ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Αδρανοποίηση *Yersinia enterocolitica* κατά την θερμική επεξεργασία τσιπούρας (*Sparus aurata*)»

ΜΟΥΡΓΚΑ ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ

ΒΟΛΟΣ, 2020

«Αδρανοποίηση *Yersinia enterocolitica* κατά την θερμική επεξεργασία τσιπούρας (*Sparus aurata*)»

«Inactivation of *Yersinia enterocolitica* during heat treatment of gilthead sea bream (*Sparus aurata*)»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1) **Ιωάννης Μποζιάρης (M.Sc., Ph.D.)**, Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Επιβλέπων***.

2) **Έλενα Γκολομάζου (Δρ.)**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Προστασία-Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***.

3) **Φωτεινή Παρλαπάνη** (**M.Sc., Ph.D.**), Συμβασιούχος Διδάσκουσα Π.Δ. 407/80, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια προπτυχιακών σπουδών στο Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστήμιου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας αυτής Καθηγητή κ. Ιωάννη Μποζιάρη για την πολύτιμη βοήθειά του, την υποστήριξη και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Γεώργιο Βέρδο για την υπομονή και την πολύτιμη βοήθεια του κατά τη διεξαγωγή του πειράματος. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Έλενα Γκολομάζου, καθώς και την Διδάσκουσα Φωτεινή Παρλαπάνη για την καλή διάθεση, το χρόνο που διέθεσαν και τις πολύτιμες συμβουλές. Τέλος, η εργασία αυτή είναι αφιερωμένη στην οικογένειά μου, η οποία με στήριζε και με στηρίζει σε κάθε βήμα μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως τα ψάρια, έχουν ταυτοποιηθεί ως πηγή τροφιμογενών ασθενειών. Η *Yersinia enterocolitica* θεωρείται ένα σημαντικό τροφιμογενές παθογόνο βακτήριο το οποίο αποτελεί το αίτιο της ασθένειας της υερσινίωσης γιατί είναι από τα λίγα παθογόνα που αυξάνονται σε θερμοκρασίες ψύξης. Το μαγείρεμα είναι το βασικότερο μέσο για την εξάλειψη των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα και αποτρέπει τα περιστατικά ασθενειών. Ολόκληρα ψάρια τσιπούρας τεμαχίσθηκαν σε μορφή ταρτάρ και εμβολιάστηκαν με εναιώρημα του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Το ταρτάρ τοποθετήθηκε σε μεταλλικούς περιέκτες και θερμάνθηκε στους 180 ^{o}C με τη χρήση συμβατικού-εμπορικού φούρνου για 2, 4, 6, 8, 10 min και καταμετρήθηκαν τα επιζώντα κύτταρα σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα με σκοπό να υπολογισθεί ο χρόνος δεκαδικής μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι καμπύλες αδρανοποίησης ακολούθησαν διφασικό προφίλ με αρχική ταχεία φάση αδρανοποίησης στα πρώτα 4 min (χρόνος δεκαδικής μείωσης 3.26 min), ακολουθούμενη από μια πιο αργή φάση αδρανοποίησης μέχρι τα 6 min (χρόνος δεκαδικής μείωσης 1.10 min) και επιπρόσθετα χρόνος θέρμανσης μεγαλύτερος των 6 min φάνηκε να είναι ο πιο αποτελεσματικός για την εξάλειψη του παθογόνου βακτηρίου. Συμπερασματικά, οι χρόνοι θερμικού θανάτου θα μπορούσαν να υποβοηθήσουν τους καταναλωτές στον σχεδιασμό μαγειρικών μεθόδων που διασφαλίζουν την ασφάλεια των τροφίμων.

Λέξεις-κλειδιά: *Yersinia enterocolitica*, τσιπούρα, θερμική αδρανοποίηση

ABSTRACT

Foods of animal origin, such as fish, have been identified as the source of infectious diseases. *Yersinia enterocolitica* is considered an important foodborne bacterial pathogen and the causative agent for the human illness yesniniosis because it is one of the few pathogenic bacteria which can grow at refrigerating temperatures. Cooking is the primary mean of eliminating pathogens from foods and preventing foodborne disease outbreaks. Whole gilthead sea bream were sliced into tartare pieces inoculated with bacterial pathogen's suspension. Tartare was placed into aluminum containers and heated at 180 ^{o}C using conventional-commercial roasting oven for 2, 4, 6, 8, 10 min and the surviving cells were enumerated on appropriate media in order to calculate the time of decimal reduction of bacterial population. The obtained results demonstrated that the inactivation curves followed biphasic profile with an initial rapid inactivation phase within the first 4 min (decimal reduction time 3.26 min), followed by a slower inactivation phase within 6 min (decimal reduction time 1.10 min) and in addition heating time higher than 6 min appeared to be the most effective for eliminating this pathogenic bacterium. It could be concluded that thermal death times from this study will assist consumers to design cooking regimes that ensure safety food safety.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, sea bream, thermal inactivation

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

🕮 **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**	**vi**
🕮 **ABSTRACT**	**vii**
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	**1**
1.1 Τροφιμογενείς ασθένειες και κατανάλωση ιχθύων	**1**
1.2 Παθογόνο βακτήριο *Yersinia enterocolitica*	**2**
1.3 Θερμική επεξεργασία τροφίμων (μαγείρεμα)	**3**
1.4 Καταμέτρηση θερμικώς τραυματισμένων κυττάρων	**4**
1.5 Σκοπός εργασίας	**5**
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	**6**
2.1 Γενικά	**6**
2.2 Προετοιμασία θρεπτικών υλικών	**6**
2.3 Βακτηριακό στέλεχος και προετοιμασία εμβολίου	**9**
2.4 Προετοιμασία δειγμάτων	**9**
2.5 Διαδικασία θερμικής επεξεργασίας	**10**
2.6 Προετοιμασία δειγμάτων για απαρίθμηση μικροοργανισμών	**10**
2.7 Επώαση δειγμάτων και απαρίθμηση μικροοργανισμών	**11**
2.8 Προσδιορισμός του χρόνου δεκαδικής μείωσης πληθυσμών	**12**
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	**12**
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	**15**
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	**19**
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	**20**
6.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία	**20**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τροφιμογενείς ασθένειες και κατανάλωση ιχθύων

Αν και τα τρόφιμα, και ειδικά τα ψάρια, είναι απαραίτητα για την διατήρηση της ζωής διότι παρέχουν ενέργεια στον οργανισμό με τη διάσπαση των λιπών, κυρίως των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και των υδατανθράκων, προάγουν την ανάπτυξη και τη συντήρηση του οργανισμού και ρυθμίζουν βασικές λειτουργίες με τη συμβολή των πρωτεϊνών, των αλάτων και των βιταμινών (Elbashir *et al.,* 2018), την ίδια στιγμή θεωρούνται υψηλού κινδύνου τρόφιμα λόγω των τροφιμογενών ασθενειών που ενδέχεται να προκαλέσουν (Davies *et al.,* 2001; Adams and Moss, 2008).

Τροφιμογενής ασθένεια ορίζεται ως η «κάθε ασθένεια μολυσματικής ή τοξικής φύσης που προκαλείται από κατανάλωση τροφής ή νερού» (Adams and Moss, 2008; Barba *et al.,* 2017). Οι τροφιμογενείς ασθένειες εξακολουθούν να αποτελούν την πιο κοινή και σοβαρή απειλή για την δημόσια υγεία παγκοσμίως, καθώς και σημαντική αιτία νοσηρότητας. Οι περισσότερες τροφιμογενείς ασθένειες είναι ήπιες και σχετίζονται με γαστρεντερικά συμπτώματα, όπως διάρροια και έμετο. Μερικές φορές, όμως, οι τροφιμογενείς ασθένειες είναι πολύ πιο σοβαρές και ιδιαίτερα απειλητικές για τη ζωή, κυρίως σε παιδιά στις αναπτυσσόμενες χώρες (Blackburn and McClure, 2002). Η μόλυνση του νερού με διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς (π.χ. *Vibrio spp.*, ορισμένα είδη *Aeromonas spp.*, σπόρια *Clostridium botulinum* τύπου F, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*) μπορεί να οδηγήσει σε μη ασφαλή θαλασσινά. Αυτά τα μικρόβια βρίσκονται στο δέρμα και στα βράγχια των ψαριών (Elbashir *et al.,* 2018), ενώ διασταυρούμενη επιμόλυση με μικρόβια, όπως η *L. monocytogenes* και ο *Staphylococcus aureus* μπορεί να πραγματοποιηθεί κατά τη συγκομιδή, τον χειρισμό, την προετοιμασία, την επεξεργασία, τη μεταφορά ή την αποθήκευση των ψαριών (Novoslavskij *et al.,* 2015; Elbashir *et al.,* 2018).

Μελέτες σε ψάρια έχουν δείξει ότι η συχνότητα εμφάνισης της *Yersinia spp.* κυμαίνεται από 0-22 % (Hudson *et al.,* 1992; Khare *et al.,* 1996). Οι Davies *et al.,* (2001) εξέτασαν νωπά ψάρια προερχόμενα από τη Γαλλία, τη Μεγάλη Βρετανία και την Πορτογαλλία για την παρούσια παθογόνων μικροβίων, μεταξύ των οποίων και η *Y. enterocolitica*. Το συγκεκριμένο παθογόνο βακτήριο εντοπίστηκε μόνο σε δείγματα σολωμού και πέστροφας από τη Μεγάλη Βρετανία στην υψηλή συχνότητα

του 23 %. Η δυνητική, όμως, παθογένεια θεωρήθηκε ασαφής. Οι Khare *et al.,* (1996) εξέτασαν 15 προϊόντα ψαριών λιανικής πώλησης στην Ινδία για *Yersinia spp.* εφαρμόζοντας έξι ευρέως αποδεκτά πρωτόκολλα απομόνωσης και βρήκαν 6 στελέχη *Yersinia enterocolitica*, ωστόσο κανένα από τα στελέχη αυτά δεν διέθετε το πλασμίδιο της μολυσματικότητας. Μεταξύ των 9 φρέσκων δειγμάτων ψαριών και οστρακόδερμων που εξετάστηκαν μόνο 3 ποικιλίες, δηλαδή το καστανόψαρο (14.28 %), το στρείδι (20 %) και το καβούρι (20 %) φιλοξένησαν μη παθογονικούς τύπους της *Yersinia enterocolitica*, όπως και τα ξηρά δείγματα γαύρου και γαρίδας. Τέλος, οι Hudson *et al.,* (1992) κατά τη μελέτη της συχνότητας εμφάνισης της *Yersinia enterocolitica* σε έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα ψαριών (25) και οστρακόδερμων (25), στη Νέα Ζηλανδία, δεν εντόπισαν κανένα θετικό δείγμα, ενώ οι Papadopoulou *et al.,* (2007) αναφέρουν πως στα 360 δείγματα θαλασσινών (θαλασσινά ψάρια, γαρίδες, καλαμάρια, χταπόδια, μύδια, ψάρια του γλυκού νερού) που εξετάστηκαν το ποσοστό της *Yersinia enterocolitica* κυμαινόταν από 0-40 %. Επομένως, λόγω της ανθεκτικότητας του συγκεκριμένου παθογόνου μικροοργανισμού στις χαμηλές θερμοκρασίες, τα κατεψυγμένα προϊόντα ψαριών είναι πιθανόν να λειτουργήσουν ως φορείς τροφιμογενών ασθενειών (Feldhusen, 2000).

1.2 Παθογόνο βακτήριο *Yersinia enterocolitica*

Το γένος Yersinia είναι μέλος της οικογένειας Enterobacteriaceae και περιλαμβάνει 12 είδη (*Y. aldovae*, *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. rohdei*, και *Y. ruckeri*) (Juneja and Sofos, 2010). Η *Yersinia enterocolitica* είναι ένα εντερικό παθογόνο, Gram-αρνητικό, σε μορφή βάκιλλου, συχνά όμως εμφανίζεται με τη μορφή μη σποριογόνου κοκκοβάκιλου μεγέθους 0.5-0.8 × 1-3 μm και προαιρετικά αναερόβιο. Με βάση βιοχημικές μεθόδους, ζυμώνει την ραμνόζη, την σορβιτόλη, την σακχαρόζη, ενώ κατατάσσεται σε πέντε βιοομάδες: 1A (ορότυποι: O:4; O:5; O:6,30; O:6,31; O:7,8; O:7,13; O:10; O:14; O:16;O:21; O:22; O:25; O:36; O:37; O:41,42; O:46; O:47; O:57), 1B (ορότυποι: O:4,32b; O:8b; O:13a,13b; O:16; O:18b; O:20b; O:21b; O:25; O:41,42), 2 (ορότυποι: O:5,27a; O:9b; O:27), 3 (ορότυποι: O:1,2,3b; O:3b; O:5,27b), 4 (ορότυποι: O:3) και 5 (ορότυποι: O:2,3) (Bottone *et al.,* 1997; Labbe and Garcia, 2001; Juneja and Sofos, 2010). Επιπλέον είναι θετικό στην καταλάση, αρνητικό στην οξειδάση, θετικό στην ουρεάση, αρνητικό στην παραγωγή

H_2S και θετικό στην αναγωγάση του νιτρικού άλατος (Labbe and Garcia, 2001). Αυξάνεται σε θερμοκαρσίες από -1 έως 42 ^oC με βέλτιστη τους 30 ^oC, σε pH από 4.2 έως 10 με βέλτιστο 7.2 έως 7.4, σε ενεργότητα νερού από 0.96 έως 1 και παρουσία NaCl από 0 έως 5 %. Είναι από τα λίγα παθογόνα βακτήρια που μπορούν να αυξηθούν σε συνθήκες ψύξης. Είναι μη ευκίνητο στους 37 ^oC και ευκίνητο στους 30 ^oC με τη βοήθεια περίτριχων μαστιγίων, ενώ διαφέρει από τα περισσότερα μέλη της οικογένειας Enterobacteriaceae διότι αυξάνεται αργά στους 37 °C (Adams and Moss, 2008).

Τα βακτήριο *Yersinia enterocolitica* είναι ένα από τα τρία είδη που θεωρούνται παθογόνα του ανθρώπου. Τα άλλα δύο είναι τα *Yersinia pseudotuberculosis* που προκαλεί την μεσεντερική αδενίτιδα και η *Yersinia pestis* που προκαλεί την βουβωνική πανώλη, ασθένεια η οποία εξόντωσε το 25 % του ευρωπαϊκού πληθυσμού κατά τον 14° αιώνα. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός βρίσκεται, συνήθως, στο νερό, αλλά και στην εντερική χλωρίδα των θερμόαιμων ζώων, κυρίως των χοίρων. Η μετάδοση στον άνθρωπο γίνεται κυρίως μέσω επαφής με κόρπανα, μέσω κοπρανώδους επιμόλυνσης κατά την διαδικασία της σφαγής των ζώων ή μέσω κατανάλωσης ωμού ή ανεπαρκώς μαγειρεμένου χοιρινού. Η ασθένεια που προκαλείται ονομάζεται «υερσινίωση», είναι ζωονόσος, σποραδικής φύσεως και προκαλεί γαστρεντερίτιδα και εντεροκολίτιδα, κυρίως σε παιδιά και ηλικιωμένους με τα συμπτώματα να διαρκούν 2 έως 3 ημέρες και να περιλαμβάνουν πυρετό, διάρροια, εμετό, κτλ (Labbe and Garcia, 2001; Doyle and Beuchat, 2007; Adams and Moss, 2008; Juneja and Sofos, 2010).

1.3 Θερμική επεξεργασία τροφίμων (μαγείρεμα)

Θερμική επεξεργασία ενός τροφίμου ορίζεται «η διαδικασία με την οποία, για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, το τρόφιμο εκτίθεται σε υψηλή θερμοκρασία και στη συνέχεια ψύχεται». Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι αφενός η μείωση του μικροβιακού φορτίου (βλαστικών μορφών ή/και σπορίων) και η αδρανοποίηση ενζύμων και αφετέρου η βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων με σκοπό την βρώση (Adams and Moss, 2010). Τα παραπάνω μπορούν να επιτευχθούν μέσω της διαδικασίας του μαγειρέματος με τη χρήση συμβατικού φούρνου (Crespo and Ockerman, 1977). Για παράδειγμα, στον συμβατικό φούρνο μαγειρέματος η θερμότητα εφαρμόζεται στο εξωτερικό του τροφίμου με ομοιόμορφο τρόπο και

εισχωρεί μέσω της μεθόδου της αγωγής, στο κέντρο του τροφίμου. Στον φούρνο μικροκυμάτων το φαγητό θερμαίνεται διότι τα μικροκύματα εισχωρούν στο κέντρο του τροφίμου, τα μόρια του νερού ταλαντώνονται, έρχονται σε σύγκρουση και τριβή και παράγεται η απαραίτητη θερμότητα για το μαγείρεμα (Harrison, 1979; Heddleson and Doores, 1993). Έτσι, λοιπόν, όταν η θερμοκρασία υπερβαίνει την βέλτιστη για την αύξηση των βακτηρίων, τα κύτταρα τραυματίζονται ή θανατώνονται. Η σχέση της μείωσης του πληθυσμού των κυττάρων με τη θερμοκρασία μετρά την αντίσταση των μικροοργανισμών στην θέρμανση και ορίζεται ως D και είναι ο χρόνος που απαιτείται για να ελαττωθεί ο πληθυσμός ενός μικροοργανισμού κατά ένα λογαριθμικό κύκλο ή κατά 90 %.

1.4 Καταμέτρηση θερμικώς τραυματισμένων κυττάρων

Η μικροβιακή μόλυνση των τροφίμων είναι μια σημαντική ανησυχία τόσο για την βιομηχανία, όσο και για τους καταναλωτές, αλλά και για τους μηχανισμούς ελέγχου. Μέθοδοι, όπως η θέρμανση των τροφίμων, χρησιμοποιούνται ευρύτατα για τον έλεγχο αυτών των παθογόνων μικροοργανισμών. Μετά τη συγκεκριμένη επεξεργασία οι μικροοργανισμοί μπορεί να θανατωθούν (καταστροφή κυτταρικής μεμβράνης και απώλεια κυτταροπλασματικού υγρού, καταστροφή διαφόρων ενζύμων, κτλ), κάποιοι να επιζήσουν (μη τραυματισμένοι) και κάποιοι να υποστούν υποθανάτιο τραυματισμό. Ένα υποθανάτια τραυματισμένο κύτταρο ορίζεται ως «ένα κύτταρο που επιζεί μετά από μια καταπόνηση, αλλά χάνει κάποιες από τις λειτουργικές του ιδιότητες». Τα συγκεκριμένα κύτταρα εμφανίζουν εκτεταμένη φάση προσαρμογής , ωστόσο έχουν την ικανότητα να αναζωογονηθούν και να σχηματίσουν αποικίες (Wu *et al.*, 2001).

Πολλές μέθοδοι έχουν προταθεί και χρησιμοποιηθεί για να καταμετρηθούν τα τραυματισμένα κύτταρα. Μια από αυτές τις μεθόδους είναι η μέθοδος του λεπτού στρώματος άγαρ (Wu, 2008). Η συγκεκριμένη μέθοδος προτάθηκε και εφαρμόστηκε από τους Kang and Siragusa, (1999) και Kang and Fung, (2000). Περιλαμβάνει την ενσωμάτωση μικρής ποσότητας θρεπτικού υλικού γενικής χρήσης, συνήθως TSA, στην επιφάνεια στερεοποιημένου θρεπτικού εκλεκτικής χρήσης. Το θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης παρέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά και το κατάλληλο περιβάλλον στα τραυματισμένα κύτταρα να ανακάμψουν, να αναγεννηθούν και να ανακτήσουν μερικές από τις λειτουργίες τους μέσα σε λίγες ώρες επώασης. Στη συνέχεια, οι μικροοργανισμοί-στόχοι έρχονται σε επαφή με τα συστατικά του εκλεκτικού υλικού,

τα οποία μέσω της διάχυσης εισχωρούν στο θρεπτικό γενικής χρήσης, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται οι αποικίες και να αδρανοποιούνται οι μικροοργανισμοί του παρασκήνιου (Boziaris *et al.,* 1998; Kang and Fung, 2000).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τη σημαντικότητα της παραπάνω μεθόδου για την ανάκτηση θερμικώς (θερμότητα ή ψύξη) τραυματισμένων κυττάρων, ή κυττάρων τα οποία έχουν υποστεί καταπόνηση με οξέα, π.χ. *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Thiphymurium, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* (Wu and Fung, 2001; Wu *et al.,* 2001). Επίσης, οι Hajmeer *et al.,* (2001) αναφέρουν πως η συγκεκριμένη μέθοδος ήταν περισσότερο αποτελεσματική στην ανάκτηση τραυματισμένων κυττάρων *Escherichia coli* O157:H7 που είχαν υποστεί τραυματισμό με αλάτι σε σχέση με το εκλεκτικό θρεπτικό McConkey Sorbitol Agar. Επίσης, εξετάσθηκε η ανάκτηση κυττάρων *Listeria monocytogenes* μετά τον τραυματισμό τους με υψηλή υδροστατική πίεση 400 ή 600 MPa για 1 sec, 2, 4, 6 min στους 12 ± 2 ^{o}C και με θερμότητα για 3, 6, 9 min στους 60 ± 1 ^{o}C. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος του λεπτού στρώματος άγαρ ήταν πιο αποτελεσματική σε σχέση με το θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης μόνο στην περίπτωση της θερμικής επεξεργασίας (Lavieri *et al.,* 2014). Επιπρόσθετα, η μέθοδος είχε παρόμοιο αποτέλεσμα με το TSA στην καταμέτρηση των *Salmonella* Thiphymurium, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* μετά τον όξινο τραυματισμό τους σε χυμό μήλου με προσθήκη κανέλας (Yuste and Fung, 2003). Τέλος, η μέθοδος είχε σημαντική επίδραση στην ανάκτηση κυττάρων *Escherichia coli* O157:H7 μετά τον τραυματισμό τους σε χυμό μήλου με αντιμικροβιακές ουσίες (π.χ. εκχύλισμα από το φρούτο *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc) (Wu *et al.,* 2008)

1.5 Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της δεκαδικής μείωσης του πληθυσμού του παθογόνου βακτηρίου *Yersinia enterocolitica* σε σάρκα τσιπούρας (*Sparus aurata*) μετά από θερμική επεξεργασία σε συμβατικό φούρνο ψησίματος στους 180 ^{o}C.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικά

Ολόκληρα, απεντερωμένα ψάρια τσιπούρας βάρους 350-400 g αγοράσθηκαν από τοπική υπεραγορά της πόλης του Βόλου και μεταφέρθηκαν, σε ισοθερμικά κιβώτια με πάγο, στον εργαστηριακό χώρο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις θερμικής αδρανοποίησης του παθογόνου βακτηρίου *Yersinia enterocolitica* μετά από εμβολιασμό του στη σάρκα των ψαριών (ταρτάρ) με σκοπό να προσδιορισθεί ο χρόνος δεκαδικής μείωσης του πληθυσμού κατά την διάρκεια εμπορικού - συμβατικού ψησίματος.

2.2 Προετοιμασία θρεπτικών υλικών

Όλα τα μικροβιολογικά υλικά προέρχονταν από την LAB M (Lancashire, UK).

- Maximum Recovery Diluent, MRD

Είναι ισοτονικό, ωσμωρυθμιστικό διάλυμα παρασκευής διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων για μικροβιολογική ανάλυση τροφίμων

Συστατικά: g/1000 ml

Sodium Chloride	8.5
Bacteriological Peptone	1.0

Διαδικασία παρασκευής

Σε μια φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 8.5 g χλωριούχου νατρίου και 1.0 g πεπτόνης και στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 ^{o}C για 15 min.

- Tryptone Soy Broth, TSB

Το TSB είναι θρεπτικός ζωμός γενικής χρήσης ο οποίος επιτρέπει την ανάπτυξη σχεδόν όλων τον μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχτούν σε εργαστηριακά υλικά. Είναι κατάλληλος για την καλλιέργεια τόσο αερόβιων όσο και αναερόβιων βακτηρίων. Οι πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας παρέχουν άζωτο, βιταμίνες και μέταλλα. Τα φυσικά σάκχαρα της πεπτόνης σόγιας προάγουν την ανάπτυξη. Το χλωριούχο νάτριο χρησιμεύει ως ρυθμιστής της ωσμωτικής πίεσης. Η σύνθεση του θρεπτικού φαίνεται παρακάτω:

Συστατικά: g/1000 ml

Tryptone	17.0
Soy Peptone	3.0
Sodium Chloride	5.0
Dextrose	2.5
Dipotassium Phosphate	2.5

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 30 g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 ^{o}C για 15 min. Το τελικό pH του θρεπτικού ήταν 7.3 ± 0.2.

- Tryptone Soy Agar

Το TSA είναι ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης το οποίο επιτρέπει την αύξηση σχεδόν όλων τον μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχτούν σε εργαστηριακά υλικά. Είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια τόσο αερόβιων όσο και αναερόβιων βακτηρίων. Οι πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας παρέχουν άζωτο, βιταμίνες και μέταλλα. Τα φυσικά σάκχαρα της πεπτόνης σόγιας προάγουν την ανάπτυξη. Το χλωριούχο νάτριο χρησιμεύει ως ρυθμιστής της ωσμωτικής πίεσης. Η σύνθεση του θρεπτικού φαίνεται παρακάτω:

Συστατικά: g/1000 ml

Tryptone	15.0
Soy Peptone	5.0
Sodium Chloride	5.0
Agar	12.0

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 37 g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 ^{o}C για 15 min και στη συνέχεια η διαδικασία της ενσωμάτωσης του θρεπτικού, όπου μικρή ποσότητα μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Το τελικό pH του θρεπτικού ήταν 7.3 ± 0.2.

- Violet Red Bile Glucose Agar, VRBGA

Χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση εντεροβακτηριδίων σε τρόφιμα. Είναι εκλεκτικό υλικό χάρη στη δράση των χολικών αλάτων και του κρυσταλλικού ιώδους και έτσι αναπτύσσονται μόνο τα βακτηρίδια της οικογένειας Enterobacteriaceae. Η ζελατίνη από ενζυματική πέψη παρέχει άζωτο, αμινοξέα και άνθρακα. Το εκχύλισμα ζύμης προσφέρει τις απαραίτητες βιταμίνες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η δεξτρόζη παρέχει υδατάνθρακες. Η αντίδραση των βακτηρίων με τη δεξτρόζη χρωματίζει τις αποικίες κόκκινες με ένα κόκκινο-μωβ φωτοστέφανο παρουσία δείκτη pH (Ουδέτερο κόκκινο).

Συστατικά: g/1000 ml

Yeast Extract	3.0
Peptone	7.0
Sodium Chloride	5.0
Bile Salts	1.50
Glucose	10.0
Neutral Red	0.03

Crystal Violet	0.002
Agar	12.0

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 38.5 g θρεπτικού υλικού στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Το θρεπτικό υλικό θερμάνθηκε μέχρι να ομογενοποιηθεί το μίγμα (δεν χρειάζεται περαιτέρω αποστείρωση). Αφού το θρεπτικό κρύωσε μέχρι τους 45 έως 50 ^{o}C, στη συνέχεια μοιράστηκε σε τρυβλία Petri. Το τελικό pH ήταν 7.4 ± 0.2.

2.3 Βακτηριακό στέλεχος και προετοιμασία εμβολίου

Το βακτηριακό στέλεχος *Yersinia enterocolitica* CITY 650 που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή προμηθεύτηκε από την Τράπεζα Μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων, του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πριν από τη χρήση, ο μικροοργανισμός φυλασσόταν υπό συνθήκες κατάψυξης (-80 °C και - 20 °C), σε φιαλίδια σφαιριδίων και σε φιαλίδια που περιείχαν ζωμό TSB + 25 % γλυκερόλη, αντίστοιχα, ενώ για την αναγέννησή του μικρή ποσότητα μεταφέρθηκε, με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου, σε 10 ml θρεπτικού ζωμού TSB και επωάσθηκε στους 37 °C για 24 h. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με τη μέθοδο της φυγοκέντρισης (5000 g / 10 min / 4 °C) και τελικά επαναιωρήθηκαν σε 10 ml διαλύματος MRD (0.85 % w/v NaCl, 0.1 % w/v πεπτόνη) ως καθαρή καλλιέργεια (10^8 - 10^9 CFU / ml) με σκοπό να χρησιμοποιηθεί ως εμβόλιο για τις διαδικασίες θερμικής αδρανοποίησης.

2.4 Προετοιμασία δειγμάτων

Λήφθησαν ασηπτικά, 20 g σάρκας τσιπούρας εις τριπλούν (n = 3) και τεμαχίστηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε μικρά κομμάτια (ταρτάρ). Στη συνέχεια

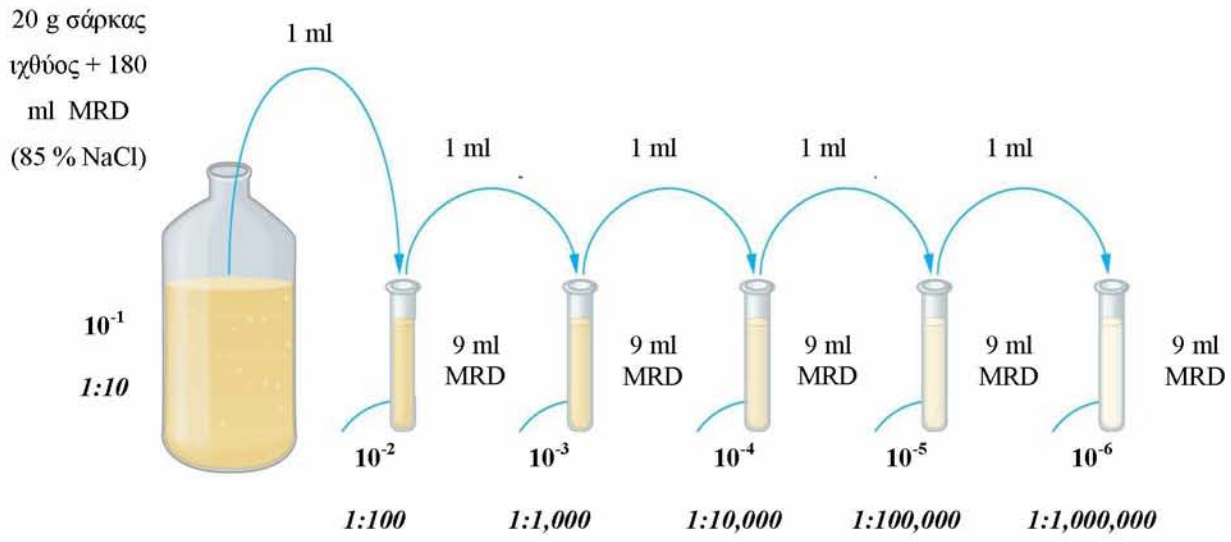
τοποθετήθηκαν σε περιέκτες PCS αλουμινίου ψησίματος και εμβολιάσθηκαν με 0.2 ml βακτηριακού εναιωρήματος *Yersinia enterocolitica*. Αναμείχθηκαν με αποστειρωμένη λαβίδα, έτσι ώστε το εμβόλιο να κατανεμηθεί σε όλη τη σάρκα, καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και αφέθησαν για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό να απορροφηθεί το εμβόλιο.

2.5 Διαδικασία θερμικής επεξεργασίας

Οι μελέτες θερμικής αδρανοποίησης πραγματοποιήθηκαν σε εμπορικό φούρνο ψησίματος με ελεγχόμενη και σταθερή θερμοκρασία στους 180 ^{o}C έτσι ώστε να προσομοιάζονται οι πραγματικές συνθήκες ψησίματος των τροφίμων. Συνεπώς, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον προθερμασμένο φούρνο για 2, 4, 6, 8 και 10 min. Επιπλέον, τα δείγματα-μάρτυρες δεν υπέστησαν θερμική επεξεργασία, με σκοπό να καταμετρηθεί ο πληθυσμός του μικροοργανισμού.

2.6. Προετοιμασία δειγμάτων για απαρίθμηση μικροοργανισμών

Ανά 2, 4, 6, 8 και 10 min λήφθησαν ασηπτικά 20 g σάρκας τσιπούρας, εις τριπλούν (n = 3), και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένη σακούλα Stomacher που περιείχε 180 ml κρύου αραιωτικού διαλύματος MRD (0.85 % w/v NaCl, 0.1 % w/v πεπτόνη) με σκοπό να σταματήσει αμέσως η θερμική επεξεργασία και στη συνέχεια και η σακούλα οδηγήθηκε σε συσκευή ομογενοποίησης, όπου τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν για 60 sec. Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων (**Εικόνα 2.6**) με μεταφορά 1 ml από κάθε αραίωση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου.

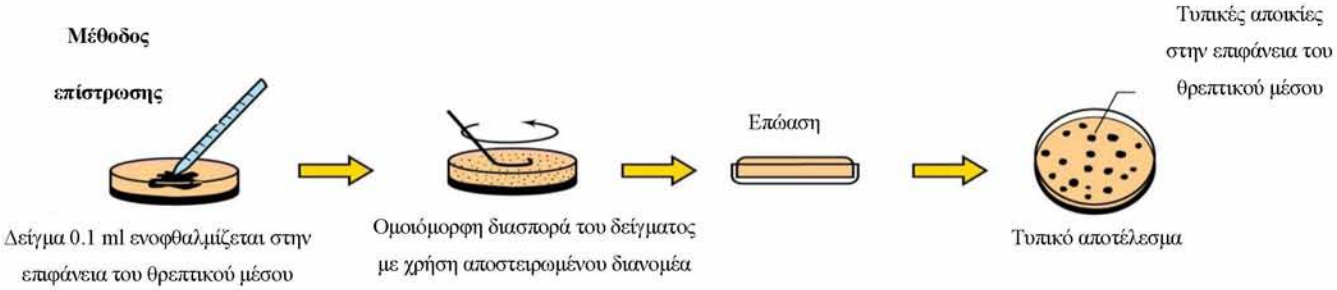


Εικόνα 2.6. Διαδικασία μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας των βακτηρίων, με την εφαρμογή σειράς διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός βακτηριακού εναιωρήματος γνωστού όγκου (0.1 ml) από κάθε αραίωση σε θρεπτικό υπόστρωμα με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (**Εικόνα 2.7**).

2.7 Επώαση δειγμάτων και απαρίθμηση μικροοργανισμών

Ο μικροοργανισμός που απαριθμήθηκε ήταν η *Yersinia enterocolitica* σε VRBGA με λεπτή επίστρωση TSA, μετά από επώαση των τρυβλίων στους 37 ^{o}C για 48 - 72 h, με καταμέτρηση των άχρωμων/χλωμών ροζ αποικιών με αδιαφανές/ημίλευκο δακτύλιο (**Εικόνα 2.7**).



Εικόνα 2.7. Μέθοδοι μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας βακτηρίων με καταμέτρηση αποικιών επί τρυβλίο

2.8 Προσδιορισμός του χρόνου δεκαδικής μείωσης πληθυσμών

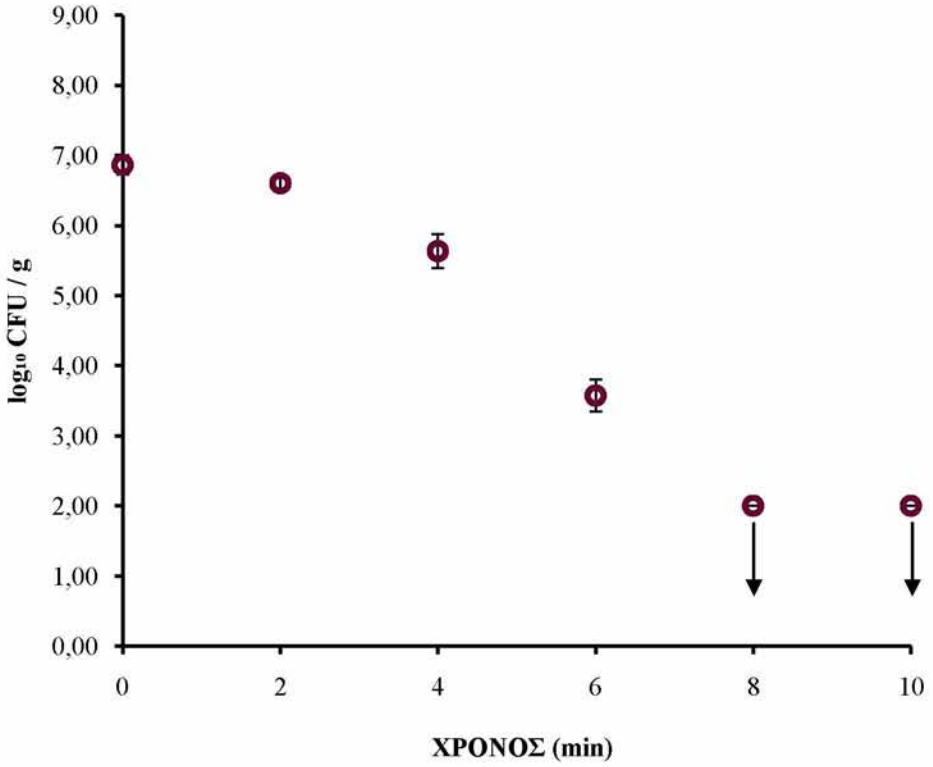
Ως χρόνος δεκαδικής μείωσης του πληθυσμού των μικροοργανισμών ορίζεται ο χρόνος που απαιτείται για να μειωθεί ο πληθυσμός ενός μικροοργανισμού κατά 90 %. Υψηλή τιμή σημαίνει χαμηλός ρυθμός θανάτου. Η τιμή υπολογίσθηκε από την αρνητική γραμμική συσχέτιση των επιζώντων πληθυσμών σε σχέση με τον χρόνο θέρμανσης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μεταβολή ($\log_{10}$ CFU / g) του πληθυσμού των ζώντων κυττάρων του παθογόνου βακτηρίου *Yersinia enterocolitica* σε σάρκα τσιπούρας, μετά την θερμική επεξεργασία στους 180 ^{o}C, για χρονικό διάστημα 2, 4, 6, 8 και 10 min, σε εμπορικό φούρνο ψησίματος, παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.1**.

Πίνακας 3.1. Μεταβολή του πληθυσμού του βακτηριακού στελέχους *Yersinia enterocolitica* σε σχέση με το χρόνο ψησίματος στους 180 °C. Οι τιμές παρουσιάζουν τους μέσους όρους ± τυπικές αποκλίσεις (n = 3)

ΧΡΟΝΟΣ (min)	$\log_{10}$ CFU / g	Τυπική Απόκλιση
0	6.86	0.14
2	6.60	0.09
4	5.63	0.24
6	3.57	0.23
8	< 2.00	-
10	< 2.00	-

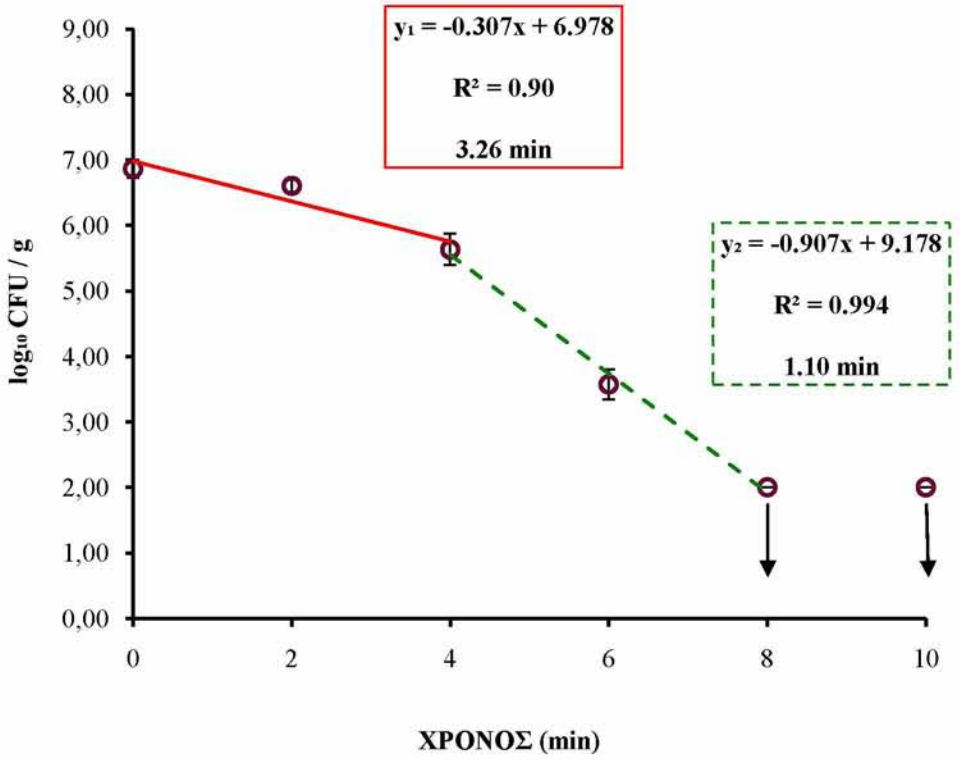


Σχήμα 3.1. Λογαριθμική μείωση ($\log_{10}$ CFU / g) του πληθυσμού του παθογόνου βακτηρίου *Yersinia enterocolitica* σε σάρκα τσιπούρας μετά την θερμική επεξεργασία στους 180 °C σε εμπορικό φούρνο ψησίματος. Οι τιμές παρουσιάζουν τους μέσους όρους ± τυπικές αποκλίσεις (n = 3). Τα κάθετα βέλη υποδεικνύουν ότι οι συγκεκριμένες τιμές του βακτηριακού πληθυσμού ήταν κάτω του επιπέδου ανίχνευσης των 2.00 $\log_{10}$ CFU / g

Αρχικά ο πληθυσμός ήταν 6.86 ± 0.14 $\log_{10}$ CFU / g, δηλαδή στα δείγματα που δεν υπέστησαν θερμική επεξεργασία. Μετά από 2 min ψησίματος ο πληθυσμός μειώθηκε

στους 6.60 ± 0.09 $\log_{10}$ CFU / g, ενώ μετά από 4 min ψησίματος ο πληθυσμός άγγιξε τους 5.63 ± 0.24 $\log_{10}$ CFU / g και τελικά έπεσε στους 3.57 ± 0.23 $\log_{10}$ CFU / g μετά από 6 min ψησίματος. Τέλος, μετά τα 8 min ψησίματος ο πληθυσμός παρέμεινε κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2.00 $\log_{10}$ CFU / g

Για να υπολογιστεί ο χρόνος δεκαδικής μείωσης του πληθυσμού του παθογόνου βακτηρίου *Yersinia enterocolitica* έγινε γραμμική συσχέτιση των ζώντων κυττάρων σε σχέση με τον χρόνο θερμικής επεξεργασίας της τσιπούρας (**Σχήμα 3.2**).



Σχήμα 3.2. Λογαριθμική μείωση ($\log_{10}$ CFU / g) του πληθυσμού του παθογόνου βακτηρίου *Yersinia enterocolitica* σε σάρκα τσιπούρας μετά την θερμική επεξεργασία στους 180 ^{o}C σε εμπορικό φούρνο ψησίματος. Οι τιμές παρουσιάζουν τους μέσους όρους ± τυπικές αποκλίσεις (n = 3). Στο γράφημα παρουσιάζεται η γραμμική συσχέτιση του επιζώντος πληθυσμού σε σχέση με το χρόνο, η εξίσωση που περιγράφει τη σχέση αυτή, καθώς και ο χρόνος δεκαδικής μείωσης του πληθυσμού του συγκεκριμένου παθογόνου βακτηρίου. Τα κάθετα βέλη υποδεικνύουν ότι οι συγκεκριμένες τιμές του βακτηριακού πληθυσμού ήταν κάτω του επιπέδου ανίχνευσης των 2.00 $\log_{10}$ CFU / g

Έτσι, ο χρόνος δεκαδικής μείωσης του πληθυσμού, στα πρώτα 4 min ψησίματος, ήταν $\left(-\frac{1}{-a}\right) = \left(-\frac{1}{-0.307}\right) = 3.26$ min και από τα 4 min μέχρι τα 10 min ήταν $\left(-\frac{1}{-a}\right) = \left(-\frac{1}{-0.907}\right) = 1.10$ min, δηλαδή η θερμική αδρανοποίηση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού ήταν διφασική. Αρχικά, παρατηρείτε ότι ο πληθυσμός του παθογόνου βακτηρίου παρουσιάζει μεγάλο χρόνο δεκαδικής μείωσης, δηλαδή αργό ρυθμό θανάτου, μέχρι τα 4 min θερμικής επεξεργασίας της τσιπούρας, ενώ από τα 4 min έως τα 8 min ο χρόνος δεκαδικής μείωσης είναι μικρός, άρα ο ρυθμός θανάτου είναι ταχύτερος.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι Bolton *et al.,* (2013) μελέτησαν την θερμική αδρανοποίηση στελεχών της *Yersinia enterocolitica* κατά το ζεμάτισμα σφαγίων χοίρων στους 50, 55 και 60 °C. Οι τιμές δεκαδικής μείωσης ήταν οι εξής: 45.77, 10.98, 2.53 min, αντίστοιχα για τις θερμοκρασίες των 50, 55 και 60 °C. Σε μια μελέτη που δημοσίευσαν οι Pagan *et al.,* (1999) αναφέρουν ότι οι τιμές θερμικής αδρανοποίησης του συγκεκριμένου παθογόνου βακτηρίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού φωσφορικού άλατος, ήταν από 0.33 έως 0.78 min και από 0.18 έως 0.60 min για τις θερμοκρασίες των 55 και 59 ^{o}C, αντίστοιχα. Επίσης, μελετήθηκε η θερμική αδρανοποίηση της *Yersinia enterocolitica* σε μοσχαρίσιο κιμά και σε μοσχαρίσιο κρέας τα οποία ήταν τοποθετημένα σε συσκευασία κενού και θερμάνθηκαν σε υδατόλουτρο στους 50, 55 και 60 ^{o}C. Οι τιμές δεκαδικής μείωσης κυμάνθηκαν από 0.55 έως 21.2 min (Bolton *et al.,* 2000). Οι Lovett *et al.,* (1982) αναφέρουν ότι η τιμή του θερμικού θανάτου για την *Yersinia enterocolitica* σε γάλα που θερμάνθηκε στους 62.8 °C κυμάνθηκε από 0.24 έως 0.96 min. Επιπλέον, οι Favier *et al.,* (2018) αναφέρουν ότι υγρά προϊόντα αυγού (ολόκληρα, κρόκος, ασπράδι), αφού εμβολιάστηκαν με *Yersinia enterocolitica*, θερμάνθηκαν σε τριχοειδείς σωλήνες σε θερμοκρασία από 51 έως 64 ^{o}C. Οι τιμές θερμικού θανάτου ήταν 0.06 min (64 ^{o}C) έως 11.30 min (55 ^{o}C) για τον υγρό κρόκο, 0.058 (64 ^{o}C) έως 11.29 min (55 ^{o}C) για τα ολόκληρα υγρά αυγά και 0.39 (57 ^{o}C) έως 9.88 min (51 ^{o}C) για το υγρό ασπράδι. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχει περιορισμένη διαθέσιμη βιβλιογραφία σχετικά με την θερμική αδρανοποίηση του συγκεκριμένου παθογόνου βακτηρίου, κυρίως σε προϊόντα ψαριών. Γενικότερα, οι θερμικές επεξεργασίες μπορεί να είναι είτε γραμμικές ή μη γραμμικές. Στην παρούσα

εργασία η δεκαδική μείωση του βακτηριακού πληθυσμού της *Yersinia enterocolitica* ακολούθησε το γραμμικό μοντέλο, αλλά σε δύο φάσεις. Οι εξηγήσεις μπορεί να είναι ποικίλες. Οι μικροοργανισμοί μπορεί να δημιούργησαν συσσωματώματα και ένα μικρό κλάσμα αυτών να αποδείχθηκε ανθεκτικότερο στην εφαρμογή της θερμικής επεξεργασίας της τσιπούρας σε σχέση με το σύνολο των υπόλοιπων κυττάρων, ανεξαρτήτως του μεγέθους του αρχικού εμβολίου (Humpheson *et al.*, 1998; Smelt and Brul, 2014). Ωστόσο, στην παρούσα εργασία αυτό το φαινόμενο δύναται να οφείλεται στην αυξανόμενη θερμοκρασία των δειγμάτων τσιπούρας τα οποία ήταν ενοφθαλμισμένα με το συγκεκριμένο παθογόνο. Αρχικά, η θερμοκρασία ήταν χαμηλότερση (υψηλότερος χρόνος δεκαδικής μείωσης και άρα αργός ρυθμός θανάτου), ενώ καθώς η θερμοκρασία αυξανόταν, προέκυψε χαμηλότερος χρόνος δεκαδικής μείωσης και άρα πιο γρήγορος ρυθμός θανάτου.

Από την άλλη πλευρά, σε δείγματα κοτόπουλου εμβολιασμένα με *Listeria monocytogenes* τα οποία θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων στους 85 °C για 28 min το συγκεκριμένο παθογόνο δεν ανιχνεύτηκε, ενώ όταν η θερμοκρασία άγγιξε τους 70 °C και παρέμεινε σταθερή για τουλάχιστον 2 min σε όλο το τρόφιμο, υπήρξε ουσιαστική μείωση του πληθυσμού (Coote *et al.*, 1991). Οι τιμές θερμικού θανάτου για την *Salmonella* Typhimurium σε βόειο κρέας το οποίο θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο για 61 έως 62 min (51.6 °C), κυμάνθηκαν από 3.8 έως 4.2 min (57.2 °C) και από 0.6 έως 0.7 min (62.7 °C) (Goodfellow and Brown, 1978). Έτσι, κατά τη θέρμανση του βόειου κρέατος με εσωτερικές θερμοκρασίες 34, 61, και 75 ^{o}C, το μαγείρεμα σε υψηλή θερμοκρασία (232 ± 6 ^{o}C) σε συμβατικό φούρνο είναι πιο αποτελεσματικό για την βακτηριακή καταστροφή σε σχέση με το μαγείρεμα σε φούρνο χαμηλής θερμοκρασίας (149 ± 6 ^{o}C) (Crespo and Ockerman, 1977). Ακόμη, προσδιορίστηκαν οι τιμές θερμικού θανάτου για τα παθογόνα βακτήρια *Salmonella spp.* και *Listeria monocytogenes* σε υγρό κρόκο αυγού (pH = 6.3) και υγρό ασπράδι αυγού (pH = 8.2 και 9.1). Για την *Salmonella spp.* οι τιμές θερμικού θανάτου κυμάνθηκαν από 0.087 min (στους 62.2 °C) έως 0.28 min (στους 60°C) στον κρόκο αυγού και από 1.00 min (στους 58.3 °C) έως 7.99 min (στους 55.1 ^{o}C) στο ασπράδι αυγού (pH = 8.2). Για την *Listeria monocytogenes* οι τιμές θερμικού θανάτου κυμάνθηκαν από 0.58 min (στους 62.2 °C) έως 1.34 min (στους 60 °C) στον κρόκο αυγού και από 2.41 min (στους 58.3 °C) έως 7.59 min (στους 55.1 °C) στο ασπράδι αυγού (pH = 9.1) (Schuman and Sheldon, 1997). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η αδρανοποίηση της *Listeria monocytogenes* Scott A κατά την διάρκεια της θέρμανσης

προϊόντων αυγών (υγρό ολόκληρο αυγό, υγρό ολόκληρο αυγό με 10 % NaCI, υγρό ολόκληρο αυγό με 10 % σακχαρόζη, κρόκος αυγού με 10 % NaCl, κρόκος αυγού με 10 % σακχαρόζη), σε έλαιο θερμοκρασίας από 58 έως 70 °C, φάνηκε να επηρεάζεται από τον τύπου του τροφίμου. Η υψηλότερη τιμή αδρανοποίησης καταγράφηκε στο ολόκληρο υγρό αυγό, ενώ η υψηλότερη τιμή επιβίωσης καταγράφηκε στα προϊόντα υγρού ολόκληρου αυγού με 10 % NaCI και στον κρόκο αυγού με 10 % NaCl. Όμως, το σημαντικότερο εύρημα ήταν ότι οι συνθήκες παστερίωσης (υψηλή θερμοκρασία – σύντομος χρόνος) για τα υγρά προϊόντα αυγών δεν φάνηκε να εξασφαλίζουν την ασφάλεια αυτών των προϊόντων όσον αφορά την *Listeria spp.*, ειδικά τα προϊόντα αυγών με αλάτι (Bartlett and Hawke, 1995). Επιπλέον, φιλέτα γατόψαρου εμβολιάσθηκαν με παθογόνα βακτήρια *Listeria monocytogenes* και *Aeromonas hydrophila* και μαγειρεύτηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων (650 Watts) με εσωτερικές θερμοκρασίες 55, 60 και 70 ^{o}C. Τα φιλέτα αφέθηκαν ακάλυπτα είτε καλύφθηκαν. Στους 60 ^{o}C ο πληθυσμός της *Listeria monocytogenes* μειώθηκε κατά 4 $\log_{10}$ CFU / g για τα φιλέτα τα οποία ήταν καλλυμένα και κατά 2 $\log_{10}$ CFU / g για τα ακάλυπτα. Ο πληθυσμός της *Aeromonas hydrophila* μειώθηκε σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα για τα καλυμμένα φιλέτα στους 70 ^{o}C (Huang *et al.,* 1993). Οι Juneja and Marmer, (1999) μελέτησαν την θερμική αδρανοποίηση του παθογόνου βακτηρίου *Escherichia coli* O157:H7 σε γαλοπούλα, αρνί και χοιρινό. Τα δείγματα συσκευάστηκαν και θερμάνθηκαν σε υδατόλουτρο στους 55, 57.5, 60, 62.5, 65 ^{o}C. Οι τιμές του θερμικού θανάτου ήταν 11.51, 3.59, 1.89, 0.81 και 0.29 min, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, στο άπαχο κρέας κοτόπουλου και βόειου οι τιμές ήταν 21.13, 4.95, 3.17, 0.93 και 0.39 min, αντίστοιχα (Juneja *et al.,* 1997a), ενώ σε βόειο μπιφτέκι που μαγειρεύτηκε στους 137 ^{o}C για 2.25 έως 4 min και με εσωτερική θερμοκρασία 68.3 °C υπήρξε μείωση του πληθυσμού κατά 4 $\log_{10}$ CFU / g (Juneja *et al.,* 1997b). Οι Fain *et al.,* (1989) μελέτησαν την θερμική αδρανοποίηση της *Listeria monocytogenes* Scott A σε άπαχο (2.0 %) και με λίπος (30.5 %) βόειο κρέας και σε στήθος γαλοπούλας τα οποία θερμάνθηκαν στους 51.7 °C (0, 30, 60, 120, 180, 240, 300 min), στους 57.2 °C (0, 1,2, 4, 8, 10, 15, 20, 25, 30 min), στους 62.7 °C (0, 0.25. 0.50, 0.75, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 10.0 min), στους 68.3 °C (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 min) και στους 71.1 °C (0, 0.25, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 min). Αναφέρουν ότι οι τιμές θερμικής αδρανοποίησης για το άπαχο κρέας, αλλά και για το κρέας με λίπος ήταν 81.3 και 71.1 min, 2.6 και 5.8 min, 0.6 και 1.2 min, 0.5 και 1.1 min, αντίστοιχα. Για το στήθος γαλοπούλας στους 71.1 °C δεν προσδιορίστηκαν θερμικοί χρόνοι

αδρανοποίησης λόγω τεχνικών προβλημάτων που προέκειψαν κατά τη διάρκεια του πειράματος. Ακόμη, μελετήθηκε η θερμική αδρανοποίηση της *Listeria innocua* σε χαβιάρι σολωμού (*Oncorhynchus keta*) που περιείχε 2.5 % αλάτι, τοποθετημένο σε υδατόλουτρο στους 60, 63, και 65 ^{o}C σε δοκιμαστικούς σωλήνες αλουμινίου και σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Οι τιμές θερμικού θανάτου ήταν 2.97, 0.77, 0.40 min και 3.55, 0.84, 0.41 min, αντίστοιχα (Al-Holy *et al.,* 2004). H Rajkowski, (2012) μελέτησε την θερμική αδρανοποίηση της *Escherichia coli* O157:H7 και της *Salmonella enteritidis* Enteritidis σε φιλέτα γατόψαρου και τιλάπιας τα οποία συσκευάστηκαν και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 55, 60, 65 ^{o}C για 0 έως 1200 sec. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για την *Salmonella enteritidis* Enteritidis οι τιμές θερμικού θανάτου και για τα δύο ψάρια ήταν 425-450 sec, 27.1-51.4 sec, 2.04-3.8 sec, αντίστοιχα, ενώ για την *Escherichia coli* O157:H7 ήταν 422-564 sec, 45.2-55.5 sec, 3.3-4.2 sec, αντίστοιχα. Οι Murphy *et al.,* (2001) εμβολίασαν μπουρεκάκια στήθους κοτόπουλου με *Salmonella spp.* και *Listeria innocua* και θέρμαναν τα προϊόντα σε συμβατικό φούρνο στους 149 ^{o}C με εσωτερική θερμοκρασία τροφίμου από 55 έως 80 ^{o}C. Αναφέρουν ότι η αύξηση της θνησιμότητας των συγκεκριμένων παθογόνων βακτηρίων αυξήθηκε με την αύξηση της εσωτερικής θερμοκρασίας του τροφίμου. Σε άλλη μελέτη, ο εμβολιασμός των τροφίμων (προϊόντα κοτόπουλου, γαλοπούλας, λουκάνικα, προϊόντα βοείου κρέατος) έγινε με *Salmonella spp.* και *Listeria innocua* και τα τρόφιμα θερμάνθηκαν σε υδατόλουτρο από 55 έως 70 ^{o}C. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τιμές του θερμικού θανάτου για την *Salmonella spp.* και την *Listeria innocua* ήταν από 26.97 έως 0.25 min και από 191.94 έως 0.18 min, αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ότι η *Listeria innocua* ήταν η πιο θερμοάντοχη σε όλα τα προϊόντα (Murphy *et al.,* 2002). Τέλος, μελετήθηκε η θερμική αδρανοποίηση της *Escherichia coli* O157:H7, της *Salmonella spp.* και της *Listeria monocytogenes* σε χοιρινό στις προαναφερθήσες θερμοκρασίες και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τιμές ήταν από 33.44 έως 0.048 min, από 45.87 έως 0.083 min και από 47.17 έως 0.085 min, αντίστοιχα (Murphy *et al.,* 2004). Αντιθέτως η θερμική αδρανοποίηση της *Listeria monocytogenes* σε πουρέ φρούτου kiwi μετά από θέρμανση σε συμβατικό φούρνο και φούρνο μικροκυμάτων έδιεξε ότι η μείωση στον φούρνο μικροκυμάτων 900 W ($D_{60\,°C}$ = 17.35 sec) και 1000 W ($D_{60\,°C}$ = 17.04 sec) ήταν ταχύτερη σε σχέση με το συμβατικό φούρνο ($D_{60°C}$ = 37.45 sec) (Benlloch-Tinoco *et al.,* 2014). Επίσης, μελετήθηκε η θερμική αδρανοποίηση της *Salmonella enteritidis* και της *Escherichia coli* σε υγρό ολόκληρο αυγό και σε υγρό ασπράδι. Οι τιμές θερμικής αδρανοποίησης

για το υγρό ολόκληρο αυγό για την *Salmonella enteritidis* ήταν 5.70, 0.82, 0.27, 0.17 min για θερμοκρασίες 54, 56, 58, 60 ^{o}C, αντίστοιχα, ενώ για την *Escherichia coli* ήταν 9.10, 1.41, 0.67, 0.22 min, αντίστοιχα. Για το υγρό ασπράδι για την *Salmonella enteritidis* οι τιμές θερμικού θανάτου ήταν 6.12, 1.51, 0.42, 0.19 min,αντίστοιχα και για την *Escherichia coli* 10.18, 1.82, 0.78 και 0.28 min, αντίστοιχα (Jin *et al.,* 2008). Τέλος, ακτινοβολημένο κοτόπουλο εμβολιάσθηκε με *Yersinia pestis* και θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο στους 48.9, 50, 52.5, 55, 57.5, 60 ^{o}C. Οι τιμές θερμικής αδρανοποίησης ήταν 192.17, 34.38, 17.11, 3.87, 1.32, 0.56 min, αντίστοιχα (Porto-Fett *et al.,* 2009).

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι χρόνος θερμικής επεξεργασίας και η θερμοκρασία του πειράματος της συγκεκριμένης εργασίας επαρκούν για την ασφαλή κατανάλωση ιχθυρών.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το μαγείρεμα, είναι μια καλή μέθοδος καταστροφής και εξάλειψης παθογόνων μικροοργανισμών τα οποία μπορεί να βρίσκονται στα ψάρια και παραμένει ο μοναδικός και αξιόπιστο τρόπος προστασίας των καταναλωτών από τις τροφιμογενείς ασθένειες. Η επιλογή των χρόνων και της θερμοκρασίας έγιναν με κριτήριο τις θερμοκρασίες που χρησιμοποιούν τα εστιατόρια και τα νοικοκυριά για τη θερμική επεξεργασία των αλιευμάτων. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την θερμική αδρανοποίηση των μικροοργανισμών σε επιμολυσμένα τρόφιμα είναι το είδος του στελέχους του μικροοργανισμού, οι περιβαλλοντικές παράμετροι αύξησης, η σύσταση του τροφίμου, ο χρόνος και η θερμοκρασία μαγειρέματος. Επομένως, ο ρυθμός θερμικής αδρανοποίησης συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών χρειάζεται να μελετηθεί περαιτέρω για την καλύτερη γνώση των θερμοκρασιακών και χρονικών παραμέτρων ψησίματος των ψαριών, ενώ θα πρέπει να μελετηθούν εκτενέστερα και φαινόμενα προσαρμογής και ανθεκτικότητας των παθογόνων μικροοργανισμών στις θερμοκρασίες μαγειρέματος. Αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να φανούν χρήσιμα για παροχή συμβουλευτικών οδηγιών ψησίματος για τους καταναλωτές.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

1) **Adams, M. R. and Moss, M. O. (2008).** Chapter 4: The Microbiology of Food Preservation pp. 63-118. Chapter 6: Food Microbiology and Public Health. pp. 158-181. Chapter 7: Bacterial Agents of Foodborne Illness. pp. 262-267. Food Microbiology, Third Edition. Royal Society of Chemistry
2) **Al-Holy, M., Quinde, Z., Guan., D., Tang, J., Rasco, B. (2004).** Thermal inactivation of *Listeria innocua* in salmon (*Oncorhynchus keta*) caviar using conventional glass and novel aluminum thermal-death-time tubes. Journal of Food Protection. Vol. 67. N° 2. 383-386
3) **Barba, F. J., Kouba, M., Prado-Silva, L., Orlien, V., de Souza Sant'Ana, A. (2017).** Mild processing applied to the inactivation of the main foodborne bacterial pathogens: A review. Trends in Food Science & Technology 66. 20-35
4) **Bartlett, F. M. and Hawke, A. E. (1995).** Heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A and HAL 957E1 in various liquid egg products. Journal of Food Protection. Vol. 58. N° 11. 1211-1214
5) **Benlloch-Tinoko, M., Pina-Perez, M. C., Martinez-Navarrete, N., Rodrigo, D. (2014).** *Listeria monocytogenes* inactivation kinetics under microwave and conventional thermal processing in a kiwifruit puree. Innovative Food Science and Emerging Technologies 22. 131-136
6) **Blackburn W. C. and McClure P. J. (2002).** Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control. CRC Press
7) **Bolton, D. J., McMahon, A. M., Sheridan, J. J., McDowell, D. A., Blair, I. S., Harrington, D. (2000).** Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in minced beef under laboratory conditions and in sous-vide prepared minced and solid beef cooked in a commercial retort. Journal of Applied Microbiology 88. 626-632
8) **Bolton, D. J., Ivory, C., McDowell, D. (2013).** Thermal inactivation of *Yersinia enterocolitica* in pork slaughter plant scald tank water. Meat Science 95. 668-671

9) **Bottonne, E. J. (1997).** *Yersinia enterocolitica*: The Charisma Continues. Clinical Microbiology Reviews. 257-276

10) **Boziaris, I. S., Humpheson, L., Adams, M. R. (1998).** Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. International Journal of Food Microbiology 43. 7-13

11) **Coote, P. J., Holyoak, C. D., Cole, M. B. (1991).** Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* during a process simulating temperatures achieved during microwave heating. Journal of Applied Bacteriology 70. 489-494

12) **Crespo, F. L. and Ockerman, H. W. (1977).** Thermal Destruction of Microorganisms in Meat by Microwave and Conventional Cooking. Journal of Food Protection Vol. 40. N° 7.442-444

13) **Davies, A. R., Capell, C., Jehanno, Nychas, G. J. E., Kirby, R. M. (2001).** Incidence of foodborne pathogens on European fish. Food Control 12. 67-71

14) **Doyle, M. P. and Beuchat, L. R. (2007).** Food Microbiology-Fundamentals and Frontiers. II. Microbial Spoilage and Public Health Concerns, 6. Meat, Poultry, and Seafood pp. 105-140. III. Foodborne Pathogenic Bacteria, 14. *Yersinia enterocolitica* pp. 293-322. ASM Press

15) **Elbashir, S., Parveen, S., Schwarz, J., Rippen, T., Jahncke, M., DePaola, A. (2018).** Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A Review. Food Microbiology 70. 85-93

16) **Fain, A. R., Line, J. E., Moran, A. B., Martin, L. M., Lechowich, R. V., Carosella, J. M., Brown, W., B. (1991).** Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott A: D value and Z value determinations in ground beef and turkey. Journal of Food Protection. Vol. 54. N° 10. 756-761

17) **Favier, G. I., Escudero, M. E., De Guzman, A. M. S. (2007).** Thermal inactivation of *Yersinia enterocolitica* in liquid egg products. Journal of Food Safety 28. 157-169

18) **Feldhusen, F. (2000).** The role of seafood in bacterial foodborne diseases. Microbes and Infection 2. 1651-1660

19) **Goodfellow, S. J. and Brown,W. L., (1978).** Fate of *Salmonella* Inoculated into Beef for Cooking. Journal of Food Protection. Vol. 41. N° 8. 598-605

20) **Hajmeer, M. N., Fung, D. Y. C., Marsden, J. L., Milliken, G. A. (2001).** Effects of preparation method, age, and plating technique of thin agar layer

media on recovery of *Escherichia coli* O157:H7 injured by sodium chloride. Journal of Microbiological Methods 47. 249-253

21) **Harrison, D. L. (1980).** Microwave Versus Conventional Cooking Methods: Effects on Food Quality Attributes. Journal of Food Protection. Vol. 43. N° 8. 633-637

22) **Heddleson, R. A. and Doores, S. (1994).** Factors Affecting Microwave Heating of Foods and Microwave Induced Destruction of Foodborne Pathogens - A Review. Journal of Food Protection. Vol. 57. N° 11. 1025-1037

23) **Hudson, J. A., Mott, S. J., Delaey, K. M., Edridge, A. L. (1992).** Incidence and coincidence of *Listeria spp.*, motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* on ready-to-eat flesh foods. International Journal of Food Microbiology 16. 99-108

24) **Humpherson, L., Adams, M. R., Anderson, W. A.,Cole, M. B. (1998).** Biphasic thermal inactivation kinetics in *Salmonella enteritidis* PT4. Appl. Environ. Microbiol. 64. 459-464

25) **Jin, T., Zhang, H., Boyd, G., Tang, J. (2008).** Thermal resistance of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* K12 in liquid egg determined by thermal-death-time disks. Journal of Food Engineering 84. 608.614

26) **Huang, Y. W., Leung, C. K., Harrison, M. A., Gates, R. W. (1993).** Fate of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* on Catfish Fillets Cooked in a Microwave Oven. Journal of Food Science,Vol. 58. N° 3

27) **Juneja, V. K. and Marmer, B. S. (1999).** Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D- and z-value determinations in turkey, lamb and pork. Food Research International 32. 23-28

28) **Juneja, V. K. and Sofos, J. N. (2010).** Pathogens and Toxins in Foods-Challenges and Interventions. Chapter 11: *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* pp. 164-180. ASM Press

29) **Juneja, V. K., Snyder, O. P., Marmer, B. S. (1997a).**Thermal destruction of *Escherichia coli* 0157:H7 in beef and chicken: determination of D- and z-values. International Journal of Food Microbiology 35. 231-237

30) **Juneja, V. K., Snyder, O. P., Williams, A. C., Marmer, B. S. (1997b).** Thermal Destruction of *Escherichia coli* 0157:H7 in Hamburger. Journal of Food Protection. Vol. 60. N° 10. 1163-1166

31) **Kang, D. H. and Fung, D. Y. C. (2000).** Application of thin agar layer method for recovery of injured *Salmonella* Typhimurium. International Journal of Food Microbiology 54. 127-132

32) **Kang, D. H. and Siragusa, G. R. (1999).** Agar Underlay Method for Recovery of Sublethally Heat-Injured Bacteria. Applied and Environmental Microbiology. Vol 65. 5334-5337

33) **Khare, S. S., Kamat, A. S., Doctor, T. R., Nair, P. M. (1996).** Incidence of *Yersinia enterocolitica* and Related Species in Some Fish, Meat and Meat Products in India. J. Sci. Food Agric. 72. 187-195

34) **Labbe, R. G. and Garcia, S. (2001).** Guide to Foodborne Pathogens. 1. Globalization and epidemiology of foodborne disease pp. 1-25. 10. *Yersinia enterocolitica* pp. 177-187

35) **Lavieri, N. A., Sebranek, J. G., Cordray, J. C., Dickson, J. S., Jung, S., Manu, D. K., Mendonca, A. F., Brehm-Stecher, B. F., Stock, J., Stalder, K. J. (2014).** Evaluation of the Thin Agar Layer Method for the Recovery of Pressure-Injured and Heat-Injured *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection. Vol. 77, N° 5. 828-831

36) **Lovett, J., Bradshaw, J. G., Peeler, J. T. (1982).** Thermal Inactivation of *Yersinia enterocolitica* in Milk. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 44. N° 2. 517-519

37) **Murphy, R. Y., Beard, B. I., Martin, E. M., Dunkan, L. K., Marcy, J. A. (2004).** Comparative Study of Thermal Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, Salmonella, and *Listeria monocytogenes* in Ground Pork. Journal of Food Science. Vol. 69. N° 4.

38) **Murphy, R. Y., Dunkan, L. K., Johnson, E. R., Davis, M. D., Smith, J. N. (2002).** Thermal Inactivation D- and z-Values of *Salmonella* Serotypes and *Listeria innocua* in Chicken Patties, Chicken Tenders, Franks, Beef Patties, and Blended Beef and Turkey Patties. Journal of Food Protection. Vol. 65. N° 1. 53-60

39) **Murphy, R. Y., Johnson, E. R., Dunkan, L. K., Davis, M. D., Johnson, M. G., Marcy, J. A. (2001).** Thermal Inactivation of *Salmonella spp.* and *Listeria innocua* in the Chicken Breast Patties Processed in a Pilot-Scale Air-Convection Oven. Journal of Food Science, Vol. 65. N° 5

40) **Novoslavskij, A., Terentjeva, M., Eizenberga, I., Valciņa, O., Bartkevics, V., Bērziņš, A. (2015).** Major foodborne pathogens in fish and fish products: A review. Annals of Microbiology 66, 1-15

41) **Pagan, R., Manas, P., Raso, J., Trepat, F. J. S. (1999).** Heat resistance of *Yersinia enterocolitica* grown at different temperatures and heated in different media. International Journal of Food Microbiology 47. 59-66

42) **Papadopoulou, C., Economou, E., Zakas, G., Salamoura, C., Dontorou, C., Apostolou, J. (2007).** Microbiological and pathogenic contamination of seafood in Greece. Journal of Food Quality 30. 28-42

43) **Porto-Fett, A. C. S., Juneja, V. K., Tamplin, M. I., Luchansky, J. B. (2009).** Validation of Cooking Times and Temperatures for Thermal Inactivation of *Yersinia pestis* Strains KIM5 and CDC-A1122 in Irradiated Ground Beef. Journal of Food Protection, Vol. 72. N° 3. 564-571

44) **Rajkowski, K. T. (2012).** Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on catfish and tilapia. Food Microbiology 30. 427-431

45) **Schuman, J. D. and Sheldon, B. W. (1997).** Thermal resistance of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* in liquid egg yolk and egg white. Journal of Food Protection. Vol. 60. N° 6. 634-638

46) **Smelt, J. P.P.M. and Brul, S. (2014).** Thermal inactivation of microorganisms. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 54. 1371-1385

47) **Wu, V. C. H. (2008).** A review of microbial injury and recovery methods in food. Food Microbiology 25. 735-744

48) **Wu, V. C. H., Fung, D. Y. C., Kang, D. H., Thompson, I. K. (2001).** Evaluation of Thin Agar Layer Method for Recovery of Acid-Injured Foodborne Pathogens. Journal of Food Protection. Vol. 64, N° 7. 1067-1071

49) **Wu, V. C. H. and Fung, D. Y. H. (2001).** Evaluation of Thin Agar Layer Method for recovery of heat-injured foodborne pathogens. Journal of Food Science. Vol. 66. N° 4

50) **Wu, V. C. H., Qui, X., Hsieh, Y. H. P. (2008).** Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice with *Cornus* fruit (*Cornus officinalis Sieb. Et Zucc.*) extract by conventional media and thin agar layer method. Food Microbiology 25. 190-195

51) **Yuste, J. and Fung, D. Y. C. (2003).** Evaluation of *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* and *Staphylococcus aureus* counts in apple juice with

cinnamon, by conventional media and thin agar layer method. Food Microbiology 20. 365-370