνο από τα είδη της *Listeria* που σχετίζονται με ασθένεια στο άνθρωπο (Janda and Abbott, 1999). Το βακτήριο είναι υπεύθυνο κυρίως για την εμφάνιση μεμονωμένων κρουσμάτων, ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχουν περιγραφεί και επιδημικές εξάρσεις.

Η *L. monocytogenes* είναι θετικό κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο και ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος εμφανίζει ποικιλία στη μορφολογία (Janda και Abbott, 1999). Είναι ένα από τα έξι είδη *Listeria*. Τα άλλα είναι η *L. ivanovii*, η *L. innocua*, η *L. seeligeri*, η *L. welshimeri* και η *L. grayi* (Rocourt, 1999). Από αυτά τα είδη, η *L. monocytogenes* είναι παθογόνος για τον άνθρωπο και η *L. ivanovii* είναι κυρίως παθογόνος για τα ζώα.

ii) Ανάπτυξη

Η *L. monocytogenes* είναι ψυχρόφιλο βακτήριο και μπορεί να αναπτύσσεται ακόμη και σε θερμοκρασίες ψύξης, με αργή όμως ανάπτυξη. Αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από 0 - 45°C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30 - 37°C (Montville and Matthews, 2010).

Αναπτύσσεται σε pH 5,6-9,6. Ωστόσο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο οργανισμός μπορεί να αναπτυχθεί σε υποστρώματα σε τιμή pH έως και 4,4, ακόμη και σε pH < 4,3, όπου επιβιώνει αλλά δεν πολλαπλασιάζεται (Swaminathan, 2001).

Αναπτύσσεται σε ενεργότητα νερού $a_w \geq 0,97$. Για τα περισσότερα στελέχη η ελάχιστη τιμή για ανάπτυξη είναι 0,93, ωστόσο, ορισμένα στελέχη αναπτύσσονται σε τιμές έως και 0,90 (Lou and Yousef, 1999).

Τέλος, η *L. monocytogenes* αναπτύσσεται κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες.

iii) Επιβίωση στα τρόφιμα

Θανατώνεται σε θερμοκρασία $>50^{\circ}\text{C}$, ωστόσο εμφανίζει μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα όταν υφίσταται θερμική επεξεργασία υπό αναερόβιες συνθήκες σε σχέση με όταν υφίσταται θερμική επεξεργασία υπό αερόβιες συνθήκες. Το γεγονός αυτό δημιουργεί ανησυχία για τα συσκευασμένα τρόφιμα που υφίστανται θερμική επεξεργασία υπό κενό (Knabel et al., 1990). Ορισμένοι ερευνητές αναφέρουν ότι η έκθεση των κυττάρων της *Listeria* σε θερμική επεξεργασία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεϊνών, οι οποίες προστατεύουν το μικροοργανισμό από την επιβλαβή επίδραση περαιτέρω θερμικής επεξεργασίας (“heat-shock” proteins) (Socolovic et al., 1990).

Η ψύξη δε μειώνει το μέγεθος του μικροβιακού πληθυσμού, ενώ η επιβίωση της κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στην κατάψυξη εξαρτάται από το τρόφιμο και το ρυθμό κατάψυξης (Tomarkin, 2002).

Ακόμη, η *L. monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρόνο σε τιμές a_w έως 0,83 (Shahamat et al., 1980).

Επιπλέον, είναι δυνατή η ανάπτυξη σε παρουσία μέχρι και 10-12% NaCl, και αναπτύσσεται σε υψηλούς πληθυσμούς σε μέσες συγκεντρώσεις (6,5%).

Η *L. monocytogenes* μπορεί να προσκολληθεί σε διάφορες επιφάνειες και έχει διαπιστωθεί η ικανότητά της να σχηματίζει βιομεμβράνη (biofilm) σε εξοπλισμούς, σε γαλακτοβιομηχανίες και βιομηχανίες κρέατος (Joeng and Frank, 1994), παρουσιάζοντας μεγάλη αντοχή στα κοινά απολυμαντικά. Τα είδη του γένους *Listeria* μπορούν να επιβιώσουν επίσης στα χέρια μετά το πλύσιμο και στις σόλες παπουτσιών.

iv) Κατανομή

Έχει απομονωθεί από το έδαφος (Welshimer, 1960), το νερό και τα φυτά σε αποσύνθεση (Welshimer, 1968, Weis, 1975), όπου παρουσιάζει ιδιαίτερη αντοχή (Watkins and Sleath, 1981). Η χρήση των περιττωμάτων ως λίπασμα σε καλλιέργειες έχει ενοχοποιηθεί ότι συνέβαλλε σε μαζικές εκδηλώσεις λιστερίωσης σε ανθρώπους, επιμολύνοντας κυρίως τρόφιμα φυτικής προέλευσης (Schlech et al., 1983).

v) Υπεύθυνα τρόφιμα

Τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση που διατηρούνται για σχετικά μεγάλο διάστημα στην ψύξη καθώς και τρόφιμα που είναι μολυσμένα με *L. monocytogenes* με >100 cfu/gr/ml, αποτελούν τρόφιμα υψηλού κινδύνου. Τα τρόφιμα που ενοχοποιούνται είναι το γάλα και τα τυριά, το κρέας και τα αλιεύματα. Το νωπό γάλα είναι η κύρια πηγή της *L. monocytogenes*.

Λόγω της ανθεκτικότητας στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και της ανθεκτικότητας στις υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, η *L. monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει

κατά την παραγωγική διαδικασία του τυριού, όπου συγκεντρώνεται κυρίως στο τυρόπηγμα. Η ανάπτυξη της επιβραδύνεται λόγω της οξυγαλακτικής καλλιέργειας αλλά δεν αναστέλλεται (Farber et al., 1999).

Η *L. monocytogenes* έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί είναι ψυχρόφιλο παθογόνο βακτήριο και μπορεί να αναπτύσσεται σε διάφορα προϊόντα κρέατος όταν συντηρούνται στην ψύξη (0-4°C) (Walker et al., 1990).

Ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται καλύτερα στα πουλερικά σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο κρέας. Η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* στο κρέας εξαρτάται από τον τύπο του κρέατος, το pH και την παρουσία άλλων μικροοργανισμών. Η μόλυνση του μυϊκού ιστού προκαλείται κατά τη διάρκεια της σφαγής, του τεμαχισμού και των χειρισμών του. Το βακτήριο προσκολλάται στην επιφάνεια του κρέατος και δύσκολα αφαιρείται. Ωστόσο, με τη συνήθη θερμική επεξεργασία οι πληθυσμοί του βακτηρίου μειώνονται και ο κίνδυνος της επιβίωσης του θεωρείται απίθανος (Nyati, 2000).

Προϊόντα θερμικής επεξεργασίας κρέατος και πουλερικών που προορίζονται για ωμή κατανάλωση έχουν ενοχοποιηθεί για τροφολοιμώξεις. Όπως επίσης και τα λουκάνικα που δε θερμάνθηκαν επαρκώς και κοτόπουλα που δεν είχαν υποστεί την κατάλληλη θερμική επεξεργασία (Swaminathan, 2001). Η *L. monocytogenes* δύσκολα απομακρύνεται ή αδρανοποιείται από την επιφάνεια του κρέατος (Swaminathan, 2001).

Μερικά από τα αλιεύματα που αποτελούν τρόφιμα υψηλού κινδύνου για λιστερίωση είναι τα μαλάκια, το ωμό ψάρι, τα προϊόντα ψαριών που έχουν υποστεί επεξεργασία όπως αλίπαστα, τα ελαφρώς θερμοασμένα προϊόντα ψαριών και οστρακοειδών (Huss et al., 2000).

vi) Χαρακτηριστικά της νόσου

Στους ενήλικες προκαλεί κυρίως σηψαιμία, μηνιγγίτιδα και μηνιγγοεγκεφαλίτιδα με θνησιμότητα 20-25%. Σπάνιες επιπλοκές είναι η ενδοκαρδίτιδα σε άτομα με καρδιακά προβλήματα και διάφορες τοπικές μολύνσεις, όπως ενδοφθαλμίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, οστεομυελίτιδα και περιτονίτιδα (Slutsker and Schuchat, 1999). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό, σπασμούς, ρίγος, κεφαλαλγία, διάρροια και έμετο (Sutherland, 1989).

Αν και οι έγκυες γυναίκες, κυρίως στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, μπορεί να εκδηλώσουν μόνο ήπια συμπτώματα που μοιάζουν με κοινό κρυολόγημα (πυρετό, μυαλγία, με ή χωρίς διάρροια), η μόλυνση με *L. monocytogenes* έχει σοβαρές επιπτώσεις για το έμβρυο, προκαλώντας πρόωρο τοκετό ή αποβολή. Σε νεογνά κάτω των 7 ημερών η μόλυνση εκδηλώνεται κυρίως ως σήψη και πνευμονία, ενώ σε μεγαλύτερης ηλικίας εκδηλώνεται κυρίως ως μηνιγγίτιδα και σήψη (Slutsker and Schuchat, 1999).

Υπάρχει και μια γαστρεντερική εκδήλωση που απαιτεί υψηλή δόση κυττάρων. Στην μορφή αυτή ο χρόνος επώασης είναι σημαντικά μικρότερος (20-27 ώρες) και τα κυριότερα συμπτώματα είναι πυρετός και διάρροια (Dalton et al., 1997).

vii) Πρόληψη

Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί στην εφαρμογή του συστήματος Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) στα εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων, στην αποφυγή κατανάλωσης τροφίμων που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό της *Listeria* από τις ευπαθείς ομάδες ανθρώπων, τη σωστή θερμική επεξεργασία των τροφίμων πριν την κατανάλωση τους.

Να αποφεύγεται η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων από απαστερίωτο γάλα, η κατανάλωση αυγών χωρίς κατάλληλη θερμική επεξεργασία καθώς και ατελώς ψημένου κρέατος, από άτομα υψηλού κινδύνου.

Τέλος, να αποφεύγεται η επαφή των μαγειρεμένων τροφίμων με νωπά προϊόντα, λόγω του κινδύνου της επιμόλυνσής τους.

viii) Νομοθεσία

Στην κοινοτική νομοθεσία για τα τρόφιμα, η *L. monocytogenes* συγκαταλέγεται μεταξύ των μικροβιολογικών κριτηρίων για ορισμένες κατηγορίες τροφίμων (Πίνακας 1). Συγκεκριμένα στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 (όπως τροποποιήθηκε και ισχύει) καθορίζονται τα μικροβιολογικά κριτήρια ασφάλειας των τροφίμων και τα μικροβιολογικά κριτήρια υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας. Τα τρόφιμα κατηγοριοποιούνται με βάση τον κίνδυνο ανάπτυξης της *L. monocytogenes*. Τα τρόφιμα υψηλού κινδύνου, δηλαδή τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξή της (με βάση ιδιότητες όπως pH, a_w και διάρκεια ζωής >5 μέρες) θα πρέπει να είναι αρνητικά για *L. monocytogenes* σε ένα δείγμα 25 g στο σημείο της αποδέσμευσης από τον παρασκευαστή, αλλά επιτρέπει να περιέχουν ως 100 cfu/g μέχρι το τέλος της διάρκειας ζωής του προϊόντος. Το όριο αυτό των 100cfu/gr ισχύει επίσης καθ' όλη τη διάρκεια ζωής των τροφίμων, που διατίθενται στην αγορά ως έτοιμα για κατανάλωση τρόφιμα (RTE), μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*.

Ο παραγωγός ενός τροφίμου πρέπει να αποφασίσει αν το τρόφιμο που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση είναι «έτοιμο για κατανάλωση ως έχει», χωρίς να χρειάζεται να μαγειρευτεί ή να υποστεί άλλη επεξεργασία αποτελεσματική για να εξαλείψει ή να μειώσει σε αποδεκτό επίπεδο τους επικίνδυνους μικροοργανισμούς προκειμένου να εξασφαλιστεί η ασφάλειά του και η συμμόρφωσή του προς τα μικροβιολογικά κριτήρια (Κοντοπούλου και συν., 2015).

Κατηγορία τροφίμων	Όρια	Τρόφιμα στα οποία εφαρμόζεται το κριτήριο
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση για βρέφη & για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	Να μην ανιχνεύεται σε 25 g	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Έτοιμα για κατανάλωση τρόφιμα διαφορετικά της	Να μην ανιχνεύεται σε 25 g	Πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου

κατηγορίας 1 ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της <i>L. monocytogenes</i> .	<100cfu/g	της επιχείρησης που το παρήγαγε Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια της διατήρησής τους
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά απο αυτά της κατηγορίας 1.	Να μην ανιχνεύεται σε 25 g	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια της διατήρησής τους

Πίνακας 1: Κριτήρια για τη *L. monocytogenes* ανάλογα με το τρόφιμο, όπως ορίζονται στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 (και στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1441/2007 που τον τροποποιεί).

2.4. Ζύμες

Οι ζυμομύκητες, γνωστοί και ως βλαστομύκητες, ζύμες ή μαγιά, είναι μονοκύτταροι οργανισμοί οι οποίοι ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί περίπου 1.500 είδη (Kurtzman et al, 2006; Hoffman et al, 2015). Υπολογίζεται ότι αποτελούν το 1% όλων των ειδών μυκήτων. Οι ζυμομύκητες είναι μονοκύτταροι οργανισμοί οι οποίοι εξελίχθηκαν από πολυκύτταρους μύκητες, με κάποια είδη να μπορούν να αναπτύξουν πολυκυττάρια μορφές με μορφή ίνας, αποτελούμενες από συνδεδεμένα κύτταρα, γνωστά ως ψευδοϋφές (Kurtzman, 2006). Το μέγεθος των ζυμομυκήτων είναι ποικίλο και εξαρτάται από το είδος και το περιβάλλον. Συνήθως έχουν διάμετρο 3-4 μm, αν και κάποια είδη φτάνουν τα 40 μm (Walker, Skelton and Smith, 2002). Οι περισσότεροι ζυμομύκητες αναπαράγονται με μίτωση, αν και πολλοί μπορούν με ασύμμετρο διαχωρισμό γνωστό και ως εκβλάστηση.

Με τη διαδικασία της ζύμωσης, ο ζυμομύκητας σακχαρομύκητας, γνωστός και ως μαγιά, μετατρέπει τους υδατάνθρακες σε διοξείδιο του άνθρακα και αλκοόλη. Για χιλιάδες χρόνια, το διοξείδιο του άνθρακα χρησιμοποιείται στην αρτοποιία και το αλκοόλ στα οινοπνευματώδη ποτά (Legras et al, 2007). Επίσης, αποτελεί σημαντικό οργανισμό μοντέλο στην σύγχρονη έρευνα στην κυτταρική βιολογία και συγκεκριμένα των ευκαρυωτικών οργανισμών (και εν τέλει της ανθρώπινης βιολογίας) και είναι ένας από τους καλύτερα μελετημένους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς (Ostergaard et al, 2000). Άλλοι είδη ζυμομυκήτων, όπως η *Candida albicans*, είναι ευκαιριακά παθογόνα και μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις στους ανθρώπους.

Οι μικροοργανισμοί αυτοί δεν έχουν μεγάλη σημασία στην παρασκευή των τυριών επειδή δεν αναπτύσσονται εύκολα και σε μεγάλο αριθμό. Ανεξάρτητα όμως αυτού, οι ζύμες μπορούν να προσβάλλουν τη λακτόζη και να παράγουν αλκοόλη και CO₂, όπως επίσης και να συμβάλλουν στην ωρίμανση του τυριού (Macedo et al. 1995). Η δράση αυτή ευρίσκει κυρίως εφαρμογή στην παρασκευή των αλκοολούχων όξινων παρασκευασμάτων Koumys,

Kerhyr κ.λπ. Ο μικρός τους πληθυσμός δείχνει τη μικρή συμβολή τους στην ωρίμανση του τυριού Μπάτζος (Mas et al., 2002). Ο μεγαλύτερος πληθυσμός τους στα τυριά που παρασκευάζονταν την άνοιξη και το καλοκαίρι είναι πιθανά ο λόγος την αύξησης του pH στα τυριά αυτά κατά τη διάρκεια της συντήρησης (Caridi et al., 2003).

Οι ζύμες έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 25 - 27°C και δεν επιβιώνουν κατά την παστερίωση του γάλακτος. Στα μαλακά τυριά οι ζύμες είναι υπεύθυνες για μερικές αλλοιώσεις (Γεωργάκης και συν, 2002), όπως:

- α) η πρόωμη διόγκωση, λόγω παραγωγής CO₂,
- β) ο ανώμαλος χρωματισμός από χρωμογόνες ζύμες (πχ *Rhodotorula rubra*, *Torula glutinis*, *Torula nigra*),
- γ) ο σχηματισμός βλεννώδους επιφάνειας και
- δ) η τάγιση.

2.5. Μύκητες

Οι μύκητες αποτελούν ένα από τα πέντε βασίλεια των έμβιων όντων, το οποίο περιλαμβάνει μονοκύτταρους ή πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι μύκητες εμφανίζουν τεράστια ποικιλία και υπάρχουν παντού. Οι περισσότεροι ανευρίσκονται στο έδαφος και τα φυτά και διατρέφονται από οργανικά συστατικά ζώντων ή νεκρών οργανισμών γι' αυτό και θεωρούνται το «βιολογικό εργαστήριο αποδόμησης των οργανικών ουσιών» (Whittaker et al, 1969).

Οι μύκητες διακρίνονται βασικά σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τους ζυμομύκητες και τους υφομύκητες. Οι ζυμομύκητες είναι σφαιρικοί ή ελλειψοειδείς σχηματισμοί που αναπαράγονται δια εκβλαστήσεων σε ειδικά θρεπτικά υλικά. Αντίθετα, οι υφομύκητες ή νηματοειδείς μύκητες, αποτελούνται από κυλινδρικούς σχηματισμούς, τις υφές, που μεγαλώνουν με διακλαδώσεις και επιμηκύνσεις σχηματίζοντας χνουδωτές αποικίες. Μια άλλη κατηγορία μυκήτων, οι καλούμενοι δίμορφοι μύκητες, αναπτύσσονται στον ξενιστή ως ζυμομύκητες, ενώ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος λαμβάνουν τη μορφή υφομυκήτων (Whittaker et al, 1969).

Οι μύκητες παρουσιάζουν ενδιαφέρον για την παρασκευή μερικών τυριών (μπλε τυριά, *Cammamber* κλπ), αλλά και για τις αλλοιώσεις που μπορούν να προκαλέσουν στο βούτυρο και σε μερικά είδη τυριών, επειδή προσβάλλουν την καζεΐνη και το λίπος. Επιπλέον, προκαλούν και αλλοιώσεις στο χρωματισμό των τυριών (πχ οι μύκητες *Monilia nigra*, *Oidium auranticum* κλπ). Άλλα συχνά εντοπιζόμενα είδη μυκήτων στα τρόφιμα είναι και οι: *Oidium*, *Penicillium*, *Mucor* (σκούρου χρώματος μύκητες), *Aspergillus* κλπ (Καμιναρίδης και συν, 2007).

Επιπλέον, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη Δημόσια Υγεία, λόγω των τοξινών που παράγουν. Συγκεκριμένα, η αφλατοξίνη AFM1 που βρίσκεται στο γάλα των

ζώων που διατρέφονται με σιτηρέσια που περιέχουν την αφλατοξίνη B1 (AFB1) βρίσκεται σε 2,5-3,3 φορές υψηλότερη συγκέντρωση στα μαλακά τυριά και 3,9-5,8 φορές υψηλότερη στα σκληρά τυριά από ότι στο γάλα από το οποίο παρασκευάστηκαν τα τυριά αυτά. Οι αφλατοξίνες AF (B1, B2, G1, G2) παράγονται από τους μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus* που αναπτύσσονται στο τυρί. Τέλος, να αναφέρουμε ότι η αφλατοξίνη B1 έχει τον υψηλότερο βαθμό τοξικότητας, ακολουθούμενη από τις αφλατοξίνες M1, G1, B2 και G2.

- Πρόληψη

Για την αποτροπή αναπτύξεως μυκήτων στους θαλάμους ωριμάνσεως των τυριών απαιτούνται:

α) Απολυμάνσεις,

β) Λάμπες με υπεριώδεις ακτίνες,

γ) Τήρηση κανόνων υγιεινής,

δ) Αυστηρός έλεγχος και συντήρηση των τυριών σε χαμηλές θερμοκρασίες, σε χαμηλή σχετική υγρασία και σε αναερόβιο περιβάλλον και

ε) Χρήση μυκητοστατικών (σορβικό οξύ και τα άλατά του).

Τέλος, για την αντιμετώπιση της παρουσίας αφλατοξινών στα γαλακτοκομικά προϊόντα θα πρέπει να αποφεύγεται η κατανάλωση από τα γαλακτοπαραγωγά ζώα σιτηρεσίων που έχουν μολυνθεί με μύκητες (που παράγουν αφλατοξίνες) (Καμιναρίδης και συν, 2007).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

3. Τυρί: Ορισμός, Τρόπος παρασκευής και παραγωγή - Ιστορική αναδρομή

Από αρχαιοτάτων χρόνων, το γάλα αποτελούσε εξαιρετική τροφή για τον άνθρωπο, αφού περιέχει ένα ευρύ φάσμα θρεπτικών ουσιών τα οποία λειτουργούν ως πηγές ενέργειας ή δομικά συστατικά για τον οργανισμό. Πρώτη μαρτυρία διατροφής με γάλα μηρυκαστικού είναι αυτή της ελληνικής μυθολογίας όταν ο Δίας κυνηγημένος από τον πατέρα του τρέφεται με γάλα από την κατσικά Αμάλθεια. Ο Μύθος λέει ότι όταν ο Δίας θέλοντας να χαρίσει την τέλεια αθανασία στον γιο του Ηρακλή, ζήτησε από την ΗΡΑ να τον θηλάσει. Η ζηλιάρα σύζυγος αρνήθηκε μια και ο Ηρακλής δεν ήταν δικό της παιδί. Τότε με διαταγή του Δία οι

ουρανοί άρχισαν να τρέχουν γάλα για να θηλάσει το παιδί. Από τότε έμειναν στον ουρανό οι «Γαλαξίες».

Εκτός, από το γάλα μεγάλης θρεπτικής αξίας τροφή για τον άνθρωπο αποτελεί και το τυρί, του οποίου η πρώτη του δημιουργία χρονολογείται περίπου 8.000 χρόνια πριν, στην εύφορη κοιλάδα μεταξύ του Τίγρη και του Ευφράτη. Πολλές εκδοχές έχουν αναφερθεί για τη δημιουργία του πρώτου τυριού, οι κυριότερες είναι δύο. Η πρώτη αναφέρει την τυχαία παρασκευή του τυριού, κατά τη μεταφορά γάλακτος μέσα σε ένα ασκό από στομάχι προβάτου, κατά τη διάρκεια ταξιδιού του στην έρημο. Ενώ, η άλλη αναφέρει ότι η πρώτη παρασκευή τυριού δεν ήταν τυχαία αλλά αποτέλεσμα προσπάθειας του ανθρώπου να ανακαλύψει τρόπους διατήρησης των συστατικών του γάλακτος, όπως η ξήρανσή του σε αβαθή πήλινα ή ξύλινα δοχεία στον ήλιο. Και στις δύο περιπτώσεις πάντως υπήρξε η δημιουργία πήγματος, είτε λόγω της δράσης των ενζύμων του στομάχου του προβάτου είτε λόγω της ανάπτυξης βακτηρίων (Ανυφαντάκης, 2004).

Από εκείνη την περίοδο μέχρι σήμερα, έχουν παρασκευαστεί πολλά είδη τυριών και με διαφορετικούς τρόπους. Το τυρί εξακολουθεί να αποτελεί ένα πολύ θρεπτικό προϊόν διατροφής το οποίο εφοδιάζει τον άνθρωπο με ενέργεια και με πολλά απαραίτητα δομικά συστατικά. Η κυριότερη πηγή ενεργείας του τυριού είναι η λακτόζη, η οποία διασπάται σε γλυκόζη και γαλακτόζη και εφοδιάζει τον οργανισμό με ενέργεια μέσα από τη διαδικασία της γλυκογονόλυσης. Επίσης, τα λιπαρά του τυριού αποτελούν σημαντική πηγή ενέργεια του οργανισμού, τα οποία όμως μπορεί έχουν και αρνητικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Τα λιπαρά οξέα του εκάστωτε τυριού μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα χοληστερίνης του αίματος του ανθρώπου, ανάλογα αν πρόκειται για κορεσμένα ή ακόρεστα λιπαρά οξέα. Ακόμη, βασικό δομικό συστατικό του οργανισμού αποτελούν οι πρωτεΐνες, οι οποίες υπάρχουν στα τυριά σε ποσοστά 10-35%. Τέλος, κάποια άλατα, όπως το ασβέστιο αποτελεί βασικό δομικό συστατικό των οστών, των δοντιών και η έλλειψή του μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η οστεοπόρωση, οστεομαλάκυνση κ.α. Σημαντικό ρόλο για τον οργανισμό παίζει και η ισορροπία μεταξύ αυτών των αλάτων, π.χ. ισορροπία μεταξύ αλάτων ασβεστίου και φωσφόρου (Ζώτου Α, 2009).

Το γάλα μπορεί να υποστεί διάφορες επεξεργασίες μέχρι να μετατραπεί σε τυρί και ανάλογα με την τεχνολογία παρασκευής προκύπτουν τυριά με διαφορετική σύσταση, εμφάνιση, γεύση και μικροβιακή χλωρίδα. Η μικροβιακή χλωρίδα του κάθε τυριού παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών αυτού, αφού αυτά καθορίζονται κυρίως από τα προϊόντα ζυμώσεων αυτής.

Στη συγκεκριμένη μελέτη θα εξετάσουμε τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά ενός τυριού, του τυριού «Ανεβατό». Το «Ανεβατό» είναι μαλακό λευκό τυρί, κοκκώδους υφής (Ζερφυρίδης, 2001) με υπόξινη ευχάριστη γεύση και άρωμα (ΚΤΠ, 2009), που παράγεται παραδοσιακά από γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγματα αυτών. Έχει μέγιστη υγρασία 60% κατά βάρος και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 45% κατά βάρος. Το παραδοσιακό αυτό τυρί έχει πολύ ευχάριστη γεύση, ειδικά εάν παρασκευαστεί από γίδινο γάλα (Catherine W. Donnelly, 2014).

3.1. Ανεβατό Π.Ο.Π.

Παραδοσιακά το Ανεβατό παράγονταν από Έλληνες ποιμένες με μεγάλα κοπάδια αιγοπροβάτων στις περιοχές της Δυτικής Μακεδονίας, οι οποίοι λάμβαναν το γάλα από τα ζώα το πρωί, πριν εκείνα ακόμα σιτιστούν, και προσθέτανε σε αυτό πυτιά. Κατά τη διάρκεια της ημέρας, το γάλα έπηξε και το πήγμα ανέβαινε προς την επιφάνεια (έτσι προέκυψε και η ονομασία του), και το απόγευμα, που επέστρεφαν με τα κοπάδια τους, ήταν έτοιμο για στράγγιση (Hatzikamari et al., 1999).

Στα σύγχρονα τυροκομεία, για την παραγωγή του τυριού Ανεβατό, το γάλα επωάζεται στους 18-22°C μέχρι η οξύτητα του φθάσει στους 35°D ή pH=6,2. Στη συνέχεια, μεταφέρεται σε ψυκτικούς χώρους θερμοκρασίας 2-4°C, όπου παραμένει για 24 ώρες. Ακολουθεί θέρμανση στους 12-14°C και προσθήκη λίγης πυτιάς ώστε να γίνει η πήξη σε 12 ώρες. Ακολουθεί διαίρεση του τυροπήγματος (2x2 cm), παραμονή στον τυρολέβητα για 12 ώρες, στράγγιση, επιφανειακή αλάτιση και ωρίμανση του τυριού, για 2 τουλάχιστον μήνες (Hatzikamari et al., 1999; Xanthopoulos et al., 2000).

3.2. Τεχνολογία Παρασκευής του τυριού

i) Πρώτες Ύλες

Τα συστατικά του γάλακτος, τα οποία βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία σε αυτό και ονομάζονται βασικά είναι το νερό, οι πρωτεΐνες (διακρίνονται σε δύο κατηγορίες τις καζεΐνες και τις πρωτεΐνες ορού), το λίπος, η λακτόζη και τα άλατα. Τα υπόλοιπα συστατικά του γάλακτος που απαντώνται σε πολύ μικρές ποσότητες σε αυτό είναι οι βιταμίνες, οι ορμόνες, οι αζωτούχες ουσίες μη πρωτεϊνικής φύσεως, οι αλδεϋδες, οι κετόνες, τα αλειφατικά οξέα, τα σωματικά κύτταρα και τα αέρια (Smit, 2003).

Νερό: Το νερό είναι το συστατικό του γάλακτος που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία σε αυτό. Η περιεκτικότητά του στα διάφορα είδη γάλακτος κυμαίνεται από 80-88%. Το νερό αποτελεί το μέσο στο οποίο υπάρχουν και τα υπόλοιπα συστατικά του γάλακτος είτε υπό τη μορφή μοριακού διαλύματος ή γαλακτώματος, είτε υπό κολλοειδή διασπορά. Το νερό στο γάλα απαντάται είτε ως ελεύθερο είτε ως δεσμευμένο (Smit, 2003).

Πρωτεΐνες: Οι πρωτεΐνες του γάλακτος παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον γιατί απαντούν σε υψηλή αναλογία σε αυτό, προσδιορίζουν σε μεγάλο βαθμό τις φυσικοχημικές του ιδιότητες, ιδιαίτερα αυτές που σχετίζονται με τη σταθερότητά του και έχουν υψηλή θρεπτική αξία. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες τις καζεΐνες και τις πρωτεΐνες ορού (Smit, 2003).

- **Καζεΐνες:** Οι καζεΐνες είναι το κλάσμα των πρωτεϊνών που καθιζάνει ύστερα από οξίνιση σε pH 4,6 και θερμοκρασία 20°C. Με βάση τη διάταξη των αμινοξέων στο μόριό τους διακρίνονται σε αs1-, αs2-, β-, και κ-καζεΐνες.

Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι οι καζεΐνες έχουν χαμηλά επίπεδα δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής. Το γεγονός αυτό τις κάνει σταθερές έναντι σε παράγοντες που προκαλούν μετουσίωση και ευάλωτες στην πρωτεόλυση κατά την ωρίμανση των τυριών.

- *Πρωτεΐνες ορού:* Οι κυριότερες πρωτεΐνες ορού είναι η οροαλβουμίνη, η α-γαλακταλβουμίνη, η β-γαλακτογλοβουλίνη και οι ανοσοσφαιρίνες. Οι πρωτεΐνες ορού σε αντίθεση με τις καζεΐνες έχουν υψηλά επίπεδα δευτεροταγούς, τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής. Είναι τυπικές σφαιρικές πρωτεΐνες και μετουσιώνονται με την επίδραση της θέρμανσης. Δεν περιέχουν φώσφορο στο μόριό τους και δεν είναι ευαίσθητες στην παρουσία ιόντων ασβεστίου.

Λίπος: Το λίπος στο γάλα βρίσκεται υπό τη μορφή λιποσφαιρίων, τα οποία περιβάλλονται από ένα λεπτό προστατευτικό στρώμα που ονομάζεται μεμβράνη. Ο ρόλος της μεμβράνης των λιποσφαιρίων είναι αφενός μεν να παρεμποδίζει τη συσσωμάτωσή τους – διατηρώντας το σφαιρικό τους σχήμα και επιτρέποντας τη διασπορά τους στο υδατικό περιβάλλον του γάλακτος – και αφετέρου να προστατεύει το λίπος από την αυτοοξειδωση και τη δράση των ενζύμων του γάλακτος (Μάντης,2005).

Λακτόζη: Είναι το κύριο σάκχαρο του γάλακτος, η παρουσία της είναι σημαντική γιατί αποτελεί πρωταρχικό παράγοντα στον έλεγχο των ζυμώσεων στα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα. Επίσης προσδίδει θρεπτική αξία στο γάλα, αποτελεί πηγή ενέργειας, πηγή γαλακτόζης, επηρεάζει τη διαλυτότητα των αποθηκευμένων γαλακτοκομικών προϊόντων και παίζει βασικό ρόλο στην εμφάνιση του χρώματος και της γεύσης στα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν δεχτεί υψηλή θερμική επεξεργασία (Μάντης, 2005).

Άλατα: Το γάλα περιέχει οργανικά και ανόργανα άλατα. Τα κύρια άλατα του γάλακτος είναι τα χλωριούχα, φωσφορικά, και κιτρικά άλατα ασβεστίου, μαγνησίου, καλίου και νατρίου. Τα άλατα απαντώνται στο γάλα σε διάφορες μορφές. Κάποια από αυτά βρίσκονται στη διαλυτή μορφή, άλλα είναι ενωμένα με διάφορα συστατικά και τα υπόλοιπα απαντώνται υπό τη μορφή ιόντων. Ο ρόλος των αλάτων του γάλακτος είναι σημαντικός. Συγκεκριμένα, το ασβέστιο και ο φώσφορος σταθεροποιούν την κολλοειδή κατάσταση της καζεΐνης στο γάλα. Τα ιόντα ασβεστίου επηρεάζουν το μέγεθος των καζεϊνικών μικκυλίων, αλλά και την πήξη του γάλακτος κατά την παρασκευή τυριών. Η αύξηση των χλωριόντων αποτελεί ένδειξη προσβολής των ζώων από μαστίτιδα, ενώ το κιτρικό οξύ χρησιμοποιείται από μικροοργανισμούς για την παραγωγή αρωματικών ουσιών (Smit, 2003).

ii) Πυτιά

Η συμβατική πυτιά, ή όπως αναφέρεται συχνά με τον γενικότερο όρο πυτιά (rennet), είναι προϊόν που λαμβάνεται από το τέταρτο τμήμα του στομάχου των μοσχαριών, το ήνυστρο, σαν εκχύλισμα και χρησιμοποιείται για την πήξη του γάλακτος με σκοπό την παρασκευή τυριών. Το ένζυμο που περιέχεται κατά κύριο λόγο στην πυτιά είναι η ρεννίνη ή

αλλιώς χυμοσίνη. Επιπλέον, στην τυτιά υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες και άλλα ένζυμα όπως πεψίνη, θρυψίνη και άλλες πεπτιδάσες (Ανυφαντάκης, 1993).

Η τυτιά κυκλοφορεί στο εμπόριο σε δύο μορφές: α) υγρή και β) σκόνη. Η πηκτική της δύναμη κυμαίνεται ανάλογα με τις συνθήκες και τη διάρκεια διατήρησης, καθώς και τη μορφή στην οποία διατίθεται. Συνήθως η υγρή έχει ισχύ 1:15.000, ενώ η σκόνη 1:100.000. Η υγρή τυτιά σε σύγκριση με τη σκόνη έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί εύκολα να μετρηθεί ποσοτικά, έχει όμως τα εξής μειονεκτήματα: α) χρειάζεται ψυγείο για τη διατήρησή της, β) χάνει σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι η σκόνη την πηκτική της δύναμη κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, γ) επιμολύνεται ευκολότερα από μικροοργανισμούς (Κεχαγιάς, 2011).

iii) Οξυγαλακτική Καλλιέργεια

Στην τυροκομία χρησιμοποιούνται καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων, οι οποίες προστίθενται στο γάλα μετά την παστερίωση του. Οι καλλιέργειες αυτές είναι αρχικά υπεύθυνες για τη ζύμωση της λακτόζης και το σχηματισμό γαλακτικού οξέος. Η μείωση του pH που λαμβάνει χώρα όχι μόνο παρεμποδίζει την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, αλλά διευκολύνει τη δράση της τυτιάς και τη στράγγιση και το σχηματισμό του τυροπήγματος. Επιπλέον, τα ένζυμα που απελευθερώνονται από τους μικροοργανισμούς της οξυγαλακτικής καλλιέργειας συμβάλουν σημαντικά στη χαρακτηριστική γεύση και οσμή των τελικών προϊόντων (Κεχαγιάς, 2011).

iv) Αλάτι

Το αλάτι δεν προσδίδει μόνο γεύση στο τυρί αλλά δρα και ως φυσικό συντηρητικό. Αναστέλλει την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων και επιβραδύνει την ανάπτυξη πολλών επιθυμητών μικροοργανισμών, ενώ ευνοεί άλλους για την ανάπτυξή τους, ρυθμίζοντας έτσι την συσχέτιση της πληθυσμιακής δύναμης των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών και κατ' επέκταση τη δραστηριότητά τους και τα γενικά βιολογικά φαινόμενα στο τυρί. Επίσης επηρεάζει τις φυσικοχημικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά την ωρίμανση των τυριών (Ζερφυρίδης, 2001).

3.3. Νομοθετικές Ρυθμίσεις

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, (Αποφ. 313060/18.1.94, ΦΕΚ 24/Β/18.1.94, άρθρο 1, παρ/φος 1 η ονομασία «ΑΝΕΒΑΤΟ» (ΑΝΕΒΑΤΟ) αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π) για το τυρί που παράγεται παραδοσιακά στο Νομό Γρεβενών και στην επαρχία Βοΐου Νομού Κοζάνης, από γάλα πρόβειο, γίδινο ή μίγματα αυτών. Το γάλα το οποίο χρησιμοποιείται για την παρασκευή του τυριού «ΑΝΕΒΑΤΟ» πρέπει να προέρχεται αποκλειστικά από αυτές τις περιοχές.

Επιπλέον, το γάλα το οποίο χρησιμοποιείται για παρασκευή τυριού «ΑΝΕΒΑΤΟ» πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις (άρθρο 2):

α) Να προέρχεται από φυλές αιγών και προβάτων παραδοσιακά εκτρεφόμενων και προσαρμοσμένων στην περιοχή παρασκευής του τυριού αυτού και η διατροφή τους πρέπει να βασίζεται στη χλωρίδα της ίδιας περιοχής.

β) Να προέρχεται από αμέλξεις, που γίνονται 10 ημέρες τουλάχιστον μετά τον τοκετό.

γ) Να είναι καλής ποιότητας, νωπό ή παστεριωμένο.

δ) Η πήξη του γάλακτος να γίνεται εντός 48 ωρών από την άμελξη και μέχρι τη πήξη να διατηρείται σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, σύμφωνα με τις κείμενες διατάξεις.

Ακόμη:

1. Απαγορεύεται η παρασκευή τυριού «ΑΝΕΒΑΤΟ» από άλλο είδος γάλακτος πλην των καθορισμένων στο άρθρο 1 της παρούσας. Στο προς τυροκόμηση για παρασκευή τυριού «ΑΝΕΒΑΤΟ» γάλα, απαγορεύεται η συμπύκνωση, η προσθήκη σκόνης ή συμπυκνώματος γάλακτος, πρωτεϊνών γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων, χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών.

2. Επιτρέπεται η προσθήκη παραδοσιακής πυτιάς ή άλλων ενζύμων με ανάλογη δράση, καθώς και καλλιιεργειών αβλαβών οξυγαλακτικών βακτηρίων σε περίπτωση παστερίωσης του γάλακτος.

3. Για τη παρασκευή του τυριού «ΑΝΕΒΑΤΟ», που περιγράφεται στο άρθρο 3, χρησιμοποιείται γάλα, το οποίο πρέπει να πληροί τις προϋποθέσεις του άρθρου 2 της παρούσας. Το γάλα που προορίζεται για τη παρασκευή τυριού «ΑΝΕΒΑΤΟ» τοποθετείται σε χώρο με θερμοκρασία 18-22°C μέχρις ότου αποκτήσει οξύτητα 35°D περίπου. Στη συνέχεια τοποθετείται σε ψυκτικούς θαλάμους θερμοκρασίας 2-4°C, όπου παραμένει για 24 ώρες. Κατόπιν θερμαίνεται στους 12-14°C και προστίθεται σ' αυτό ποσότητα πυτιάς επαρκής να προκαλέσει την πήξη σε 12 περίπου ώρες. Ακολουθεί διαίρεση, παραμονή του τυροπήγματος στον τυρολέβητα για περίπου 12 ώρες, στράγγιση, ξηρό επιφανειακό αλάτισμα και ωρίμανση του τυριού για δύο τουλάχιστον μήνες.

4. Η παρασκευή και ωρίμανση του τυριού «ΑΝΕΒΑΤΟ» γίνεται σε εγκαταστάσεις που βρίσκονται εντός της περιοχής που αναφέρεται στην παρ.1 του άρθρου 1 της παρούσας.

5. Απαγορεύεται η χρήση χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών στο τυρί και στην άλμη.

Βασικά χαρακτηριστικά

Τα βασικά χαρακτηριστικά του τυριού «ΑΝΕΒΑΤΟ» (ΑΝΕΒΑΤΟ) (ποιοτικά, οργανοληπτικά, κ.λπ.) όπως ορίζονται στο άρθρο 4 του ΚΤΠ, 94 είναι:

Χημική σύσταση

- Μέγιστη υγρασία : 60% κατά βάρος.
- Ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού: 45% κατά βάρος

Τύπος τυριού

- Μαλακό τυρί, κοκκώδους υφής.
- Βάρη: Διάφορα.

Μάζα τυριού

- Μαλακή.

Υφή

- Κοκκώδης.

Χρώμα

- Λευκό.

Άλλα κύρια χαρακτηριστικά: Μαλακό τυρί με υπόξινη ευχάριστη γεύση και άρωμα.

Οδηγίες για την επισήμανση του τυριού (άρθρο 5)

Στα μέσα συσκευασίας που περιέχουν τυρί «ΑΝΕΒΑΤΟ» αναγράφονται υποχρεωτικά οι ακόλουθες ενδείξεις:

- α) «ΑΝΕΒΑΤΟ» (ΑΝΕΒΑΤΟ)
- β) Προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π.)
- γ) Τυρί
- δ) Η επωνυμία και η έδρα του παραγωγού –συσκευαστή
- ε) Το βάρος του περιεχομένου
- στ) Η ημερομηνία παραγωγής
- ζ) Στοιχεία ελέγχου που αναλύονται ως εξής:

1. Τα τρία πρώτα γράμματα της ονομασίας προέλευσης: ANEB.

2. Ο αύξοντας αριθμός του μέσου συσκευασίας.

3. Η ημερομηνία παραγωγής . Παράδειγμα (ANEB- 1113-20/2/94).

Οι παραπάνω υποχρεωτικές ενδείξεις αναγράφονται τουλάχιστον στην ελληνική γλώσσα. Τα στοιχεία ελέγχου αναγράφονται με ευθύνη του συσκευαστή κατόπιν έγγραφης άδειας της αρμόδιας Διεύθυνσης Γεωργίας, η οποία τηρεί ειδικό βιβλίο παρακολούθησης και ελέγχου ανά παραγωγό τυριού «ΑΝΕΒΑΤΟ». Οι ενδείξεις α, β, γ, δ, ε, και στ αναγράφονται υποχρεωτικά σε κάθε συνοδευτικό έγγραφο κατά τη διακίνηση του τυριού «ΑΝΕΒΑΤΟ». Κατά τα λοιπά η αναγραφή των υποχρεωτικών ενδείξεων γίνεται σύμφωνα με τα καθοριζόμενα στην παρ.7 του άρθρου 4 του Π.Δ. 81/93.

Άλλες γενικές διατάξεις (άρθρο 6)

1. Για θέματα που δεν ρυθμίζονται με την παρούσα απόφαση έχουν εφαρμογή οι διατάξεις του Π.Δ. 81/93 καθώς και οι σχετικές εθνικές διατάξεις.

2. Απαγορεύεται η παραγωγή, εισαγωγή, εξαγωγή, διακίνηση και εμπορία τυριού με την ονομασία «ΑΝΕΒΑΤΟ» (ΑΝΕΒΑΤΟ) που δεν πληροί τις προϋποθέσεις της παρούσας.

5.4. Μικροβιολογική κατάσταση του τυριού - Σχετικές έρευνες

Μέχρι σήμερα το τυρί Ανεβατό πωλείται αποκλειστικά σε τοπικά μαγαζιά με γαλακτοκομικά προϊόντα. Ωστόσο, προσπάθειες γίνονται για την αύξηση της παραγωγής του έτσι ώστε να καλυφθούν οι ανάγκες του Έλληνα καταναλωτή αλλά και για την προώθηση του προϊόντος στην ξένη αγορά (Hatzikamari et al., 1999).

Οι έρευνες σχετικά με το τυρί Ανεβατό είναι πολύ λίγες και αναφέρονται στα μικροβιολογικά (Hatzikamari et al., 1999, Xanthopoulos et al., 2000, Ζώτου, 2009) οργανοληπτικά (Ζώτου, 2009), ρεολογικά (Ζάνδε και Μητρογιάννη, 2013) και χημικά του χαρακτηριστικά (Xanthopoulos et al., 2000).

Οι Xanthopoulos et al, (2000) μελέτησαν τα χαρακτηριστικά του τυριού “Ανεβατό”, που προέρχονταν από νωπό, παστεριωμένο και θερμικά επεξεργασμένο γάλα αιγών. Το γάλα (εκτός του νωπού), αμέσως μετά την παστερίωση, αναμιγνυόταν με αποβουτυρωμένο γάλα, που περιείχε συγκεκριμένα στελέχη του *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Παρατήρησαν ότι η θερμική επεξεργασία του γάλακτος είχε σημαντική επίδραση σε όλους τους μικροοργανισμούς. Δηλαδή, οι μικροοργανισμοί που βρίσκονταν στο πηγμένο γάλα, εκτός από τις ζύμες, ήταν λιγότεροι, τόσο στο παστεριωμένο γάλα, όσο και στο γάλα που είχε υποστεί ήπια θερμική επεξεργασία, σε σχέση με το νωπό. Η διαφορά αυτή παρατηρήθηκε και καθ’ όλη τη διάρκεια συντήρησης των τυριών. Αντίθετα, οι ζύμες αυξάνονταν κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Το κύριο πρόβλημα κατά την αποθήκευση του τυριού “Ανεβατό” προκαλούνταν από τις ζύμες, και αυτό γιατί το περιβάλλον του τυριού φαίνεται να δημιουργεί ευνοϊκές συνθήκες

για την ανάπτυξη των ζυμών. Οι ομάδες των ζυμών και των μυκήτων αποτελούν μικροοργανισμούς οι οποίοι αναπτύσσονται δευτερογενώς στο τυρί, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, όταν το pH είναι χαμηλό και τα βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε αυτό. Αποτελούν την κυριότερη επιμόλυνση των φρέσκων ιδίως τυριών και οι πληθυσμοί τους μπορούν να αυξηθούν ιδιαίτερα γρήγορα σε αυτά. (Fox et al., 2000). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι οι πληθυσμοί των κολοβακτηριδίων αυξήθηκαν σημαντικά μετά την προσθήκη άλατος, όμως τα επίπεδά τους ήταν αισθητά χαμηλότερα από αυτά που υπολογίστηκαν στο Ανεβατό που προέρχονταν από νωπό αίγαιο γάλα.

Οι μικροοργανισμοί (*Staphylococcus* και *Micrococcaceae*) ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα. Αυτοί οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν διαφορετικά στο κάθε είδος τυριού. Δηλαδή, στο τυρί που παρασκευάστηκε από νωπό γάλα, ο πληθυσμός τους μειώθηκε σταδιακά, ενώ στα άλλα δύο είδη τυριού βρέθηκε ότι οι πληθυσμοί αυτοί ήταν υψηλότεροι μετά από 30 ημέρες. Η OMX μειώθηκε σταδιακά κατά τη διάρκεια της συντήρησης των τυριών (30 ημέρες) και αυτό συσχετίστηκε με την εξέλιξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, δεδομένου ότι αυτοί οι μικροοργανισμοί ανήκουν στην “φυσιολογική” χλωρίδα του τυριού. Αυτό παρατηρήθηκε και στο τυρί που προερχόταν από νωπό γάλα.

Τέλος, να αναφέρουμε ότι δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στους πληθυσμούς των Gram-αρνητικών βακτηρίων, καθώς και ότι ο *Staphylococcus aureus* δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα τυριού.

Οι Hatzikamari et al. (1999), εξέτασαν τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του τυριού “Ανεβατό”, καθ’ όλη τη διάρκεια συντήρησής του (60 ημέρες) σε τρεις διαφορετικές περιόδους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όσα τυριά είχαν παρασκευαστεί τον Ιανουάριο, το Μάρτιο και τον Μάιο, είχαν υψηλούς μικροβιακούς πληθυσμούς. Συγκεκριμένα, η OMX καθώς και ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων αυξήθηκε σημαντικά στο πηγμένο γάλα (μετά την στράγγιση). Ακόμη παρατήρησαν ότι αυξήθηκαν και οι πληθυσμοί των Gram-αρνητικών, των εντερόκοκκων, των ψυχρότροφων και των πρωτεολυτικών βακτηρίων. Απ’ την άλλη, ο πληθυσμός των κολοβακτηριδίων μειώθηκε, λόγω της ανάπτυξης των οξυγαλακτικών και του χαμηλού pH, που έχει το τυρί. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσαν και τα τυριά που παρασκευάστηκαν το Μάρτιο και τον Μάιο. Παρατηρήθηκαν όμως μεγαλύτεροι πληθυσμοί οξυγαλακτικών, ψυχρότροφων και ζυμών (σε σχέση με το τυρί που παρασκευάστηκε τον Ιανουάριο). Είναι πιθανό, ότι η μεγαλύτερη οξύτητα των τυριών που παρασκευάστηκαν το Μάρτιο και τον Μάιο να επηρέασε την ανάπτυξη των ζυμών. Ακόμη, οι πληθυσμοί των κολοβακτηριδίων στο πηγμένο γάλα ήταν μικρότεροι (3 λογάριθμοι περίπου).

Ο πληθυσμός των Gram-αρνητικών βακτηρίων μειώθηκε κατά την συντήρηση στους 4°C. Στο τέλος της περιόδου συντήρησης (60 ημέρες), οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών ήταν υψηλοί. Οι εντερόκοκκοι ήταν επίσης παρόντες σε σχετικά υψηλά επίπεδα στα τυριά. Παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση στους πληθυσμούς των εντεροκόκκων μετά την αλάτιση, αλλά δεν υπήρξαν εποχιακές επιδράσεις. Επίσης, οι μικροοργανισμοί (*Staphylococcus* και *Micrococcaceae*) μειώνονταν σταδιακά κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι ρυθμός της ανάπτυξης των ζυμών ήταν μικρότερος στα τυριά που

παρασκευάστηκαν τον Ιανουάριο σε σχέση με αυτά που παρασκευάστηκαν το Μάιο και τον Μάρτιο.

Η Ζώτου (2009), μελέτησε έναν τύπο αλοιφώδους τυριού, που παρασκευάστηκε από αγελαδινό γάλα το οποίο είχε επεξεργαστεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Το γάλα που χρησιμοποιήθηκε για τυροκόμηση χωρίστηκε σε 3 είδη: α) σε Νωπό Γάλα, β) σε Παστεριωμένο Γάλα και γ) σε Μικροδιηθημένο Γάλα. Παρατήρησε έναν αρκετά μεγάλο πληθυσμό *E. coli* στο τυρί που παρασκευάστηκε από νωπό γάλα, της τάξεως του 10^5 - 10^6 c.f.u./gr ο οποίος έχει αυξηθεί σε σχέση με αυτόν που είχε το νωπό γάλα τυροκόμησης (10^4 c.f.u./gr). Επιπλέον, οι πληθυσμοί της *E. coli* στο τυρί από νωπό γάλα φαίνεται να ακολουθούν μια πορεία ανάπτυξης από την 1^η ως την 7^η μέρα και στη συνέχεια να μειώνονται οι πληθυσμοί τους. Αντιθέτως, στα τυριά που προήλθαν από παστεριωμένο και μικροδιηθημένο γάλα δεν παρατηρούνται πληθυσμοί *E. coli* κατά την 1^η και 7^η μέρα, αλλά εμφανίζονται τη 15^η μέρα, γεγονός που αποδίδεται στην επιμόλυνση του προϊόντος κατά τη συντήρησή του στο ψυγείο ή στην ανάπτυξη ορισμένων ψυχρόφιλων στελεχών που ανήκουν στο γένος *Coliforms* (έχει αναφερθεί ότι ένα ποσοστό 10-30% της συνολικής μικροβιακής χλωρίδας του νωπού γάλακτος που απομονώνονται στους 5-7 °C, ανήκει στο είδος *Coliforms* και πιο συγκεκριμένα στο *Aerobacter* spp). Σε άλλες μελέτες, έχει παρατηρηθεί ότι η θερμική επεξεργασία του γάλακτος αναστέλλει {καθώς επίσης και η προσθήκη εκκινήτριων καλλιιεργειών (starters), για την παρασκευή τυριού} την ανάπτυξη των Κολοβακτηριοειδών, ιδίως της *E. coli* (Dervisoglou and Aydemir, 2006).

Ακόμη, η Ζώτου (2009), παρατήρησε ότι ενώ οι πληθυσμοί των ζυμών και μυκήτων κατά την 1^η μέρα είναι περίπου ισοδύναμοι, κοντά στο 10^3 c.f.u./gr, στα τυριά που προήλθαν από Νωπό και Παστεριωμένο Γάλα στο τυρί που προήλθε από μικροδιηθημένο Γάλα είναι μηδενικοί. Όμως στο μικροδιηθημένο τυρί εμφανίστηκαν επιμολύνσεις ζυμών και μυκήτων από το περιβάλλον, κατά τη συντήρηση του προϊόντος στο ψυγείο. Οι πληθυσμοί των ζυμών και μυκήτων, λοιπόν, αυξήθηκαν κατά τη συντήρηση του τυριού το ψυγείο και κατά τη 15^η μέρα και στα 3 τυριά που παρασκευάστηκαν, έφτασαν σχεδόν στο ίδιο επίπεδο (10^5 c.f.u./gr). Και στην εργασία αυτή οι ομάδες των ζυμών και των μυκήτων αποτέλεσαν του κύριους μικροοργανισμούς αλλοίωσης, καθώς μπορούν να αναπτυχθούν σε χαμηλές τιμές pH και σε πολύ χαμηλές τιμές a_w και σχεδόν πάντα, όπως και στη συγκεκριμένη μελέτη, αναπτύσσονται στην επιφάνεια των τυριών, αφού έχουν άμεση ανάγκη από οξυγόνο (υποχρεωτικά αερόβιοι μικροοργανισμοί). Σε φρέσκο τυρί από νωπό αίγιο γάλα που παρασκευάζεται στην Τουρκία, έχουν αναφερθεί πληθυσμοί της τάξεως 10^3 c.f.u./gr κατά την πρώτη μέρα της παρασκευής του, οι οποίοι πολλαπλασιάζονται και κατά τη 15^η μέρα έχουν φτάσει στο επίπεδο του 10^5 c.f.u./gr (Kilic et al., 2004).

Η Ζώτου (2009), επίσης παρατήρησε ότι οι πληθυσμοί των Σταφυλοκόκκων θετικών στη πηκτάση είναι αρκετά αυξημένοι στο τυρί από το Νωπό γάλα (10^4 c.f.u./gr). Η ύπαρξη αυξημένων ποσοστών σταφυλοκόκκων δεν προκαλεί ιδιαίτερες αλλαγές στην εμφάνιση του τυριού (Farkye, 2002). Αντιθέτως, στα τυριά από παστεριωμένο γάλα δεν εντοπίστηκαν σταφυλόκοκκοι θετικών στην πηκτάση, καθ' όλη τη διάρκεια της συντηρησής τους, ενώ στα τυριά από μικροδιηθημένο γάλα παρατηρήθηκε η εμφάνιση ενός πληθυσμού σταφυλοκόκκων της τάξεως του 10^4 c.f.u./gr κατά τη 15^η μέρα της συντήρησης, οποίος

θεωρείται αποτέλεσμα επιμόλυνσης του προϊόντος κατά τη συντήρηση. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η ανάπτυξη των Σταφυλοκόκων θετικών στη πηκτάση (κυριότερος εκπρόσωπος των οποίων είναι ο *Staphylococcus aureus*), ακολουθεί μια αυξητική πορεία κατά την παρασκευή του γάλακτος, από 10^4 c.f.u./gr (στο γάλα) σε 10^7 c.f.u./gr (στο τυρί της 1^{ης} μέρας), και στη συνέχεια μια καθοδική πορεία, από 10^7 c.f.u./gr (1^η μέρα) σε 10^5 c.f.u./gr (15^η μέρα), η οποία μπορεί να σχετίζεται με την πτώση του pH, λόγω της δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Τέλος, σε όλα τα τυριά δεν ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί *Salmonella* και *Listeria*.

Οι Ζάνδε και Μητρογιάννη (2013), παρασκεύασαν τρία διαφορετικά δείγματα τυριών (πρόβειο, κατσικίσιο, μίγμα 50:50). Παρατήρησαν ότι το pH των δειγμάτων του τυριού “Ανεβατό” επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από το είδος του γάλακτος και από το χρόνο ωρίμανσης. Τις μικρότερες τιμές pH παρουσίασαν τα δείγματα που παρασκευάστηκαν με κατσικίσιο γάλα. Συγκεκριμένα, στο πρόβειο γάλα η τιμή του pH κυμάνθηκε από 4,40 την ημέρα 0, έως 4,46 μετά από 60 ημέρες ωρίμανσης, ενώ στο κατσικίσιο η τιμή του pH ήταν 4,40 την ημέρα 0 και 4,41 μετά από 60 ημέρες ωρίμανσης. Τέλος, στο τυρί που παρασκευάστηκε από μίγμα αυτών (μίγμα 50:50), η τιμή του pH κυμάνθηκε από 4,44 την ημέρα 0, έως 4,45 μετά από 60 ημέρες ωρίμανσης.

Επίσης, παρατήρησαν ότι το pH των δειγμάτων παρουσίασε μία απότομη μείωση από τις 0 έως τις 15 ημέρες, ενώ στη συνέχεια οι τιμές του εμφάνισαν μία συνεχή αύξηση μέχρι να φτάσουν περίπου την τιμή που είχαν στις 0 ημέρες. Η μείωση αυτή του pH των δειγμάτων του τυριού Ανεβατό κατά τις πρώτες ημέρες της ωρίμανσης τους μπορεί να αποδοθεί στη δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία παρήγαγαν γαλακτικό οξύ από τη ζύμωση μέρους της λακτόζης. Ωστόσο, καθώς προχωρούσε η ωρίμανση των δειγμάτων, η παραγωγή διαφόρων αλκαλικών ουσιών (αμμωνία, αλδεΐδες, κετόνες), η οποία λαμβάνει χώρα κατά την ωρίμανση των τυριών εξαιτίας της διάσπασης των συστατικών του γάλακτος (Κεχαγιάς, 2001), οδήγησε σε αύξηση των τιμών του pH.

Συμπεραίνουμε ότι, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την μικροβιολογική ποιότητα του τυριού “Ανεβατό” που παράγεται στη χώρα μας. Καθώς είναι ένα τυρί Π.Ο.Π που γίνεται προσπάθεια για την αύξηση της παραγωγής του στην Ελληνική αγορά αλλά και για την προώθηση του σε ξένες αγορές, έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον να μελετηθεί η μικροβιολογική ποιότητα του τυριού τόσο αμέσως μετά την παραγωγή του όσο και κατά τη διακίνηση του στη λιανική πώληση.

2^ο ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4^ο:

4. Υλικά και μέθοδοι

4.1. Συλλογή δειγμάτων

Εξετάστηκαν 40 δείγματα τυριού «Ανεβατό», εκ των οποίων τα 20 λήφθηκαν από παραγωγούς της Θεσσαλίας και τα υπόλοιπα 20 από τα ράφια των σούπερ-μάρκετ. Το κάθε δείγμα (βάρους περίπου 120 γραμμαρίων) τοποθετούνταν σε πλαστικά δοχεία, τα οποία προορίζονται για τον σκοπό αυτό και μεταφέρονταν σε ισοθερμικό δοχείο υπό συνθήκες ψύξης (4°C) στο εργαστήριο Υγιεινής & Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και εξετάζονταν άμεσα. Στα δείγματα έγινε μικροβιολογικός έλεγχος, καθώς και μέτρηση της τιμής του pH.

4.2. Μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων

i) Καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 4833

Ποσότητα 25 γραμμαρίων από κάθε δείγμα τυριού, τοποθετούνταν σε σακούλα stomacher που περιείχε 225 ml Buffer Peptone Water και ομογενοποιούνταν για 1 min σε συσκευή stomacher. Πραγματοποιήθηκαν οι περαιτέρω δεκαδικές αραιώσεις σε MRD. 1 ml από κάθε αραιώση ενοφθαλμιζόνταν σε διπλή σειρά τρυβλίων (10^{-5} , 10^{-6}). Στη συνέχεια γινόταν η προσθήκη 15-20ml θερμοστατημένου θρεπτικού υλικού PCA agar. Τα τρυβλία τοποθετούνταν για επώαση στους 30°C για 72h σε αερόβιες συνθήκες.

Μετά την επώαση καταμετρούνταν όλες οι ορατές αποικίες με τη βοήθεια μετρητή αποικιών και το αποτέλεσμα εκφράζονταν σε αριθμό μικροοργανισμών/gr τυριού.

ii) Καταμέτρηση των Εντεροβακτηριοειδών σύμφωνα με τη μέθοδο BS 5763 Part:10 1993, ISO 7402:1993

Για κάθε δείγμα τυριού γινόταν αραιώση 1/10 τοποθετώντας σε σακούλα stomacher 25g τυριού και 225 ml Buffer Peptone Water. Ακολουθούσε ομογενοποίηση στη συσκευή stomacher για 1 min. Στη συνέχεια γίνονταν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε MRD. Από κάθε αραιώση, ενοφθαλμιζόταν 1 ml σε τρυβλία (10^{-1}). Στη συνέχεια γινόταν η προσθήκη 15-20ml θερμοστατημένου θρεπτικού υλικού TBX agar. Τα τρυβλία επώάζονταν στους 37°C για 4h και στους 44°C για 20h σε αερόβιες συνθήκες.

Καταμετρούνταν οι τυπικές πράσινες / μπλε-πράσινες αποικίες και γινόταν επιβεβαίωση με επιβεβαιωτικές δοκιμές σε τουλάχιστον 5 «ύποπτες» αποικίες.

iii) Καταμέτρηση του *Staphylococcus aureus*, σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 6889, 1:1999/A1:2004

Για κάθε δείγμα τυριού γινόταν αραιώση 1/10 τοποθετώντας σε σακούλα stomacher 25g τυριού και 225 ml Buffer Peptone Water. Ακολουθούσε ομογενοποίηση των υλικών στη συσκευή stomacher για 1 min. Στη συνέχεια γίνονταν οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε MRD. Από κάθε αραιώση ενοφθαλμιζονταν 0,1 ml σε εκλεκτικό υπόστρωμα Baird Parker με Egg Yolk tellurite emulsion 20%. Ακολουθούσε επώαση των τρυβλίων στους 37 °C±1°C για 44±4 hr σε αερόβιες συνθήκες.

Σε θετικό αποτέλεσμα εμφανίζονταν μαύρες αποικίες οι οποίες καταμετρούνταν και γινόταν επιβεβαίωση με τη χρήση MALDI-TOFF.

iv) Ανίχνευση και καταμέτρηση της *Listeria monocytogenes*, σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 11290-2

Για κάθε δείγμα τυριού γινόταν αραιώση 1/10 τοποθετώντας σε σακούλα stomacher 25g τυριού και 225 ml Half Fraser. Ακολουθούσε ομογενοποίηση των υλικών στη συσκευή stomacher για 1 min. Στη συνέχεια το υλικό παρέμενε στους 20°C±2°C για 2 ημέρες, για επώαση. Ακολούθως γίνονταν οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε MRD (10⁻¹). Στη συνέχεια κάθε δείγμα ενοφθαλμιζονταν σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα ALOA και OXFORD. Ακολουθούσε η επώαση των τρυβλίων σε αερόβιες συνθήκες στους 37 °C±1°C για 24± h. Επιπλέον, γινόταν επίσης μεταφορά ομοιογενοποιημένου υλικού από το Half Fraser σε Full Fraser, και η επώασή του στους 37 °C±1°C για 1 ημέρα. Ομοίως, το υλικό αυτό ενοφθαλμιζονταν σε θρεπτικά υποστρώματα ALOA και OXFORD.

Σε θετικό αποτέλεσμα εμφανίζονταν χαρακτηριστικές πράσινες αποικίες με άλω (στο ALOA) και οι μαύρες αποικίες (στο OXFORD).

v) Ανίχνευση της *Salmonella* spp, σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 6579:2002

Για κάθε δείγμα τυριού γίνονταν αραιώση 1/10 τοποθετώντας σε σακούλα stomacher 25g τυριού και 225 ml Buffer Peptone Water. Ακολουθούσε ομογενοποίηση στη συσκευή stomacher για 1 min και επωάζεται στους 37±1 °C για 18±2 h σε αερόβιες συνθήκες. Έπειτα, από τις σακούλες stomacher τοποθετούνταν 0,1 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 ml Rappaport Vasiliadis Broth που επωάζονται στους 41,5±1°C για 24±3h και 1ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10ml Mueller Kauffman Tetra Thionate Broth που επωάζονταν στους 37±1°C για 24±3h. Στη συνέχεια με τη χρήση κρίκου 10ml γινόταν επίστρωση από κάθε εκλεκτικό ζωμό στα εκλεκτικά υποστρώματα Xylose lysine deoxycholate (XLD) Agar και Brilliant Green Agar (BGA) και ακολουθούσε επώαση στους 37±1°C για 24±3h.

Σε θετικό αποτέλεσμα θα εμφανίζονταν μαύρες τυπικές αποικίες στο XLD και κόκκινες στο BGA.

vi) Ανίχνευση των ζυμών και των μυκήτων, σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 21527-1:2008

Για κάθε δείγμα τυριού γινόταν αραιώση 1/10 τοποθετώντας σε σακούλα stomacher 25g τυριού και 225 ml Buffer Peptone Water. Ακολουθούσε ομογενοποίηση των υλικών στη συσκευή stomacher για 1 min. Στη συνέχεια γίνονταν οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε MRD (10^{-5} , 10^{-6}). Στη συνέχεια, από κάθε αραιώση ενοφθαλμιζόνταν σε θρεπτικό υπόστρωμα NA (Nutrient agar) και ακολουθούσε επώαση των τρυβλίων για 1 εβδομάδα.

Μετά την επώαση καταμετρούνταν όλες οι ορατές αποικίες με τη βοήθεια μετρητή αποικιών και η επιβεβαίωση γινόταν με τη χρήση MALDI-TOFF.

4.3. Ταυτοποίηση μικροοργανισμών

Η ταυτοποίηση των απομονωθέντων μικροοργανισμών έγινε στο εργαστήριο Υγιεινής & Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τη μέθοδο φασματομετρίας μάζων matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight MALDI-TOF MS. Η φασματομετρία μάζας είναι μια διαγνωστική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους και της δομής των οργανικών ενώσεων. Ο όρος MALDI αναφέρεται στη διαδικασία με την οποία παράγονται τα ιόντα και ο όρος TOF αναφέρεται στον αναλυτή της μεθόδου (time of flight, αναλυτής χρόνου-πτήσης) (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

Βασική αρχή της μεθόδου είναι η μέτρηση της μάζας –για την ακρίβεια η μέτρηση του λόγου μάζας προς φορτίο, mass-to-charge ratio, m/z – μορίων που έχουν μετατραπεί σε θετικά ή αρνητικά φορτισμένα ιόντα. Ως μονάδα μέτρησης μάζας (m) χρησιμοποιείται το Dalton ($m=Da$), που ισούται με το 1/12 της μάζας του ατόμου ^{12}C , ενώ ως μονάδα μέτρησης φορτίου (z) χρησιμοποιείται το θεμελιώδες φορτίο ενός ηλεκτρονίου ($z=e^-$), ώστε ο λόγος μάζας προς φορτίο (m/z) να αντιστοιχεί σε Daltons/θεμελιώδες φορτίο. Είναι ευνόητο ότι στις περιπτώσεις που τα ανιχνευόμενα ιόντα έχουν φορτίο $z=1$, ο λόγος m/z ισούται με το μοριακό βάρος σε Daltons (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

Η προετοιμασία του προς εξέταση δείγματος βασίζεται στην ανάμειξή του με ένα χημικό υπόστρωμα (μήτρα, matrix), που είναι ήδη διαλυμένο σε κατάλληλο διαλύτη, και την τοποθέτηση του μείγματος σε ειδική πλάκα από ανοξείδωτο ατσάλι (target plate), ώστε αυτό να περιέλθει σε ξηρή μορφή. Ο διαλύτης του χημικού υποστρώματος πρέπει να είναι συμβατός με την προς εξέταση ουσία, ώστε να προλαμβάνεται η συσσώρευσή της και να προάγεται η δημιουργία ομογενούς κρυστάλλου με ομοιόμορφη διασπορά μεταξύ των μορίων της ουσίας και του χημικού υποστρώματος. Με την εφαρμογή του παλμικού Laser (nitrogen Laser, μήκος κύματος 337 nm, διάρκεια παλμού 1–5 ns) προκαλείται μερική ατμοποίηση του υποστρώματος κατά ώσεις, με επακόλουθη μεταφορά ιονισμένων μορίων του δείγματος στην αέρια φάση (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

Το κατάλληλο υπόστρωμα έχει τις εξής ιδιότητες: (α) είναι χημικά σταθερό στις συνθήκες υψηλού κενού που λειτουργεί ο φασματογράφος μάζας, (β) απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία στο μήκος κύματος λειτουργίας του Laser και εξατμίζεται, συμπαρασύροντας γειτονικά μόρια της ουσίας στην αέρια φάση, (γ) περιορίζει σημαντικά τη χημική αποδόμηση (fragmentation) της προς εξέταση ουσίας καθώς απορροφά το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας της προσπίπτουσας ακτίνας Laser και (δ) συνεισφέρει στον ιονισμό της εξεταζόμενης ουσίας. Τα συνηθέστερα χημικά υποστρώματα είναι τα εξής: sinapinic acid

(SA), alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid(CHCA) και 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

Στη διαδικασία της μεθόδου, το μείγμα δείγματος-υποστρώματος τοποθετείται σε ειδική πλάκα-στόχο (targetplate) και εισάγεται στην περιοχή ιονισμού σε συνθήκες υψηλού κενού αερίων. Η εφαρμογή κενού είναι απαραίτητη σε όλη τη διάρκεια της εξέτασης, ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα συγκρούσεων μεταξύ ιονισμένων μορίων του εξεταζόμενου δείγματος και μορίων αέρα. Επίσης, η απουσία αέρα αποτρέπει την εκφόρτιση των υψηλών δυναμικών που χρησιμοποιούνται για την επιτάχυνση και τη μεταφορά των ιόντων στη θέση ανίχνευσης, καθώς επίσης περιορίζει την πιθανότητα επιμόλυνσης ή ανάμειξης διαδοχικών δειγμάτων. Η παλμική μορφή της προσπίπτουσας ενέργειας προκαλεί ιονισμό κατά κύματα και τα παραγόμενα ιόντα αφού επιταχυνθούν με τη **βοήθεια** ηλεκτρικού πεδίου οδηγούνται στο φίλτρο μαζών (αναλυτής χρόνου-πτήσης, time of flight analyzer, TOF-analyzer). Ο αναλυτής TOF διαχωρίζει τα ιόντα με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (mass-to-charge ratio, m/z), υπολογίζοντας το χρόνο που χρειάζεται για να διανύσουν τη διαδρομή εντός σωλήνα ορισμένου μήκους σε απουσία ηλεκτρικού πεδίου (περιοχή μετατόπισης, driftregion) κινούμενα ευθύγραμμα και ομαλά μετά από την αρχική επιτάχυνσή τους και εστιάζει τις δέσμες ιόντων στον ανιχνευτή (detector). Εκτός από σταθερές παραμέτρους, ο χρόνος αυτός εξαρτάται από το λόγο μάζα/φορτίο του ανιχνευόμενου ιόντος και ως εκ τούτου επιτυγχάνεται γρήγορα και ικανοποιητικά η διάκριση των ιόντων ανάλογα της μάζας τους σε ένα θεωρητικά απεριόριστο εύρος m/z τιμών (γραμμική λειτουργία αναλυτή χρόνου- πτήσης, Linear TOF) (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

Τα ιόντα, τελικά, καταλήγουν στον ανιχνευτή, αφού διαχωριστούν σε ομάδες ίδιου λόγου m/z . Ο ανιχνευτής του φασματογράφου μάζας MALDI-TOF-MS είναι μια πλάκα μικροδιαόδων (microchannelplate) και αποτελείται από μια συστοιχία γυάλινων τριχοειδών σωλήνων, τα οποία είναι επιστρωμένα με κατάλληλο υλικό. Κατά την πρόπτωση των ιόντων και, ανάλογα με τον αριθμό τους και την κινητική τους κατάσταση, προκαλείται εκπομπή ηλεκτρονίων από τον ανιχνευτή, επομένως παράγεται ηλεκτρικό ρεύμα, το οποίο, στη συνέχεια, ενισχύεται και παρουσιάζεται τελικά ως φάσμα μάζας (mass spectrum). Όπως είναι φυσικό, η ακρίβεια μέτρησης του ιοντικού ρεύματος εξαρτάται από τον αριθμό των ιόντων που προσπίπτουν στον ανιχνευτή. Για να αυξηθεί ο λόγος σήματος προς θόρυβο (signal-to-noise ratio, SNR) για το παραγόμενο φάσμα, προηγουμένως το δείγμα σαρώνεται πολλές φορές και υπολογίζεται η μέση τιμή των παραγομένων φασμάτων (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

Η καταγραφή και η παρουσίαση του φάσματος μαζών είναι το τελικό στάδιο της τεχνικής. Ο φασματογράφος μάζας είναι εφοδιασμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή και η καταγραφή γίνεται ηλεκτρονικά όπου προκύπτουν κορυφές μικρού εύρους, διαφορετικής σχετικής θέσης και ύψους. Το ύψος της κάθε κορυφής είναι ανάλογο με τη σχετική αφθονία (relative intensity) του ιόντος που αντιπροσωπεύει, ενώ η σχετική θέση στον οριζόντιο άξονα αντιπροσωπεύει τελικά το ζητούμενο λόγο μάζας προς φορτίο του εξεταζόμενου ιόντος. Το πιο άφθονο ιόν χαρακτηρίζεται ως βασική κορυφή του φάσματος και σημειώνεται στον κάθετο άξονα με σχετική αφθονία 100%, ενώ οι άλλες κορυφές λαμβάνουν τιμές ανάλογα με το σχετικό ως προς τη βασική κορυφή ύψος τους. Συνεπώς, η διαδικασία ανίχνευσης μιας ουσίας μέσω του MALDI-TOF-MS χαρακτηρίζεται από την παραγωγή και την αξιόπιστη καταγραφή ενός συγκεκριμένου φάσματος ιόντων, το οποίο συγκρινόμενο με διαθέσιμες ευρείες βάσεις δεδομένων οδηγεί τελικά στην ταυτοποίηση της ουσίας αυτής (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

Πλεονέκτημα του MALDI-TOF-MS είναι η ικανότητά του να ταυτοποιεί με υψηλή ευαισθησία δείγματα μικροοργανισμών (Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια, κυανοβακτήρια, μύκητες και πρωτόζωα) σε ανέπαφη κυτταρική μορφή, μειώνοντας επίσης σημαντικά το χρόνο παρασκευής του δείγματος. Τα μόρια, τα οποία ανιχνεύει είναι κυρίως επιφανειακές και ριβοσωμικές πρωτεΐνες του βακτηρίου. Σε ό,τι αφορά το ρόλο του χημικού υποστρώματος στη διάκριση μεταξύ Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων, υπάρχουν δύο διαφορετικές βασικές θεωρήσεις (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

Η πρώτη υιοθετεί τη χρήση διαφορετικού χημικού υποστρώματος για τα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά. Η δεύτερη θεώρηση υιοθετεί τη χρήση του ίδιου χημικού υποστρώματος για Gram-θετικά και αρνητικά βακτήρια, αφού στηρίζει την αξιολόγηση των λαμβανομένων φασμάτων στις υψηλές σαφείς κυματομορφές των εν αφθονία υπάρχουσών και ιονιζόμενων ριβοσωμικών πρωτεϊνών, που τελικά ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για τα λαμβανόμενα σήματα, και όχι σε φάσματα που προέρχονται από τον ιονισμό των πρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

4.4. Φυσικοχημικός έλεγχος

Κάθε δείγμα εξετάζονταν κατά την προσκόμιση του στο εργαστήριο για τον προσδιορισμό του συντελεστή ενεργού νερού (a_w) και του pH. Η μέτρηση της τιμής του pH στα δείγματα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Tsiraki and Savvaidis (2014). Η μέτρηση έγινε με ψηφιακό pH-μετρο (Consort C860) με γυάλινο ηλεκτρόδιο μετά από αραιώση (1/10) και ομογενοποίηση του δείγματος του τυριού (25 g) με απεσταγμένο νερό (225 ml). Πραγματοποιούνταν δύο μετρήσεις και καταγράφηκε ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων.

4.5 Στατιστική επεξεργασία

Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης στο γενικό γραμμικό μοντέλο με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 10.05 (SPSS Ltd., Woking, UK). Για τον έλεγχο των στατιστικών διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών όλων των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο:

5. Αποτελέσματα και Συζήτηση

5.1. Φυσικοχημικός έλεγχος

Ο συντελεστής ενεργού νερού (a_w) στα 40 δείγματα τυριού που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη βρέθηκε να κυμαίνεται από 0,84 έως 0,93 με μέσο όρο $0,892 \pm 0,04$.

Στα ίδια 40 δείγματα ανεβατού, τα αποτελέσματα της μέτρησης της τιμής pH ήταν $4,37 \pm 0,073$. Ανάλογη τιμή pH ($4,40 \pm 0,1$) σε δείγματα τυριού ανεβατό αναφέρεται από τους Xanthopoulos et al. 2000. Ομοίως, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Hatzikamari et al. 1999, η τιμή του pH στα δείγματα ανεβατού μετά από 2 μήνες ωρίμανση στους $4\text{ }^\circ\text{C}$ ήταν $4,28 \pm 0,07$.

5.2. Μικροβιολογική εξέταση

Τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής εξέτασης των δειγμάτων τυριού τόσο από τους παραγωγούς όσο και από σημεία λιανικής πώλησης παρουσιάζονται στους πίνακες 1 έως 4.

Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (O.M.X.)

Η μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων ανεβατού έδειξε ότι οι πληθυσμοί για την O.M.X. ήταν $7,18 \pm 0,46 \log \text{ cfu/g}$ (Πίνακας 1). Σε σχέση με την προέλευση των δειγμάτων, στα δείγματα του ανεβατού που λήφθηκαν απευθείας από τους παραγωγούς και στα δείγματα που συλλέχθηκαν από σημεία λιανικής πώλησης οι πληθυσμοί της O.M.X. ήταν $6,95 \pm 0,45$ και $7,41 \pm 0,33 \log \text{ cfu/g}$ αντίστοιχα, χωρίς όμως να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P > 0,05$) μεταξύ τους.

Ανάλογα αποτελέσματα με την παρούσα έρευνα αναφέρονται για το τυρί ανεβατό από τους Xanthopoulos et al. (2000), οι οποίοι σε δείγματα που εξέτασαν, βρήκαν ότι οι πληθυσμοί της O.M.X. κυμαίνονταν από 6,63 έως $7,61 \log \text{ cfu/g}$.

Οι Hatzikamari et al. (1999) αναφέρουν υψηλότερους πληθυσμούς Ο.Μ.Χ. σε σχέση με την παρούσα μελέτη σε δείγματα ανεβατού, οι οποίοι κυμαίνονταν από 8,57 έως 9,26 log cfu/g.

Πίνακας 1. Πληθυσμοί της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (Ο.Μ.Χ.) σε δείγματα τυριού ανεβατό από παραγωγούς και από σημεία λιανικής πώλησης στη Θεσσαλία

Προέλευση δείγματος	Αριθμός δειγμάτων	Μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (log cfu/g)
Παραγωγοί	20	6,95 \pm 0,45
Λιανική Πώληση	20	7,41 \pm 0,33
Σύνολο	40	7,18 \pm 0,46

Salmonella spp., Listeria monocytogenes και Staphylococcus aureus

Τα δείγματα του ανεβατού που συλλέχθηκαν τόσο από τους παραγωγούς, όσο και από τα σημεία λιανικής πώλησης στην περιοχή της Θεσσαλίας εξετάστηκαν για την παρουσία των παθογόνων *Salmonella spp*, *L. monocytogenes* και *S. aureus*. Όλα τα δείγματα βρέθηκαν αρνητικά στην παρουσία των παθογόνων αυτών μικροοργανισμών (Πίνακας 2).

Η απουσία του *S. aureus* είναι εξαιρετική σημαντική, αφού είναι γνωστό ότι η σταφυλοκοκκική τοξίνωση θεωρείται το συχνότερο αίτιο τροφικής δηλητηρίασης από τυριά στη χώρα μας (Μάντης και συν., 2015).

Επίσης, σε πρόσφατη ανασκόπηση των τροφιμογενών λοιμώξεων και τοξινώσεων από κατανάλωση τυριών στις Η.Π.Α. τα συχνότερα αίτια αυτών των περιστατικών ήταν οι σαλμονέλλες και η *L. monocytogenes* (Gould et al. 2014).

Η μη απομόνωση των παθογόνων μικροοργανισμών *Salmonella spp*, *L. monocytogenes* και *S. aureus* στα δείγματα ανεβατού δείχνει τη σημασία της εφαρμογής σωστών συνθηκών υγιεινής κατά την παραγωγή, διακίνηση και διάθεση του προϊόντος.

Πίνακας 2. Παρουσία των παθογόνων *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* και *S. aureus* σε δείγματα τυριού ανεβατό από παραγωγούς και από σημεία λιανικής πώλησης στη Θεσσαλία

Είδος παθογόνου	Αριθμός δειγμάτων	Δείγματα θετικά στην παρουσία (%)
<i>Salmonella spp</i>	40	0 (0%)
<i>Listeria spp</i>	40	0 (0%)
<i>S. aureus</i>	40	0 (0%)

Σε 5 από τα 40 δείγματα ανεβατού ταυτοποιήθηκε *Hafnia alvei* (12,5%). Η *H. alvei* είναι ένα Gram – βακτήριο, το οποίο έχει απομονωθεί από ανθρώπινα δείγματα και κυρίως από το αναπνευστικό, το γαστρεντερικό και το ουρογεννητικό σύστημα . Έχει απομονωθεί τόσο από ενδονοσοκομειακές όσο και άλλες λοιμώξεις, ενώ αναφέρεται ότι μπορεί να προκαλέσει γαστρεντερίτιδα, μηνιγγίτιδα, πνευμονία, ενδοφθαλμίτιδα και ενδονοσοκομειακές μολύνσεις τραυμάτων (Günthard and Pennekamp, 1996).

Enterobacteriaceae

Η μικροβιολογική ανάλυση των 40 δειγμάτων ανεβατού για τους πληθυσμούς των *Enterobacteriaceae* έδειξε την παρουσία τους μόλις σε 5 από τα 40 δείγματα που εξετάστηκαν (12,5%) (Πίνακας 3). Στα 5 δείγματα αυτά οι πληθυσμοί των *Enterobacteriaceae* βρέθηκαν να είναι $> 10^2$ cfu/g και προέρχονταν όλα από σημεία λιανικής πώλησης και μπορεί να οφείλεται σε λανθασμένες συνθήκες συντήρησης των προϊόντων στους χώρους αυτούς.

Οι Hatzikamari et al. (1999) σε μελέτη που πραγματοποίησαν σε τυρί ανεβατό αναφέρουν ότι οι πληθυσμοί για τα εντεροβακτηριοειδή επηρεάζονταν ανάλογα με την εποχή συλλογής του γάλακτος και παραγωγής του τυριού. Έτσι, στα δείγματα του τυριού που παράχθηκαν το Μάιο οι πληθυσμοί των *Enterobacteriaceae* βρέθηκαν να είναι χαμηλότεροι από το όριο ανίχνευσης ($<1 \log$ cfu/g) μετά από 60 ημέρες ωρίμανση στους 4 °C, σε συμφωνία με τους αντίστοιχους χαμηλούς πληθυσμούς που καταγράφηκαν στην παρούσα έρευνα. Χαμηλοί πληθυσμοί *Enterobacteriaceae* βρέθηκαν στα δείγματα ανεβατού που παράχθηκαν το Μάρτιο $1,16 \log$ cfu/g, στο τέλος της ωρίμανσης για 2 μήνες στους 4 °C. Οι πληθυσμοί αυτοί παρουσίασαν σημαντική πτώση από τους πληθυσμούς ($6,45 \log$ cfu/g), οι

οποίοι βρέθηκαν κατά τα αρχικά στάδια παρασκευής του τυριού. Οι χαμηλοί πληθυσμοί των *Enterobacteriaceae* που βρέθηκαν στο τέλος της ωρίμανσης αποδίδονται στο χαμηλό pH του τελικού προϊόντος, καθώς και στην υψηλότερη περιεκτικότητα σε NaCl (>2%).

Πίνακας 3. Πληθυσμοί των *Enterobacteriaceae* σε δείγματα τυριού ανεβατό από παραγωγούς και από σημεία λιανικής πώλησης στη Θεσσαλία

Προέλευση δείγματος	Αριθμός δειγμάτων	Πληθυσμοί <i>Enterobacteriaceae</i> (cfu/g)	
		<10 ² (%)	>10 ² (%)
Παραγωγοί	20	20 (100%)	0 (0%)
Λιανική Πώληση	20	15 (75%)	5 (25%)
Σύνολο	40	35 (87,5%)	5 (12,5%)

Ζύμες-Μύκητες

Η εξέταση των δειγμάτων ανεβατού για ζύμες και μύκητες έδειξε ότι οι πληθυσμοί τους κυμαίνονταν από 3,1 έως 5,5 log cfu/g και ο μέσος όρος ήταν $4,11 \pm 0,65$ log cfu/g (Πίνακας 4). Στα δείγματα του ανεβατού που λήφθηκαν απευθείας από τους παραγωγούς οι πληθυσμοί των ζυμών και μυκήτων ήταν $3,96 \pm 0,49$ log cfu/g. Οι αντίστοιχοι πληθυσμοί στα δείγματα που συλλέχθηκαν από σημεία λιανικής πώλησης βρέθηκαν $4,26 \pm 0,8$ log cfu/g, υψηλότεροι από αυτούς που καταγράφηκαν στα δείγματα από τους παραγωγούς ανεβατού, χωρίς όμως να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P > 0.05$) μεταξύ τους.

Ανάλογα αποτελέσματα αναφέρονται για το τυρί ανεβατό σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Xanthopoulos et al. (2000). Στην έρευνα αυτή βρέθηκε ότι στα δείγματα τυριού που εξετάστηκαν, ότι οι πληθυσμοί των ζυμών και μυκήτων κυμαίνονταν από 4,42 έως 5,71 log cfu/g.

Οι Hatzikamari et al. (1999) σε μελέτη που πραγματοποίησαν σε τυρί ανεβατό αναφέρουν ότι οι πληθυσμοί για ζύμες και μύκητες επηρεάζονταν ανάλογα με την εποχή συλλογής του γάλακτος και παραγωγής του τυριού. Έτσι, στα δείγματα του τυριού που παράχθηκαν τον Ιανουάριο οι πληθυσμοί των ζυμών και μυκήτων βρέθηκαν να κυμαίνονται από 3,49 έως 5,43 log cfu/g, σε συμφωνία με τους αντίστοιχους πληθυσμούς που καταγράφηκαν στην παρούσα εργασία. Υψηλότεροι πληθυσμοί ζυμών και μυκήτων

αναφέρονται από τους ερευνητές στα δείγματα ανεβατού που παρήχθησαν τον Μάρτιο και τον Μάιο και οι οποίοι κυμαίνονταν από 4,35 έως 6,32 και από 5,38 έως 7,03, αντίστοιχα.

Πίνακας 4. Πληθυσμοί ζυμών και μυκήτων σε δείγματα τυριού ανεβατό από παραγωγούς και από σημεία λιανικής πώλησης στη Θεσσαλία

Προέλευση δείγματος	Αριθμός δειγμάτων	Μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (log cfu/g)
Παραγωγοί	20	3,96 \pm 0,49
Λιανική Πώληση	20	4,26 \pm 0,8
Σύνολο	40	4,11 \pm 0,65

Σε 24 από τα 40 δείγματα ανεβατού ταυτοποιήθηκε *Candida lambica* (60%). Ο *C. lambica* ανήκει στο γένος *Candida* και μέχρι σήμερα έχει απομονωθεί από μια βέλγικη μύρα (όπου οφείλει και την ονομασία του), από γαλακτοκομικά προϊόντα, από φρούτα κ.α. Σπάνια εμπλέκεται σε περιστατικά μόλυνσης στον άνθρωπο με 3 περιπτώσεις να έχουν καταγραφεί μέχρι σήμερα (Vervaeke et al., 2008).

Επίσης, σε 13 από τα 40 δείγματα απομονώθηκε *Geotrichum silvicola* (32,5%). Η *G. silvicola* είναι μια ζύμη που απομονώθηκε για πρώτη φορά από μύγες στη Βραζιλία το 2005 (Pimenta et al. 2005).

Τέλος, σε 9 από τα 40 δείγματα ανεβατού ταυτοποιήθηκε *Yarrowia lipolytica* (22,5%). Η *Y. lipolytica* είναι μια απαθογόνος, αερόβια ζύμη που απομονώνεται συχνά από γαλακτοκομικά προϊόντα όπως τυριά, γιαούρτη και κεφίρ. Επίσης έχει βρεθεί και σε άλλα τρόφιμα, όπως σάλτσα σόγιας, κρέας και γαρίδες. Η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης της είναι 34 °C και έχει την ξεχωριστή ικανότητα να αναπτύσσεται σε υδρόφοβα περιβάλλοντα. Εξαιτίας της παραγωγής διάφορων μεταβολιτών και ιδιαίτερα της λιπάσης, η ζύμη αυτή έχει εξαιρετικά σημαντικές εφαρμογές στη βιομηχανία των τροφίμων και των φαρμακευτικών προϊόντων (Gonçalves et al. 2014).

5.3. Συμπεράσματα - Προτάσεις

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν 40 δείγματα τυριών τύπου «ανεβατό» από παραγωγούς, αλλά και από σημεία λιανικής πώλησης στην Περιφέρεια Θεσσαλίας.

Η μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων έδειξε ότι οι πληθυσμοί για την Ο.Μ.Χ. ήταν $6,95 \pm 0,45$ και $7,41 \pm 0,33$ log cfu/g αντίστοιχα, χωρίς όμως να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P > 0,05$) μεταξύ τους.

Από τα 40 δείγματα που εξετάστηκαν, τα 35 (87,5%) είχαν πληθυσμούς εντεροβακτηριοειδών $< 10^2$ και τα 5 (12,5%) $> 10^2$ cfu/g. Πρέπει να σημειωθεί ότι και τα 5 δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί εντεροβακτηριοειδών ($> 10^2$ cfu/g) ήταν δείγματα από σημεία λιανικής πώλησης.

Η εξέταση των δειγμάτων ανεβατού για ζύμες και μύκητες έδειξε ότι οι πληθυσμοί τους κυμαίνονταν από 3,1 έως 5,5 log cfu/g και ο μέσος όρος ήταν $4,11 \pm 0,65$ log cfu/g. Από τα 40 δείγματα ανεβατού, στα 24 ταυτοποιήθηκε *Candida lambica* (60%), σε 13 απομονώθηκε *Geotrichum silvicola* (32,5%) και τέλος, σε 9 δείγματα ταυτοποιήθηκε *Yarrowia lipolytica* (22,5%).

Σε κανένα από τα 40 δείγματα τυριών που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί των παθογόνων *Salmonella* spp, *L. monocytogenes* και *S. aureus*. Η μη απομόνωση των παθογόνων αυτών μικροοργανισμών στα δείγματα ανεβατού δείχνει τη σημασία της εφαρμογής σωστών συνθηκών υγιεινής κατά την παραγωγή, διακίνηση και διάθεση του προϊόντος.

Συμπερασματικά, το σύνολο των 40 δειγμάτων τυριών τύπου «ανεβατό» που εξετάστηκαν βρέθηκαν σύμφωνα με τις απαιτήσεις της κείμενης νομοθεσίας για τα συγκεκριμένα προϊόντα. Η μη ανίχνευση των παθογόνων *Salmonella* spp, *L. monocytogenes* και *S. aureus* υπογραμμίζει την αποτελεσματικότητα της τήρησης της Ορθής Υγιεινής Πρακτικής και των προγραμμάτων ελέγχου (όπως ανάλυσης κινδύνου και ελέγχου των κρίσιμων σημείων - HACCP) στην παραγωγή, διακίνηση και διάθεση αυτών των τροφίμων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική

Αμβροσιάδης, Ι. (2004): Εφαρμογή και έλεγχος του συστήματος HACCP, Σύγχρονη Παιδεία Θεσσαλονίκης.

Ανυφαντάκης Ε. (2004): Τυροκομία (Εκδόσεις Σταμούλης).

Ζερφυρίδης (2001): Τεχνολογία προϊόντων γάλακτος (Εκδόσεις: Γιαχούδη Γιαπούλη).

Ζάνδε Ν, Μητρογιάννη Κ (2013): Επίδραση του είδους του γάλακτος και του χρόνου ωρίμανσης στα ρεολογικά χαρακτηριστικά του τυριού «Ανεβατό». Πτυχιακή εργασία, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής - Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 2013.

Ζώτου Α (2009): Μελέτη της τεχνολογίας παρασκευής και φυσικοχημικών, μικροβιολογικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών φρέσκου μαλακού τυριού από νωπό, παστεριωμένο και μικροδιηθημένο αγελαδινό γάλα. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών – Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, ΠΜΣ: «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του ανθρώπου», Ιούνιος 2009.

Ιωάννης Κ. Παπαπαναγιώτου & Βασιλική Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, (2004): Ιατρική Μικροβιολογία και Ιολογία, Έκδοση 2η, University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1441/2007: της επιτροπής της 5^{ης} Δεκεμβρίου 2007 για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της επιτροπής περί μικροβιολογιών κριτηρίων για τα τρόφιμα. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης. (7.12.200), L 322/129.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005: της επιτροπής της 15^{ης} Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης. (22.12.2005), L338/1-26.

Κεχαγιάς, Χ. (2001): Γάλα: Επιστήμη και έλεγχος για την διασφάλιση της ποιότητας . Εκδόσεις Ίων, Αθήνα.

ΚΤΠ., 2014: Κώδικας Τροφίμων και Ποτών. Αθήνα 2014.

Μάντης, Ι. Α. (2005): “Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του”, Γ΄ έκδοση, Εκδόσεις Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε., Θεσσαλονίκη.

Μπαλατσούρας, Γ., (2006): Μικροβιολογία Τροφίμων, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

Πεξará, Α., Σολωμάκος, Ν., Γκόβαρης, Α., (2016): “Υγιεινή Τροφίμων Ζωϊκής προέλευσης ΙΙ”. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Κτηνιατρικής.

Σαββαΐδης Ι., (2014): Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, <Γενική Μικροβιολογία. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ>, Έκδοση 1.0, Ανοικτά Πανεπιστημιακά Μαθήματα.

Σαμέλης Ι (2007): Λιστερίωση και ελληνικά παραδοσιακά τυριά: Εκτίμηση του κινδύνου και μέτρα ελέγχου του παθογόνου σε σχέση με τον Κανονισμό (ΕΚ) 1441/2007 (τροπ. του ΕΚ 2073/2005) της Επιτροπής περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, ΕΘΙΑΓΕ.

Συμινελάκης Σ.Ν. και Παπαδάκης Ι.Α: Μελέτη της αξιοποίησης της αντίδρασης Widal στη διάγνωση των τυφο-παρατυφικών λοιμώξεων, Αρχεία Ελλην Ιατρ 1986, 3: 81-84.

Ξένη

Asperger, H., & Zangerl, P. (2003): “Staphylococcus aureus”. In: Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. (Eds), Encyclopedia of Dairy Sciences, vol. 4. Academic Press and Elsevier Science, Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, p. 2563–2569.

Barer, M., & C. R. Harwood (1999): Bacterial viability and culturability. Adv. Microbiol. Physiol., 41: 93-137.

Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten, H., Davies, A. (2011): ‘The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry’, ILSI (International Life Sciences Institute), Europe Report Series 2011, p.1-48.

Berdgoll, M. S. (1989): “Staphylococcus aureus”. In Doyle, M.P. (Ed.), Food-Borne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York, p.464–523.

Boerema J. A., Clemens R., & Brightwell, G. (2006): “Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of Staphylococcus aureus”. Int. J. Food Microbiol., p.192–201.

Brenner. F. W., R.G Villar, F.J Angulo, R. Tauxe, & B. Swaminathan (2000): ‘Salmonella nomenclature’, J. Clin Microbiol. 38:2465-2467.

Burton, M.C. 1949. Comparison of coliform and enterococcus organisms as indices of pollution in frozen foods. Food Res. 14, 434-448.

Catherine W. Donnelly (2014): Cheese and microbes, Washington, DC: ASM Press, [2014] ©2014.

Clay C.E. & Board R.G. (1991): Growth of Salmonella enteritidis in artificially contaminated hen’s shell eggs. Epidemiol Infect., p.106, p.271-281.

Corlett D.A., Brown M.H. (1980): pH and acidity. In Microbial Ecology of Foods, New York: Academic Press, p.92-111.

D’Aoust, J-Y., Mayrer J. & Stan Bailet, J. (2001): ‘Salmonella spp’. In: M.P. Doyle, L.R.Beuchat, T.J.Montville (Eds), Food Microbiology: Fundametrnals and Frontiers, 2nd Ed., ASM Press, Washington, D.C., p.383-387.

Dingens, M. M., P. M. Orwin, and P. M. Schievery (2000): 'Exotoxins of *Staphylococcus aureus*'. *Clin. Microbiol. Rev* 13:16-34.

Doyle, M.P., Beuchat, L.R and Montville, T.D (Eds), (1997): 'Food Microbiology: fundamentals and frontiers', ASM Press, Washington, D.C., USA.

F. A. G. Gonçalves, G. Colen, J. A. Takahashi (2014) *Yarrowia lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry. *The Scientific World Journal*, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/476207>

Foulquie Moreno, M., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006): 'The role and application of enterococci in food and health', *Int. J. Food Microbiol.*, 106, p.1-24.

Fricker C.R. A review (1987): The isolation of salmonella and campylobacters, *Appl. Bacteriol.*, 63: 99-116.

Freitas, R., Nero, L. A., & Carvalho, A. F. (2009): 'Technical note: Enumeration of mesophilic aerobes in milk: Evaluation of standard official protocols and Petrifilm aerobic count plates', *J. Dairy Sci.* 92 :3069–3073 doi: 10.3168/jds.2008-1705, © American Dairy Science Association.

Genigeorgis, C.A. (1989): Present state of knowledge of staphylococci intoxication. *Int. J. Food Microbiol.*, 9, 327-360.

Genigeorgis, C., Foda, M. S. Mantis, A., & Sadler, W. W. (1971): "Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production". *Appl. Microbiol.*, 21, p.862–866.

Glynn, J. R., and D. J. Bradley (1992): 'The relationship of infecting dose and severity of disease in reported outbreaks of *Salmonella* infections'. *Epidemiol. Infect.*, 109:371-388.

Gorris, L.G.M. (2005): "Food safety objective: An integral part of food chain management", *Food Control* 16:801-809.

Günthard H, Pennekamp A. (1996) Clinical significance of extraintestinal *Hafnia alvei* isolates from 61 patients and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 22(6):1040-5.

Hatzikamari et al (1999): Microbiological characteristics of Anevato: a traditional Greek cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 1999.

Hirooka, E.Y., DeSalzberg, S.P.C and Bergdoll. M.S (1987): 'Production of staphylococcal enterotoxin A and thermonuclease in cream pies'. *J. Food Protect.*, 50, p.952-955.

International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF), (1996): *Microorganisms in foods*. Roberts T.A., Baird-Parker A.C., Tompkin R.B., (Eds). Volume 5, *Characteristics of microbial pathogens*. London: Blackie Academic & Professional, p.513.

Jay, J.M. (2000): *Modern food microbiology*, 6th ed. Gaithersburg (MD), Aspen, p.679.

Jorgensen, H. J., Mork, T., Hogasen, H. R., & Rovik, L. M. (2005): "Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway". *J. Appl. Microbiol.*, 99, p.158–167.

Kang, C.K., Woodbum, M., Panenkopf, A., Cheney, R. (1969): 'Growth, sporulation, and germination of *Clostridium perfringens* in media of controlled water activity'. *Appl. Microbio*, 18, p.798-805.

Kilic S., Uysal H., Kavas G., Akbulut N., Kesenkas H. (2004): Manufacture and some properties of Turkish Fresh Goat cheese (*Pakistan J. Biological Sci.* 7 (6):1037-1039).

L. H. Gould, E. Mungai, C. B. Behravesch (2014) Outbreaks Attributed to Cheese: Differences Between Outbreaks Caused by Unpasteurized and Pasteurized Dairy Products, United States, 1998–2011. *Foodborne Pathog Dis.* 11(7): 545–551.

Montville, T.J. & K.R. Matthews. (2001): Principles which influence microbial growth, survival, and death in foods, p.13-32. In M.P Doyle, L.R. Beuchat, and T.J Montville (ed.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2th edition, ASM Press, Washington, D.C.

Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., & Castiglioni B. (2007): "Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products". *Veterinary Microbiology*, 124, p.66–72.

Morris, J.G. 2000. The effect of redox potential. In: Lund BL, Baird-Parker TC, Gould GW, editors. *The microbiological safety and quality of food. Volume 1.* Gaithersburg (MD): Aspen. p 235-50.

Mossel, D. A. A. (1975). "Occurrence, prevention and monitoring of microbial quality loss of foods and dairy products". *CRC Crit Rev Environ Control* 5:1–140.

Mossel, D.A.A., Corry, J.E.L., Struijk, C.B. and Baird, R.M 1995. *Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies*, Chichester (England): John Wiley and Sons. P. 699.

Noletto, A.L., and Bergdoll. M.S (1980): 'Staphylococcal enterotoxin production in the presence of nonenterotoxigenic staphylococci'. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, p.1167-1171.

Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggio, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Di Giannatale, E., Salinetti, A. P., La Salandra, G., Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia, N. C., & Celano, G. V. (2005): "Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy". *Int. J. Food Microbiol.*, 98, 73–79.

Pexara, A., Burriel, A., & Govaris, A. (2010): "Staphylococcus aureus and Staphylococcal enterotoxins in foodborne diseases". *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 61 (-):316-322.

Pirt, S.J. 1975. *Principles of microbe and cell cultivation.* Blackwell Scientific Publications. London, UK.

Proft, T., Fraser, J.D. (2003): 'Bacterial superantigens'. Clin. Exp. Immunol. 133. 299-306.

R. S. Pimenta, P. D. D. Alves, A. Correa Jr, M. Lachance, G. S. Prasad, B. Rajaram. R. R. P. Sinha, C. A. Rosa (2005) *Geotrichum silvicola* sp. nov., a novel asexual arthroconidial yeast species related to the genus *Galactomyces*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55: 497–501.

S. Vervaeke, K. Vandamme, E. Boone, E. De Laere, D. Swinne, I. Surmont (2008) A case of *Candida lambica* fungemia misidentified as *Candida krusei* in an intravenous drug abuser. *Medical Mycology*, Volume 46: 853–856.

Smyth, C.I., Smyth, D.A., Kennedy, J., Twohig, J., Molton, D. (2004): 'Staphylococcus aureus: from man or animals – an enterotoxin iceberg?', Proceedings of International EU-RAIN Conference, Food Pathogens Epidemiology: microbes, maladies and methods. Dec. 2nd-3rd Padua, Italy, p. 85-102.

Xanthopoulos et al (2000): Characteristics of Anevato Cheese made from Raw or Heat - treated Goat Milk Inoculated with a Lactic Starter. LWT- Food Science and Technology, November 2000.

Yasmine M., Gerald M., Ewen T. (2014): 'Encyclopedia of Food Safety', 1st Edition, Academic Press is an imprint of Elsevier, USA.

Zhang, S., Iandolo, J., & Stewart, C. (1998): "The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant", (sej). FEMS Microbiol. Lett. 168, 227–233.