



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Αδρανοποίηση *Escherichia coli* O157 κατά την θερμική
επεξεργασία τσιπούρας (*Sparus aurata*)»**

ΜΑΒΙΔΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΒΟΛΟΣ, 2020

**«Αδρανοποίηση *Escherichia coli* O157 κατά την θερμική επεξεργασία τσιπούρας
(*Sparusaurata*)»**

«Inactivation of *Escherichia coli* O157 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) **Κωνσταντίνος Κορμάς (M.Sc., Ph.D.)**, Καθηγητής, Μικροβιακή Οικολογία Υδάτινου Περιβάλλοντος, 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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλαν και βοήθησαν στην ολοκλήρωση της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον Επιβλέποντα καθηγητή, κ. Μποζιάρη Ιωάννη, για την πολύτιμη βοήθεια και την συνεχή υποστήριξή του, τόσο κατά τη συγγραφή της μελέτης όσο και κατά τη διεξαγωγή του πειράματος. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, η οποία αποτελείται από τις κα. Παναγιωτάκη Παναγιώτα και κα. Παρλαπάνη Φωτεινή, για τις πολύ σημαντικές συμβουλές και την καθοδήγηση που μου πρόσφεραν σε όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας. Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου για την αμέριστη βοήθεια, συμπαράσταση, κατανόηση, ανοχή και οικονομική ενίσχυση καθ' όλη τη διάρκεια των ακαδημαϊκών σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αδρανοποίηση του παθογόνου βακτηρίου *Escherichia coli* O157 κατά την θερμική επεξεργασία τσιπούρας (*Sparus aurata*). Για τον σκοπό αυτό ολόκληρα, απεντερωμένα ψάρια τσιπούρας τεμαχίσθηκαν σε μορφή ταρτάρ και εμβολιάστηκαν με εναιώρημα του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Το ταρτάρ τοποθετήθηκε σε μεταλλικούς περιέκτες και θερμάνθηκε στους 180 °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. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο πληθυσμός του *Escherichia coli* O157 μειώθηκε σταθερά (χρόνος δεκαδικής μείωσης 1.36 min) παρουσιάζοντας ταχεία μείωση του πληθυσμού.



Λέξεις-κλειδιά: *Escherichia coli* O157, τσιπούρα, θερμική αδρανοποίηση

ABSTRACT

The aim of this study was the inactivation of pathogenic bacterium *Escherichia coli* O157 during heat treatment of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). For this purpose, whole, gutted gilthead sea bream were sliced into tartare pieces inoculated with bacterial pathogens suspension. Tartare was placed into aluminum containers and heated at 180 °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. According to the results, population of *Escherichia coli* O157 decreased constantly (decimal reduction time 1.36 min), showing a rapid reduction of its population.

Keywords: *Escherichia coli* O157, sea bream, thermal inactivation

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	vi
 ABSTRACT	vii
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Τροφιμογενείς ασθένειες και κατανάλωση ιχθύων	1
1.2 Παθογόνο βακτήριο <i>Escherichia coli</i> O157	4
1.3 Θερμική επεξεργασία τροφίμων (μαγείρεμα)	6
1.4 Σκοπός εργασίας	9
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	10
2.1 Γενικά	10
2.2 Προετοιμασία θρεπτικών υλικών	10
2.3 Βακτηριακό στέλεχος και προετοιμασία εμβολίου	13
2.4 Προετοιμασία δειγμάτων	13
2.5 Διαδικασία θερμικής επεξεργασίας	14
2.6 Προετοιμασία δειγμάτων για απαρίθμηση μικροοργανισμών	14
2.7 Επώαση δειγμάτων και απαρίθμηση μικροοργανισμών	15
2.8 Προσδιορισμός του χρόνου δεκαδικής μείωσης πληθυσμών	16
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	16
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	19
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	22
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	23
6.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία	23
6.2 Ελληνική βιβλιογραφία	30

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τρόφιμα που καταναλώνει ο άνθρωπος, ακόμα και αποστειρωμένα, εμπεριέχουν ενώσεις οι οποίες εξαρτώνται από το είδος των εισαγόμενων μικροοργανισμών και τον τρόπο ανάπτυξης, επιβίωσης και αντίδρασής τους με το τρόφιμο. Αυτοίππορέχονται από τη φυσική μικροχλωρίδα των ωμών τροφίμων ή, συχνά, εισάγονται κατά τη διαδικασία συγκομιδής ή σφαγής, αποθήκευσης, επεξεργασίας ή διανομής και οφείλουν να βρίσκονται σε αριθμητική ισορροπία. Αυτή, ανάμεσα σε πολλά είδη μικροοργανισμών, καθορίζεται από τις ιδιότητες του τροφίμου, των μικροοργανισμών και τις συνθήκες αποθήκευσης και επεξεργασίας (Adams & Moss, 2008). Όταν διαταραχθεί, προκαλούνται τροφιμογενείς ασθένειες με συμπτώματα, όπως ο εμετός, η διάρροια κ.α (Käferstein et al., 1997).

Η παρακάτω Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία έχει ως σκοπό την ανάδειξη των τροφιμογενών ασθενειών και της εξάπλωσής τους, των μικροοργανισμών που τις προκαλούν αλλά και του τρόπου προστασίας από αυτές. Πιο συγκεκριμένα, αναλύει τον *Escherichia coli* O157, στοχεύει στην απόδοση της σημασίας της θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων για την πρόληψη εξάπλωσης των ασθενειών και την προστασία των καταναλωτών και παρουσιάζει τις μεθόδους καταμέτρησης των θερμικώς τραυματισμένων κυττάρων των μικροοργανισμών. Τέλος, παραθέτει και αναλύει τα υλικά, τις μεθόδους και τα δεδομένα ποσοτικοποίησης της αντοχής στην θερμότητα του προαναφερθέντος παθογόνου, με βάση τις τιμές D, όπως αυτά προέκυψαν από το πείραμα που διεξήχθη σε ιχθύες τσιπούρας, στον εργαστηριακό χώρο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

1.1 Τροφιμογενείς ασθένειες και κατανάλωση ιχθύων

Τα νωπά αλιεύματα παρουσιάζουν υψηλή θρεπτική αξία που οφείλεται στα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα (Domingo, 2007) αλλά καθίστανται ευπαθή στην αλλοίωση εξαιτίας της βιολογικής τους σύνθεσης (Ashie et al., 1996) και η μυϊκή τους φύση καθιστά την αλλοίωση αποτέλεσμα των αλλαγών των βιολογικών αντιδράσεων, όπως είναι η

οξείδωση των λιπιδίων, οι αντιδράσεις που συντελούνται από τις δραστηριότητες των ενζύμων αλλά και οι μεταβολικές δραστηριότητες των μικροοργανισμών (Jay, 1986).

Τα παθογόνα μικρόβια των ιχθύων προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο. Σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Υγείας, οι τροφιμογενείς ασθένειες ορίζονται ως «κάθε ασθένεια μολυσματικής ή τοξικής φύσης, που προκαλείται ή θεωρείται ότι προκαλείται από την κατανάλωση τροφής ή νερού», περικλείοντας το σύνολο των τροφιμογενών και υδατογενών ασθενειών (Adams & Moss, 2008). Αιτία της συχνής εμφάνισης της τροφικής δηλητηρίασης είναι η χρήση των τροφίμων από ορισμένους μικροοργανισμούς, ως πηγή τροφής τους για τον πολλαπλασιασμό τους την καταναλώνουν και την μεταβολίζουν, δημιουργώντας προβλήματα στον καταναλωτή. Γενικά, οι διάφορες τροφές ενδέχεται να προκαλέσουν μόλυνση, εξαιτίας της επαφής τους με μολυσμένες επιφάνειες, μολυσμένο νερό και με απόβλητα αλλά και εξαιτίας της παρουσίας μικροοργανισμών στα ζώα και τα φυτά από τα οποία προέρχονται (Bean & Griffins, 1990). Επιπλέον, η μόλυνση προέρχεται από το περιβάλλον διατήρησης των τροφίμων και τη διαδικασία επεξεργασίας τους, παράγοντες επηρεασμού του μικροβιακού τους φορτίου. Αυτοί συμπεριλαμβάνουν το pH, τη θερμοκρασία, την αλληλεπίδραση των διαφορετικών μικροοργανισμών, το υψηλό μεταθανάτιο pH (> 6,0) και την χαμηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (< 0,5%) (Gram & Huss, 1996).

- Τροφιμογενείς ασθένειες που οφείλονται σε ιούς

Τα τελευταία χρόνια, οι ιοί αναγνωρίζονται ως πηγές τροφιμογενών ασθενειών, έχουν αναγνωριστεί παραπάνω από 100 ανθρώπινοι εντερικοί ιοί. Υπάρχουν 2 είδη, με διαφορά στους ιστούς-στόχους προσβολής και ομοιότητα την είσοδο μέσω του εντέρου. Το πρώτο είδος, οι γαστρεντερικοί ιοί περιορίζονται στο έντερο και εντοπίζονται στα καρκινοειδή και τα μαλάκια ενώ το δεύτερο, οι ιοί της πολυομυελίτιδας και της ηπατίτιδας, προκαλούν ασθένειες μόλις μεταβούν σε άλλα όργανα (Adams & Moss, 2008). Οι ιογενείς τροφιμογενείς ασθένειες εντοπίζονται στα θαλασσινά, με τις κυριότερες από αυτές να είναι η ηπατίτιδα Α και Ε (Adams & Moss, 2008), η οξεία ιογενής γαστρεντερίτιδα από ροταϊό (*Rotavirus*) (Ανδρέου, 2011) και η γαστρεντερίτιδα από νοροϊό (NoV) (Adams & Moss, 2008). Η φυσική εισαγωγή των ιών στην τροφική αλυσίδα πραγματοποιείται από μολυσμένα άτομα που διαχειρίζονται την τροφή ή από μολυσμένο νερό, στο οποίο έχει απελευθερωθεί

περιττωματικό υλικό (Chadwick & MacCann, 1994a; Chadwick et al., 1994b; Patterson et al., 1997). Στα συμπτώματα συμπεριλαμβάνονται εμετός, υδαρής διάρροια κ.α (Djuretic et al., 1996).

- Τροφιμογενείς ασθένειες που οφείλονται σε βακτήρια

Τα πιο συχνά συναντώμενα βακτήρια στα αλιεύματα είναι αυτά των οικογενειών *Bacillus*, *Aeromonas*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Salmonella* και *Clostridium*. Το στέλεχος της οικογένειας *Bacillus*, *Bacillus cereus*, είναι Gram⁺, μεσόφιλο, σποριογόνο, αερόβιο, εμφανίζεται πολύ συχνά στα αλιεύματα, και η επιβίωσή του οφείλεται στην παραγωγή ενζύμων αλλοίωσης, όπως είναι η πρωτεάση, η αμυλάση κ.α. (Gibbs, 2002). Οι ασθένειες που του αποδίδονται είναι το «σύνδρομο της διάρροιας» και το «εμετικό σύνδρομο» (Andrews, 1992). Αυτό αναπτύσσεται σε θερμοκρασιακό εύρος 8 - 55 °C, με καλύτερη θερμοκρασία τους 28 - 35 °C (Adams & Moss, 2008). Επίσης, ακόμα ένα συχνό βακτήριο στα αλιεύματα είναι της οικογένειας *Aeromonas*, το *Aeromonas hydrophila*. Είναι Gram⁻, μεσόφιλο (Austin & Austin, 2012) και ανακτήθηκε από ψάρια του γλυκού νερού (Hettiarachchi & Cheong, 1994; Pathiratne et al., 1994) και είδη θαλάσσιων ψαριών (Larsen & Jensen, 1977). Αναπτύσσεται καλύτερα στους 28 °C και κάποια στελέχη του αναπτύσσονται και σε θερμοκρασίες κάτω των -0,1 °C (Adams & Moss, 2008). Η προκαλούμενη ασθένεια είναι η γαστρεντερίτιδα και περιλαμβάνει συμπτώματα όπως η ναυτία, η κεφαλαλγία, τα ρίγη και η διάρροια (Ανδρέου, 2011). Ακόμα ένα παθογόνο είναι της οικογένειας *Staphylococcus*, το *Staphylococcus aureus*, το οποίο είναι Gram⁺, μεσόφιλο, ασποριογόνο και αναερόβιο με θερμοκρασιακό εύρος ανάπτυξης 7 - 47,8 °C, καλύτερη θερμοκρασία τους 35 °C και βέλτιστο pH το 7 - 7,5 (Bennett et al., 2013). Η ασθένειά του εμφανίζει εμετό και κοιλιακό άλγος. Η μόλυνση επέρχεται κυρίως από ιχθύες και καραβίδες, που δεν έχουν διαχειριστεί και αποθηκευτεί θερμοκρασιακά σωστά (Health Protection Agency, 2001). Επόμενα βακτήρια είναι της οικογένειας *Pseudomonas*, είναι Gram⁻, ψυχρότροφα, ασποριογόνα, και αερόβια (Gram & Huss, 1996), συναντώνται ευρέως στην χλωρίδα των ιχθύων που συντηρούνται σε πάγο αλλά και σε φρέσκιες γαρίδες και στρείδια (Gram, 1993).

Επόμενα είναι τα βακτήρια της οικογένειας *Vibrio*, είναι Gram⁻, ασποριογόνα και συναντώνται στο φρέσκο και αλμυρό νερό (Colins et al., 2004). Ιδιαίτερη βαρύτητα δίδεται στο *V. parahemolyticus* το οποίο είναι μεσόφιλο (Todd, 2013) και συναντάται

σε γαρίδες (Austin & Austin, 2012), ψάρια, αστακούς, καβούρια και στρείδια, τα οποία έχουν μαγειρευτεί πριν την κατανάλωση (Andrews, 1992). Η συμπτωματολογία της ασθένειας είναι η αναίμακτη υδαρής διάρροια, το κοιλιακό άλγος, ο πυρετός και ο εμετός (Adams & Moss, 2008). Ακόμα, υπάρχουν τα βακτήρια του γένους *Salmonella*, που είναι αναερόβια και Gram⁻, η ανάπτυξη ευνοείται στις θερμοκρασίες 2 - 47 °C και pH 6,5 - 7,5. Τα συμπτώματα της σαλμονέλλωσης εκδηλώνονται με ναυτία, διάρροια, ρίγη και πυρετό. Η μόλυνση συναντάται στα ακατέργαστα θαλασσινά κ.α. (Pui et al., 2011). Το επόμενο βακτήριο είναι το *Clostridium botulinum*, Gram⁺, αναερόβιο και σποριογόνο βακτήριο (Ανδρέου, 2011), με ουδέτερο pH ανάπτυξης (Colins et al., 2004). Ο τύπος E του βακτηρίου, έχει συνδεθεί με την μόλυνση των ιχθύων και του ανθρώπου είτε από το υδάτινο περιβάλλον είτε από ωμά τρόφιμα, υπεύθυνα για ξεσπάσματα αλλαντίασης τύπου E (Adams & Moss, 2008). Επιπλέον, υπάρχει και το *Clostridium perfringens*, Gram⁺, αναερόβιο, σποριογόνο (Labbe, 1989; McClane & Rood, 2001), που αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 12 - 50 °C και εύρος pH 5 - 7,5 (Adams & Moss, 2008). Η συμπτωματολογία της ασθένειας εκδηλώνεται με κοιλιακές κράμπες, διάρροια, αέρια κ.α. (Andrews, 1992).

1.2 Παθογόνο βακτήριο *Escherichia coli* O157

Το παθογόνο *Escherichia coli* αποτελεί ένα συνηθισμένο κομμάτι της φυσιολογικής μικροχλωρίδας των εντέρων του ανθρώπου και άλλων θερμόαιμων ζώων και δεν δημιουργεί συχνά μολύνσεις. Ωστόσο, είναι αρκετά τα στελέχη με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά μολυσματικότητας, ικανά να δημιουργήσουν ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, όπως μολύνσεις του ουροποιητικού συστήματος και των νεφρών, σηψαιμία, διάρροια, μηνιγγίτιδα (Meng et al., 2007), αιμορραγική κολίτιδα, δυσεντερία, αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και πνευμονία (Bell & Kyriakides, 2002). Είναι Gram⁻, μεσόφιλο, αερόβιο, ασποριογόνο και παράγει καταλάση. Τα απομονώματά του διαφοροποιούνται ορολογικά με βάση 3 επιφανειακά αντιγόνα, που επιτρέπουν και την οροτυπία του, αυτά είναι τα O, H και K (Meng et al., 2007). Η αδρανοποίηση και εξάλειψή του επιτυγχάνεται με την υγρή θέρμανση στους 121 °C για τουλάχιστον 15 min ή την ξηρή θέρμανση στους 160 - 170 °C για τουλάχιστον 1 h ή από μεγάλο αριθμό απολυμαντών σε συνεργασία με τη θερμοκρασία, που συμπεριλαμβάνουν 70% αιθανόλη και 1% υποχλωριώδες νάτριο και από απολυμαντικά με βάση φαινόλες, ιώδιο, γλουταραλδεΰδη ή φορμαλδεΰδη (The

Center for Food Security and Public Health, 2016). Το τελευταίο επιβεβαιώνεται και από πείραμα που διεξήχθη σε βόειο κιμά, για την καταστροφή του στελεχούς *E. coli* O157:H7, η οποία και επηρεάστηκε από τις φαινολικές ενώσεις, που εμπεριέχονταν σε σκόνες λευκού και πράσινου τσαγιού και εκχυλίσματα της φλούδας μήλου (Juneja et al., 2009).

Υπάρχουν 4 κατηγορίες στελεχών, τα εντεροτοξινογόνα (ETEC), εντεροπαθογόνα (EPEC), εντεροδιεισδυτικά (EIEC) και εντεροαιμορραγικά (EHEC ή VTEC) (Meng et al., 2007). Τα στελέχη της πρώτης παράγουν 2 εντεροτοξίνες, 1 θερμοευαίσθητη (LT heat-labile) και 1 θερμοανθεκτική (ST heat-stable) (Adams & Moss, 2008) όπου η πρώτη καταστρέφεται στους 100 °C και προκαλεί διαρροϊκό σύνδρομο. Η δεύτερη είναι ανθεκτική στις θερμοκρασίες μέχρι τους 100 °C και προκαλεί διάρροια (Greenwood et al., 2012; Cabral, 2010; Αρσένη, 1994).

Η κατηγορία των EPEC, περιλαμβάνει τα στελέχη που ανήκουν στους οροτύπους O, H και K. Τα εντεροδιεισδυτικά, διεισδύουν στα επιθηλιακά κύτταρα του παχέως εντέρου, προκαλούν ταυτόσημο σύνδρομο με αυτό των *Shigella spp.* και η συμπτωματολογία εκδηλώνεται με πυρετό, διάρροια και κοιλιακό άλγος (Greenwood et al., 2012; Cabral, 2010; Αρσένη, 1994). Τα στελέχη της κατηγορίας EHEC ή VTEC είναι γνωστά με την ονομασία Vero-τοξινογόνα και αναγνωρίστηκαν από την παθογόνο δράση στα Vero-κύτταρα, που διαφοροποιείται από αυτή της LT. Η συμπτωματολογία διαφοροποιείται από άτομο σε άτομο, όμως, στις περισσότερες περιπτώσεις περιλαμβάνονται κοιλιακοί πόνοι, έμετος κ. α. (Greenwood et al., 2012; Cabral, 2010; Αρσένη, 1994). Τα στελέχη παράγουν *Shiga* τοξίνη, όμοια αυτήν του *Shigella dysenteriae* (Johnson et al., 1983) που συνδέθηκε με μολύνσεις από το *E. coli* (Karmali et al., 1985). Εδώ, κατατάσσεται και ο ορότυπος O157 (Bell & Kyriakides, 1998).

Μία μεγάλη γκάμα τροφίμων συνδέθηκε με τα ξεσπάσματα ασθενειών της κατηγορίας των EHEC και πιο συγκεκριμένα με το στέλεχος O157 (Bell & Kyriakides, 2002). Ένας από τους πιο επικίνδυνους ορότυπους είναι ο O157:H7 (Su & Li, 2004) με χαρακτηριστικό παράδειγμα επιδημία σε νηπιαγωγείο της Βόρειας Ουαλίας· μεγάλος αριθμός παιδιών παρουσίασε έντονη διάρροια και, σε ορισμένες περιπτώσεις, HUS και τα συμπτώματα αποδόθηκαν στην ύπαρξη του παθογόνου στελεχούς (Al-Jader et al., 1999). Το *E. coli* O157:H7 αποτελεί την κύρια πηγή εκδήλωσης του HUS, της αιμορραγικής κολίτιδας και της θρομβωτικής θρομβοκυτοπενικής πορφύρας (TTP) (Adams & Moss, 2008).

1.3 Θερμική επεξεργασία τροφίμων (μαγείρεμα)

Η θερμική επεξεργασία, δηλαδή η μεταφορά θερμότητας στα τρόφιμα χρειάζεται μεγάλη προσοχή για την αποφυγή εκδηλώσεων τροφικών δηλητηριάσεων, αλλοίωσης των θρεπτικών συστατικών αλλά και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Ως θερμική επεξεργασία ορίζεται η διαδικασία έκθεσης του τροφίμου σε υψηλή θερμοκρασία για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και η μετέπειτα ψύξη του σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή χαμηλότερη, με αποτέλεσμα την μείωση των μικροοργανισμών και την αδρανοποίηση των ενζύμων. Ανάλογα με την ένταση της θερμικής καταπόνησης, διακρίνονται 3 θερμικές διεργασίες: το μαγείρεμα, η παστερίωση και η αποστείρωση (Μπλούκας, 2004).

Οι θερμοκρασίες αλλά και ο χρόνος θέρμανσης χρησιμοποιούνται σε ένα μεγάλο φάσμα τιμών. Η τιμή της θερμοκρασίας θέρμανσης και ο χρόνος της είναι οι παράγοντες που καθορίζουν την ένταση της θερμικής επεξεργασίας, με βάση την οποία πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των θερμικών διεργασιών σε ήπιες και έντονες: στις πρώτες εντάσσεται η παστερίωση, ενώ στις δεύτερες το μαγείρεμα και η αποστείρωση (Rahman, 2007).

Η παστερίωση αποτελεί μία από τις σημαντικότερες θερμικές επεξεργασίες, για την καταστροφή όλων των παθογόνων και την ελαχιστοποίηση των υπόλοιπων μικροοργανισμών. Η σωστή εφαρμογή της επιτυγχάνεται με τον κατάλληλο συνδυασμό χρόνου θέρμανσης-θερμοκρασίας, ο οποίος εξαρτάται από το είδος του τροφίμου, τον μικροοργανισμό-στόχο αλλά και τις συνθήκες αποθήκευσης (Rahman, 2007). Η παστερίωση πραγματοποιείται σε εύρος θερμοκρασιών 60 – 80 °C, εφαρμόζεται για λίγα λεπτά και για 2 λόγους. Αρχικά, χρησιμοποιείται για την ελαχιστοποίηση συγκεκριμένων παθογόνων και δευτερευόντως για την μείωση μεγάλης ομάδας αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Ο αρχικός σκοπός χρήσης της είναι η διασφάλιση της δημόσιας υγείας και ο δεύτερος η επέκταση της διάρκειας ζωής του προϊόντος (Adams & Moss, 2008): επιπλέον, καταστρέφει όλα τα Gram⁻ αλλά και κάποια Gram⁺ βακτήρια (Jay et al., 2005).

Όσον αφορά τα αλιεύματα, η μέθοδος πραγματοποιείται μετά το θερμικό σφράγισμα του προϊόντος και εφαρμόζεται σε προϊόντα που πρόκειται να διανεμηθούν καταψυγμένα ή σε θερμοκρασία ψυγείου. Παραδείγματα τέτοιας παστερίωσης είναι το κρέας καβουριού και του αστακού και τα σχετικά με το surimi προϊόντα. Η παστερίωση μειώνει τους βακτηριακούς πληθυσμούς, οι οποίοι, συχνά,

περιορίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων μέσω του ανταγωνισμού. Ωστόσο, η μείωση αυτή ευνοεί την εμφάνιση νέων παθογόνων, που εισάγονται στο φαγητό μετά από την παστερίωση. Και αυτό γιατί η τελευταία επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής του αλιευτικού προϊόντος, παρέχοντας στα βακτήρια και τις τοξίνες περισσότερο χρόνο ζωής και ανάπτυξης (FDA, 2011).

Το μαγείρεμα αποτελεί μία θερμική διεργασία που εφαρμόζεται πριν το προϊόν τοποθετηθεί στο τελικό του δοχείο και η εφαρμογή του, συγκεκριμένα στα αλιεύματα, πραγματοποιείται όταν αυτά βρίσκονται σε θερμοκρασίες ψύξης ή κατάψυξης. Μετά το μαγείρεμα, τα αλιεύματα χαρακτηρίζονται ως τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση· παραδείγματα τέτοιων τροφίμων είναι η σάρκα καβουριών και αστακών, οι μαγειρεμένες γαρίδες κ.α. (FDA, 2001). Σε περίπτωση μη επαρκούς μαγειρέματος ενδέχεται να επιβιώσουν παθογόνα που προκαλούν πολλές επικίνδυνες συνθήκες για τα αλιεύματα, όπως είναι η απευθείας μόλυνση με παθογόνα, η μείωση ή εξαφάνιση άλλων, λιγότερο ανθεκτικών στη θερμότητα, μικροοργανισμών, που όταν παρίστανται στο αλιεύμα, μπορούν να καταστείλουν την ανάπτυξη των παθογόνων ή να προκαλέσουν συντομότερη αλλοίωση πριν από μία συγκεκριμένη ανάπτυξη παθογένειάς τους (Rippen, 1998). Ένα είδος μαγειρέματος είναι το sous-Vide, που πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες και περιλαμβάνει αεροστεγώς κλεισμένες πλαστικές σακούλες τροφίμων πριν την θέρμανση. Συνήθως εφαρμόζεται σε θερμοκρασίες κάτω των 55 °C, γεγονός που στις περιπτώσεις των αλιευμάτων, δεν φαίνεται να αποτελεί συνιστώμενη πρακτική, καθώς δεν υφίστανται μελέτες που να καθορίζουν τον απαιτούμενο χρόνο χρήσης του συγκεκριμένου τρόπου μαγειρέματος για την μείωση του πληθυσμού των παθογόνων από 5 – 7 log₁₀ CFU/g (Horn & Hewitt, 2016)

Επίσης, υπάρχει και το μαγείρεμα σε φούρνο μικροκυμάτων, που χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στις περιπτώσεις κατεψυγμένων τροφίμων, τα οποία αποψύχονται και θερμαίνονται απότομα, μέσα σε λίγα λεπτά, ανάλογα με το μέγεθος του προϊόντος. Η μέθοδος δεν είναι απόλυτα αποδεκτή, αφού η απότομη εναλλαγή των πόλων των κυμάτων που παρέχονται από τον φούρνο, αναγκάζουν τα μόρια του νερού μέσα στο τρόφιμο να κινηθούν απότομα ώστε να συγχρονιστούν με την κίνηση των θερμών κυμάτων, με αποτέλεσμα να παράγεται θερμότητα τριβής· η θερμοκρασία του τροφίμου να ανεβαίνει πολύ γρήγορα, ανομοιόμορφα και απότομα. Καθώς η θέρμανση και το μαγείρεμα στον φούρνο μικροκυμάτων δεν γίνεται ομοιόμορφα, υπάρχει κίνδυνος, στις κρύες περιοχές να υφίστανται ακόμα μικρόβια (Ray, 2005).

Κατά την αποστείρωση καταστρέφονται όλοι οι βιώσιμοι μικροοργανισμοί που μπορούν να μετρηθούν με την κατάλληλη τεχνική επάλειψης ή απαρίθμησης. Το αντιπροσωπευτικότερο παράδειγμα αποστείρωσης είναι τα κονσερβοποιημένα προϊόντα, τα οποία ονομάζονται «εμπορικά αποστειρωμένα», καθώς τονίζεται η απουσία βιώσιμων οργανισμών ανιχνεύσιμων από τις παραδοσιακές μεθόδους καλλιέργειας ή τον χαμηλό αριθμό επιζώντων (Jelen, 1982).

Η επίδραση του pH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποστείρωση, γι' αυτό και τα τρόφιμα χωρίζονται σε χαμηλής οξύτητας ($> 4,5$), μέσης οξύτητας ($4,2 < \text{pH} \leq 4,5$), όξινα ($3,8 < \text{pH} \leq 4,2$) και υψηλής οξύτητας ($\leq 3,8$). Η πληθώρα των μικροοργανισμών παρουσιάζουν καλύτερες τιμές $\text{pH} > 6$, όπου και απαιτείται η πλήρης αποστείρωση. Στα τρόφιμα που εντάσσονται στη χαμηλή και μέση οξύτητα, όπου και αναπτύσσονται σποριογόνα βακτήρια, η μείωση του πληθυσμού των σπορίων κατά $12 \log$ κύκλους, με την θερμική επίδραση, καθιστά ασφαλές προς κατανάλωση το εκάστοτε τρόφιμο (Prokhorov & Tanchev, 2007). Στην περίπτωση των όξινων τροφίμων, η ανάπτυξη των σποριογόνων βακτηρίων είναι αδύνατη, με αποτέλεσμα η θερμική επεξεργασία να είναι ηπιότερη· χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα είδη του γένους *Clostridium*. Όταν αυτά ανιχνευτούν στα τρόφιμα, θερμαίνονται στους $100 \text{ }^\circ\text{C}$ για την επιθυμητή διάρκεια χρόνου και είτε πρώτα συσκευάζονται και έπειτα θερμαίνονται είτε το αντίστροφο (Ray, 2005). Η «εμπορική αποστείρωση» επηρεάζεται από την θερμική αντίσταση των μικροοργανισμών, την παρουσία ενζύμων, όταν το $\text{pH} < 4,6$, το μέγεθος του δοχείου, τη χημική σύσταση, τη φυσική κατάσταση του τροφίμου, την εσωτερική του θερμοκρασία, τον μηχανισμό ανταλλαγής θερμότητας, τη θερμοκρασία της αποστείρωσης και την κατάσταση του δοχείου κατά τη διάρκεια της αποστείρωσης· δηλαδή, αν είναι σταθερό, αν κινείται, αν περιστρέφεται κ.α. (Prokhorov & Tanchev, 2007).

- Αντίσταση στη θερμοκρασία

Ένας από τους παράγοντες επηρεασμού της αντίστασης στη θερμότητα είναι το νερό· όσο αυξάνεται η υγρασία του περιβάλλοντος, των υλικών και η ενεργότητα του νερού (a_w), τόσο αυξάνεται και η αντίσταση των μικροβιολογικών κυττάρων (Gaillard et al., 1998). Ακόμα ένας παράγοντας είναι η παρουσία λιπιδίων· όπου αυτά παρίστανται, η αντίσταση των μικροοργανισμών αυξάνεται, ως αποτέλεσμα του επηρεασμού της κυτταρικής υγρασίας (Sugiyama, 1951). Τρίτος παράγοντας είναι τα

άλατα· η δράση τους ποικίλλει και εξαρτάται από το είδος τους, την συγκέντρωσή τους και από άλλους παράγοντες. Κάποια άλατα έχουν προστατευτική επίδραση και άλλα έχουν την τάση να μετατρέπουν τα κύτταρα σε πιο θερμοευαίσθητα. Μάλιστα, μερικά άλατα μειώνουν την a_w και αυξάνουν την αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες και άλλα αυξάνουν την a_w , με συνέπεια να αυξάνεται και η ευαισθησία στη θερμότητα. Ακόμα ένας παράγοντας είναι η ύπαρξη υδαταναθράκων, καθώς οι μεγάλες συγκεντρώσεις τους ευθύνονται για την αύξηση της ενεργότητας του νερού (Jay et al., 2005).

Επόμενος παράγοντας είναι το pH· όσο το pH μεταβάλλεται τόσο μεταβάλλεται και η αντίσταση στη θερμότητα (White, 1963; Gaillard et al, 1998). Έκτος παράγοντας είναι η παρουσία πρωτεϊνών και άλλων ουσιών, καθώς οι πρώτες παρουσιάζουν προστατευτική δράση· όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα του φαγητού σε πρωτεΐνες, τόσο υψηλότερη θερμική επεξεργασία επιβάλλεται. Επιπροσθέτως, ένας ακόμα παράγοντας είναι ο πληθυσμός των μικροοργανισμών· σε περίπτωση μεγάλης συγκέντρωσης μικροοργανισμών επιβάλλεται και μεγαλύτερη θερμική επεξεργασία. Όγδοος είναι η ηλικία των μικροοργανισμών· τα κύτταρα των βακτηρίων συνηθίζουν να είναι πιο θερμοανθεκτικά στη στατική φάση ανάπτυξης και λιγότερο ανθεκτικά στη λογαριθμική φάση. Ένας επιπλέον παράγοντας είναι η θερμοκρασία ανάπτυξης, που σημαίνει ότι όσο η θερμοκρασία επώασης αυξάνεται, αυξάνεται και η ανθεκτικότητα στη θερμότητα, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις των σποριογόνων μικροοργανισμών. Τέλος, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι αναστολείς του τροφίμου. Αυτό σημαίνει ότι η μείωση της ανθεκτικότητας στη θερμότητα προκαλείται από την παρουσία, κατά τη διάρκεια της θέρμανσης του τροφίμου, πολλών αντιβιοτικών ανθεκτικών στη θερμότητα, όπως είναι το διοξείδιο του θείου (SO_2) (Jay et al., 2005).

1.4 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 °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 *Escherichia coli* O157 μετά από εμβολιασμό του στη σάρκα των ιχθύων (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 LABM (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 γλωριούχου νατρίου και 1.0 g πεπτόνης και στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.

- Tryptone Soy Broth, TSB

Το TSB είναι θρεπτικός ζωμός γενικής χρήσης ο οποίος επιτρέπει την ανάπτυξη σχεδόν όλων των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν 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 30g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °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 των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν 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 °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 °C, στη συνέχεια μοιράστηκε σε τρυβλία Petri. Το τελικό pH ήταν 7.4 ± 0.2 .

2.3 Βακτηριακό στέλεχος και προετοιμασία εμβολίου

Το συγκεκριμένο στέλεχος 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 το οποίο ήταν γενετικά τροποποιημένο για να είναι ατοξινογόνο. 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 επώασθηκε στους 37 °C για 24 h. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με τη μέθοδο της φυγοκέντρησης (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

Λήφθηκαν 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 εμβολιάστηκαν με 0.2 ml βακτηριακού εναιωρήματος *Escherichia coli* O157. Αναμείχθηκαν με

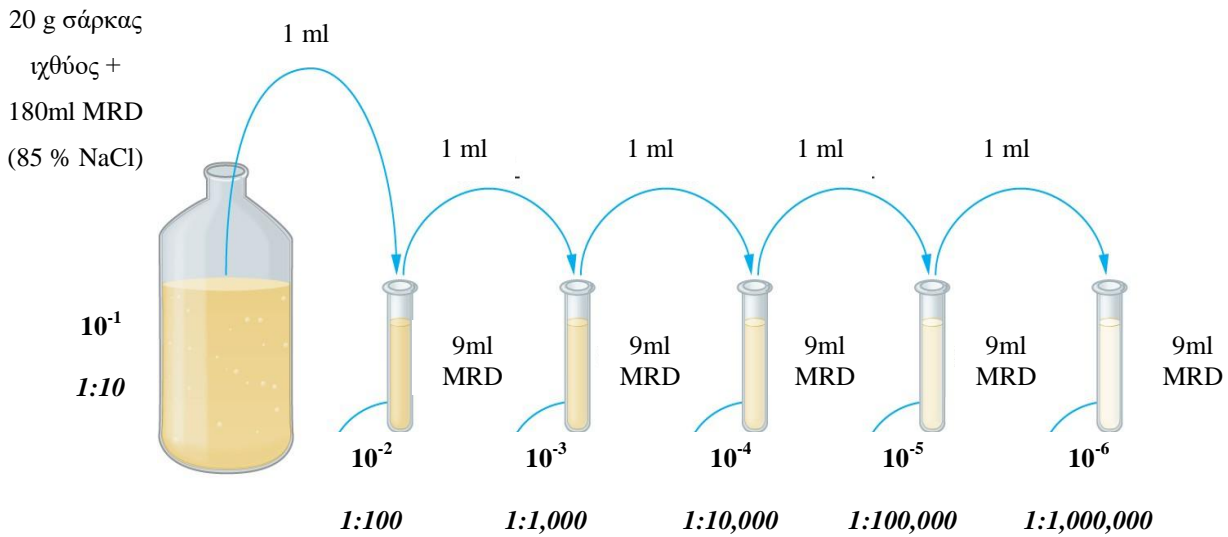
αποστειρωμένη λαβίδα, έτσι ώστε το εμβόλιο να κατανεμηθεί σε όλη τη σάρκα, καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και αφέθησαν για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό να απορροφηθεί το εμβόλιο.

2.5 Διαδικασία θερμικής επεξεργασίας

Οι μελέτες θερμικής αδρανοποίησης πραγματοποιήθηκαν σε εμπορικό φούρνο ψησίματος με ελεγχόμενη και σταθερή θερμοκρασία στους 180 °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 λήφθηκαν ασηπτικά 20 g σάρκας τσιπούρας, εις τριπλούν ($n = 3$), και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένη σακούλα Stomacherπου 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 αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου.

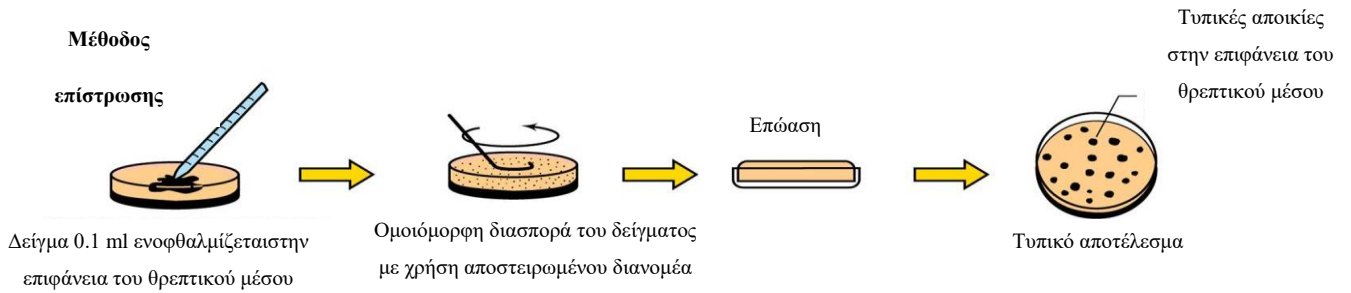


Εικόνα 2.6. Διαδικασία μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας των βακτηρίων, με τηνεφαρμογή σειράς διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος.

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

2.7 Επώση δειγμάτων και απαρίθμηση μικροοργανισμών

Ο μικροοργανισμός που απαριθμήθηκε ήταν το *Escherichia coli* O157 σε VRBGA με επικάλυμμα TSA, μετά από επώση των τρυβλίων στους 37 °C για 48 - 72 h, με καταμέτρηση των κόκκινων/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 ρυθμού θανάτου

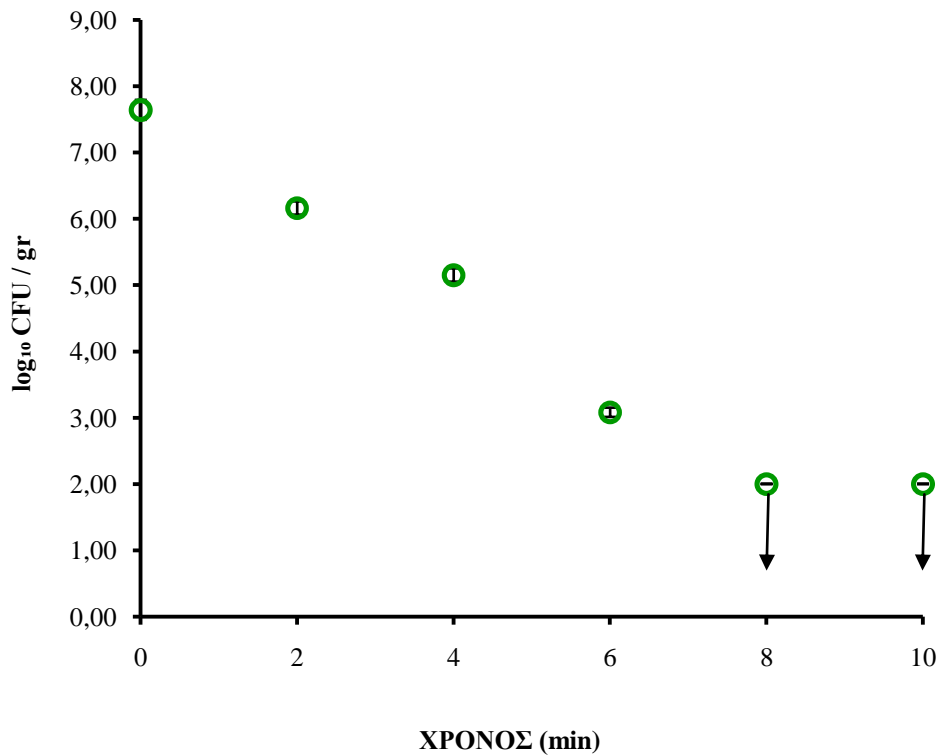
Ως τιμή D ορίζεται ο χρόνος που απαιτείται για να μειωθεί ο πληθυσμός ενός μικροοργανισμού κατά 90 % μετά από θέρμανση σε σταθερή θερμοκρασία. Υψηλή τιμή σημαίνει χαμηλός ρυθμός θανάτου. Στο συγκεκριμένο πείραμα η θερμοκρασία στο προϊόν δεν ήταν σταθερή, αλλά συνεχώς αυξανόμενη οπότε δεν μπορούμε να μιλάμε για τιμή D, ωστόσο υπολογίσθηκε η τιμή του ρυθμού θανάτου 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 *Escherichia coli* O157 σε σάρκα τσιπούρας μετά την θερμική επεξεργασία στους 180 °C, για χρονικό διάστημα 2, 4, 6, 8 και 10 min, σε εμπορικό φούρνο ψησίματος παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.1** και στο **Σχήμα 3.1**.

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

Time (min)	\log_{10} cfu / g	StDev
0	7,64	0,15
2	6,16	0,10
4	5,15	0,10
6	3,08	0,07
8	< 2,00	-
10	< 2,00	-

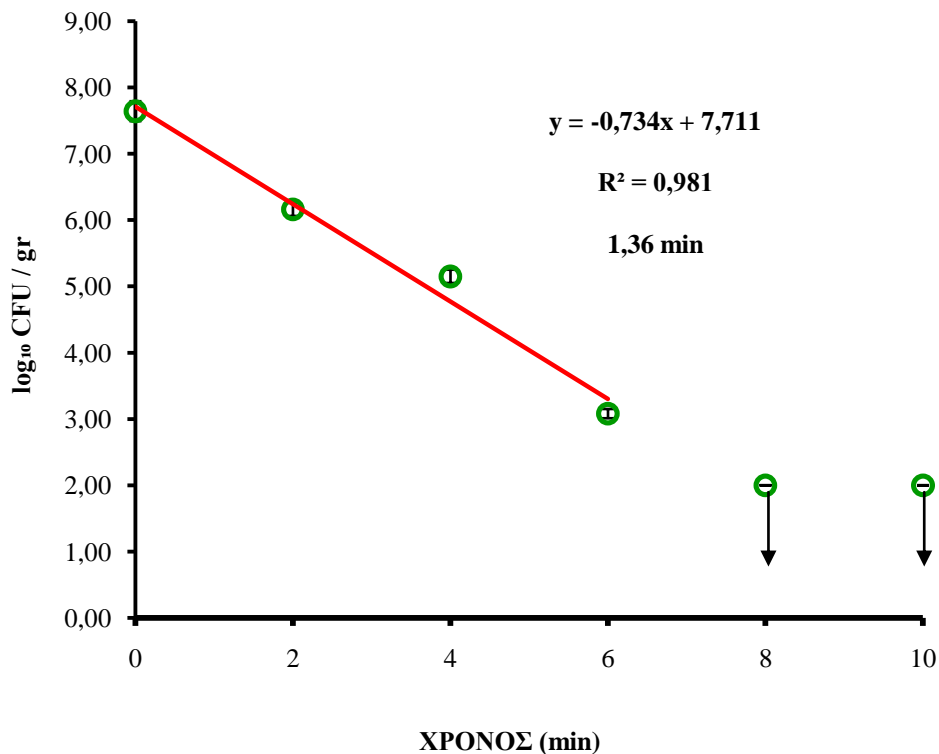


Σχήμα 3.1. Λογαριθμική μείωση (\log_{10} cfu / g) του πληθυσμού του παθογόνου βακτηρίου *Escherichia coli* O157 σε σάρκα τσιπούρας μετά την θερμική επεξεργασία στους 180 °C σε εμπορικό φούρνο ψησίματος. Οι διασπορές παρουσιάζουν τους μέσους όρους \pm τυπικές αποκλίσεις ($n = 3$). Τα βέλη υποδεικνύουν ότι οι συγκεκριμένες ήταν ήταν κάτω του επιπέδου ανίχνευσης των 2.00 \log_{10} cfu/g

Αρχικά ο πληθυσμός των βακτηρίων χωρίς θερμική επεξεργασία ήταν 7.64 ± 0.15 \log_{10} cfu/g. Μετά από 2 min ψησίματος ο πληθυσμός μειώθηκε στους 6.16 ± 0.10

\log_{10} cfu/g, ενώ μετά από 4 min ο πληθυσμός άγγιξε τους $5.15 \pm 0.10 \log_{10}$ cfu/g και τελικά έπεσε στους $3.08 \pm 0.07 \log_{10}$ cfu/g μετά από 6 min. Τέλος, μετά τα 8 min 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 *Escherichia coli* O157 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 *Escherichia coli* O157 σε σάρκα τσιπούρας μετά την θερμική επεξεργασία στους $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$ σε εμπορικό φούρνο ψησίματος. Οι τιμές παρουσιάζουν τους μέσους όρους \pm 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 βέλη υποδεικνύουν ότι οι συγκεκριμένες ήταν κάτω του επιπέδου ανίχνευσης των $2.00 \log_{10}$ cfu/g

Ο χρόνος δεκαδικής μείωσης του πληθυσμού ήταν $\left(-\frac{1}{-a}\right) = \left(-\frac{1}{-0.734}\right) = 1.36 \text{ min.}$

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρουσία των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae και συγκεκριμένα του παθογόνου βακτηρίου *Escherichia coli* O157 υποδηλώνει πιθανή μόλυνση των ψαριών από κόπρανα ή ανεπαρκή επεξεργασία (Labbe and Garcia, 2001). Ωστόσο, το μαγείρεμα, είναι μια καλή μέθοδος καταστροφής και εξάλειψης των παθογόνων μικροοργανισμών τα οποία μπορεί να βρίσκονται στα ψάρια και παραμένει ο μοναδικός και αξιόπιστο τρόπος προστασίας των καταναλωτών από τις τροφιμογενείς ασθένειες.

Οι Ulusoy et al., (2019) μελέτησαν την θερμική αδρανοποίηση των παθογόνων βακτηρίων *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus* σε σολομό και μπακαλιάρο στα 2450 MHz με εσωτερικές θερμοκρασίες 50 και 70 °C. Τα αποτελέσματα αναφέρουν ότι η *Escherichia coli* O157:H7 βρέθηκε κάτω των 2.00 log₁₀ cfu/cm² στους 50 °C και για τα δύο ψάρια, κάτι που δεν συνέβη για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Ωστόσο, στους 70 °C η *Escherichia coli* O157:H7 βρέθηκε κάτω των 2.00 log₁₀ cfu/cm², ενώ οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί βρέθηκαν κάτω του 1.00 log₁₀ cfu/cm². Στις Οδηγίες του FDA για τα θαλασσινά, τα ωμά ψάρια και οι τροφές που περιέχουν ωμά ψάρια, αναφέρεται η συνολική θέρμανσή τους στους 63 °C για πάνω από 15 sec (FDA, 1999). Επιπλέον, δείγματα γαλοπούλας, αρνιού και χοιρινού εμβολιάστηκαν με *Escherichia coli* O157:H7, συσκευάστηκαν και θερμάνθηκαν σε υδατόλουτρο στους 55, 57.5, 60, 62.5, 65 °C. Οι τιμές του θερμικού θανάτου ήταν 11,51, 3,59, 1,89, 0,81 και 0,29 min, αντίστοιχα (Juneja and Marmer, 1999). 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 °C για 2.25 έως 4 min και με εσωτερική θερμοκρασία 68.3 °C υπήρξε μείωση του πληθυσμού κατά 4.00 log₁₀ cfu/g (Juneja et al., 1997b). Η 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 °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.

Γενικότερα, θεωρείται ότι κατά τη θέρμανση του βόειου κρέατος με εσωτερικές θερμοκρασίες 34, 61, και 75 °C, το μαγείρεμα σε υψηλή θερμοκρασία (232 °C) σε συμβατικό φούρνο είναι πιο αποτελεσματικό για την βακτηριακή καταστροφή σε σχέση με το μαγείρεμα σε φούρνο χαμηλής θερμοκρασίας (149 °C) (Crespo and Ockerman, 1977). 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 °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). Επίσης, μελετήθηκε η θερμική αδρανοποίηση της *Escherichia coli* O157:H7, της *Salmonella spp.* και της *Listeria monocytogenes* σε χοιρινό σε συμβατικό φούρνο στους 149 °C με εσωτερική θερμοκρασία τροφίμου από 55 έως 80 °C 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).

Εκτός, όμως, από τη θερμική αδρανοποίηση της *Escherichia coli* σε αλιεύματα, έχει μελετηθεί και η αδρανοποίησή του σε άλλα προϊόντα κρέατος. Για παράδειγμα, σε μελέτη που ασχολήθηκε με την σύγκριση των συστημάτων ψησίματος DGB (ψησταριά και σχάρα διπλής όψης) και SSB (σχάρα μονής όψης) σε βόεια μπιφτέκια, απέδειξε ότι η πρώτη μέθοδος επέτυχε μείωση του πλυθυσμού του παθογόνου κατά 5,7 log₁₀ cfu/g στους 60 °C και 6,1 log₁₀ cfu/g στους 68 °C. Αντίθετα, η μέθοδος SSB, πέτυχε μείωση 1,8 log₁₀ cfu/g στους 60 °C και 2,9 log₁₀ cfu/g στους 68 °C. Επιπλέον, η πρώτη μέθοδος χρησιμοποιεί υψηλότερη, πιο ραγδαία αύξηση της θερμοκρασίας από τη δεύτερη, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνει την αδρανοποίηση και εξάλειψη του παθογόνου σε μεγαλύτερο βαθμό. Οι μετρήσεις χρόνου για τις 2 διαφορετικές μεθόδους ψησίματος ήταν, για το SSB, στους 60 °C, 9,94 min και στους 68 °C, 15,76 min, ενώ για το DGB στους 60 °C, 4,48 min και στους 68°C, 4,56 min, για την επίτευξη εξάλειψης του παθογόνου (D'Sa et al., 2000). Σε άλλη έρευνα που μελετά την αδρανοποίηση του παθογόνου *Escherichia coli* σε βόεια μπιφτέκια μαγειρεμένα σε προθερμασμένες ανοξείδωτες κατσαρόλες με αντικολλητική επίστρωση, για την επίτευξη εσωτερικής θερμοκρασίας 35 - 70°C, εξωτερικές θερμοκρασίες 160 °C, 180 °C ή 200 °C και ψήσιμο για διαφορετικό χρονικό διάστημα για την επίτευξη των 70

°C, αποδείχτηκε ότι υπήρξε μείωση του παθογόνου που άγγιξε τις 5 τάξεις σε θερμοκρασίες άνω των 60 °C και ολική αδρανοποίηση στους 70 °C. Ακόμα, παρατηρήθηκε μείωση του παθογόνου σε θερμοκρασιακό εύρος 55 – 60 °C, που άγγιξε τις 4 τάξεις σε όλες τις εσωτερικές θερμοκρασίες. Επιπλέον, υπήρξε μείωση του βακτηριακού πληθυσμού κάτω από το 1 cfu/g σε όλα τα δείγματα σε θερμοκρασία άνω των 65 °C. Επιπροσθέτως, για να επιτευχθεί η εσωτερική θερμοκρασία των 70 °C χρειάστηκαν 16,3 min σε προθερμασμένη κατσαρόλα των 160 °C, ενώ στους 200 °C χρειάστηκαν 9,3 min (Salmon et al., 2000). Οι Osaili et al., (2007) μελέτησαν την θερμική αδρανοποίηση των *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.* και *Listeria monocytogenes* σε παναρισμένα χοιρινά μπιφτέκια, με 23 % λιπαρά σε θερμοκρασίες 55, 57,5, 60, 62,5, 65, 67,5 και 70 °C. Τα αποτελέσματα των θερμικών χρόνων θανάτου ήταν από 32,11 έως 0,08 min για την *Escherichia coli* O157:H7, από 69,48 έως 0,29 min για την *Salmonella spp.* και από 150,46 έως 0,43 min για την *Listeria monocytogenes*. Καθώς τα ψάρια, συνήθως, αποτελούν τροφή πλούσια σε λιπαρά, είναι ανάγκη να αναφερθούν και άλλες έρευνες που ασχολήθηκαν με την αδρανοποίηση και εξάλειψη της *Escherichia coli* O157:H7 σε έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα και αναφέρουν τον πολύ σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η παρουσία ποσοστών λίπους. Για παράδειγμα μελετώντας λουκάνικα που περιείχαν 7 %, 10 % και 30 % λίπος, προέκυψε ότι οι τιμές θερμικής αδρανοποίησης για τους 55 °C, είναι 6,37, 7,83 και 11,28 min, αντίστοιχα, ενώ στους 60 °C, οι τιμές ήταν 0,37, 0,46 και 0,55 min, στα αντίστοιχα ποσοστά λίπους (Ahmed et al., 1995). Ακόμα σε μελέτη που διεξήχθη σε βόειο κιμά με ποσοστό λίπους 30 % και σε άπαχο βόειο κιμά, 2 % λίπος, σε θερμοκρασίες 57,2 και 62,8 °C, στην πρώτη περίπτωση, η τιμή του θερμικού θανάτου ήταν 5,3 και 0,47 min, αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση του άπαχου κρέατος, η αντίστοιχες τιμές ήταν 4,1 και 0,3 min (Line et al., 1991). Σε επόμενη μελέτη που ασχολήθηκε με την αδρανοποίηση 4 μειγμάτων με στελέχη του *Escherichia coli* σε αλεσμένο, 95% άπαχο κρέας κοτόπουλου, τα δείγματα του οποίου βυθίστηκαν σε επανακυκλοφορούμενο ζεστό νερό στις θερμοκρασίες 55, 60 και 65 °C για χρονικό διάστημα από 0 έως 40 min, προέκυψαν τιμές θερμικού θανάτου με εύρος 4,05 έως 7,65 min για τους 55 °C, 0,47 έως 0,56 min για τους 60 °C και 0,05 έως 0,09 min για τους 65 °C (Xu et al., 2019). Επιπροσθέτως, σε μελέτη για την αδρανοποίηση του συγκεκριμένου παθογόνου βακτηρίου σε βόειο κιμά με ποσοστό λίπους 19,1 %, σε θερμοκρασίες 55, 58, 61 και 63 °C, οι τιμές του θερμικού θανάτου ήταν 22,47, 2,05, 0,32 και 0,18 min, αντίστοιχα (Smith et al., 2001). Τέλος, οι

Kotrola et al., (1997) μελέτησαν την θερμική αδρανοποίηση της *Escherichia coli* O157:H7 σε προϊόντα γαλοπούλας (στήθος γαλοπούλας με 3 % και 11 % λίπος, λουκάνικο γαλοπούλας με 31 % λίπος, ζαμπόν γαλοπούλας με 11 % λίπος, λουκάνικο γαλοπούλας με 17 % λίπος) στους 52 έως 60 °C. Οι τιμές του θερμικού θανάτου κυμάνθηκαν από 44,9 έως 116 min (52 °C), από 6,63 έως 39,4 min (55 °C), από 2.20 έως 11,7 min (57 °C) και από 0,68 έως 5,86 min (60 °C), αντίστοιχα για κάθε προϊόν. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι το συγκεκριμένο βακτήριο επέδειξε μεγαλύτερη επιβίωση στα επεξεργασμένα προϊόντα σε σχέση με τα προϊόντα που δεν περιείχαν πρόσθετα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το είδος *Escherichia coli* είναι ένα εντερικό παθογόνο βακτήριο, θεωρείται δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης και προκαλεί τροφιμογενείς ασθένειες θανατηφόρες για τον άνθρωπο. Επιπλέον, το μαγείρεμα των τροφίμων, μέσω της θερμικής αδρανοποίησης, είναι ένας τρόπος καταστροφής των παθογόνων μικροοργανισμών. Η επιλογή των χρόνων και της θερμοκρασίας της παρούσας εργασίας έγιναν με κριτήριο τις θερμοκρασίες που χρησιμοποιούν τα εστιατόρια και τα νοικοκυριά για τη θερμική επεξεργασία των ψαριών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο χρόνος θερμικής επεξεργασίας και η θερμοκρασία των 180 °C που εφαρμόστηκαν στα ψάρια κρίνονται επαρκή για την ασφαλή κατανάλωση ψαριών, αφού ο χρόνος επεξεργασίας των 8 min ήταν επαρκής για να μειώσει τον πληθυσμό πάνω από 5 λογάριθμους (από την αρχική τιμή των 7.64 log₁₀ cfu/g σε κάτω από 2 log₁₀ cfu/g), με τον χρόνο δεκαδικής μείωσης του πληθυσμού του παθογόνου βακτηρίου να είναι 1.36 min. Ωστόσο προτείνεται η περαιτέρω έρευνα και μελέτη της θερμικής επεξεργασίας των ψαριών σε μικρότερες θερμοκρασίες αλλά και με διαφορετικούς τρόπους θερμικής επεξεργασίας έτσι ώστε να διαπιστωθεί ο καλύτερος τρόπος μαγειρέματος των συγκεκριμένων τροφίμων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

Adams, R. M. and Moss, O. M. (2008). Food Microbiology. RSC Publishing, Cambridge. UK

Ahmed, N. M., Conner, D. E., Huffman, D. L. (1995). Heat-resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in Meat and Poultry as Affected by Product Composition. Journal of Food Science, 60 (3), pp. 606 – 610

Al-Jader, L., Salmon, R. L., Walker, A. M., Williams, H. M., Willshaw, G. A., Cheasty, T. (1999). Outbreak of *Escherichia coli* O157 in a nursery: lessons for prevention. Arch Dis Child, 81, pp.60 - 63

Andrews, W. (1992). Manuals of food quality control: Microbiological analysis. Food and Nutrition paper 14/4 (1), Rome: FAO

Ashie, I. N. A., Smith, J. P., Simpson, B. K., Norman-Haard, F. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36: 1 – 1, pp. 87-121

Austin, B., Austin, A. D. (2012). Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish, 6th edition. Switzerland: Springer

Bean, N. H., Griffins, P. M. (1990). Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles and trends. Journal of Food Protection, 53 (9): 804-817

Bell, C., Kyriakides, A. (1998). *E. coli*: A Practical Approach to the Organism and its Control in Foods. Oxford: Blackwell Science

Bell, C., Kyriakides, A. (2002). Pathogenic *Escherichia coli*. In: De Blackburn W. & McClure J. P. (eds) Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 279-306

Bennett, R. W., Hait, J. M., Tallent, S. M. (2013). *Staphylococcus aureus*. In: Labbé R. G. & García S. (eds) Guide to Foodborne Pathogens, 2nd edition. UK: John Wiley & Sons pp. 26-44

Cabral, J. (2010). Water Microbiology: Bacterial Pathogens and Water. International Journal of Environmental Research and Public Health, 7: 3657-3703

Chadwick, P. R., McCann, R. (1994a). Transmission of a small round structured virus by vomiting during a hospital outbreak of gastroenteritis. Journal of Hospital Infection, 26: 251–259

Chadwick, P. R., Walker, M., Rees, A. E. (1994b). Airborne transmission of a small round structured virus. Lancet, 2: 1292

Colins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M., Falkinham, J. O. (2004). Collins & Lyne's Microbiological Methods, 8th edition. New York: Oxford University Press

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

D'Sa, E. M., Harisson, M. A., Williams, S. E., Broccoli, M. H. (2000). Effectiveness of Two Cooking Systems in Destroying *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in Ground Beef Patties. Journal of Food Protection, 63 (7), pp. 894 - 899

Djuretic, T., Wall, P. G., Ryan, M., Evans, H. S., Adak, G. K., Cowden, J. M. (1996). General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales 1992 to 1994. CDR Review, 6 :57–63

Domingo, L. J. (2007). Omega-3 fatty acids and the benefits of fish consumption: Is all that glitters gold? *Environment International*, 33: 993-998

FDA, (1999). Destruction of organisms of public health concern: cooking (rawfish), Section 3-401.11 (A) (1). In: *Food code*. Washington, DC: United States Public Health Service, Food and Drug Administration, p.53

FDA, (2001). Pathogen survival through cooking. Ch. 16. In: *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*, 3rd ed. Washington: Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, p. 209-218

FDA, (2011). Chapter 16. Pathogenic Bacteria Survival Through Cooking or Pasteurization. In: *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*, Washington: Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, pp.315-330

Gaillard, S., Leguerinel, I., Mafart, P. (1998). Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* Spores. *Journal of Food Science*, 63 (5): 887–889

Gibbs, P. (2002). Characteristics of spore-forming bacteria. In De Blackburn W. & McClure J. P. (eds.) *Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 417-435

Gram, L. (1993). Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (7): 2197-2203

Gram, L., Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33 (1): 121-137

Greenwood, D., Slack, R. Peutherer, J. (2012). Medical microbiology: A guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control, 18th edition. Churchill Livingstone, UK

Health Protection Agency, (2011). Botulism, Epidemiological data. Retrieved at 16/2/2020

[www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/Botulism/Epidemiological Data](http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/Botulism/EpidemiologicalData)

Hettiarachchi, D. C., Cheong, C. H. (1994). Some characteristics of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio* species isolated from bacterial disease outbreaks in ornamental fish culture in Sri Lanka. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, 22 (3): 261-269

Horn, B., Hewitt, J. (2016). Review of Microbial Pathogen Inactivation Relevant to Sous Vide Cooking at Temperatures below 55 °C. New Zealand Government

Jay, J. M. (1986). Modern Food Microbiology. New York, Van Nostrand Reinhold

Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. (2005). Modern Food Microbiology, 7th edition. California: Springer

Jelen, P. (1982). Experience with direct and indirect UHT processing of milk-A Canadian viewpoint. Journal of Food Protection, 45 (9): 878–883

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

Johnson, W. M., Lior, H., Bezanson, G. S. (1983). Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. Lancet, 321 (8314-8315):

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

Juneja, V. K., Bari, M. L., Inatsu, Y., Kawamoto, S., Friedman, M. (2009). Thermal Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in Sous-vide Cooked Ground Beef as Affected by Tea Leaf and Apple Skin Powders. Journal of Food Protection, 72 (4), pp. 860-865

Juneja, V. K., Snyder, O. P., Marmer, B. S. (1997b). Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in beef and chicken: determination of D- and z- values. International Journal of Food Microbiology, 35, pp. 231 – 237

Käferstein, F. K., Motarjemi, Y., Bettcher, D. W. (1997). Foodborne disease control: a transnational challenge. Emerging Infectious Diseases, 3 (4): 503–510

Kotrola, J. S., Conner, D. E., Mikel, W. B. (1997). Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in cooked turkey products. Journal of Food Science. Vol. 62. N° 4

Labbe, R. G. (1989). *Clostridium perfringens*. In: Doyle M. P. & Beuchat I. R. (eds) Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers, 3rd Ed. ASM Press, Washington, pp. 192-234

Labbe, R. G. and Garcia, S. (2001). Guide to Foodborne Pathogens. 1. Globalization and epidemiology of foodborne disease

Larsen, J. L., Jensen, N. J. (1977). An *Aeromonas* species implicated in uncer-disease of the cod (*Gadus morhua*). Nordisk Veterinaermedicin, 29 (4-5): 199-121

Line, J. E., Fain, A. R., Moran, A. B., Martin, L. M., Lechowich, R. V., Carosella, J. M., Brown, W. L. (1991). Lethality of Heat to *Escherichia coli* O157:H7: D-Value and Z-Value Determinations in Ground Beef. Journal of Food Protection, 54 (10), pp. 762–766

McClane, B. A., Rood, J. I. (2001). Clostridial toxins involved in human enteric and histotoxic infections. In: Bahl H. & Duerre P. (eds) Clostridia: Biotechnology and Medical Application. Germany, Wiley-VCH, pp. 169-209

Meng, J., Doyle, M. P., Zhao, T., Zhao, S. (2007). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Doyle M. P. & Beuchat I. R. (eds) Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers, 3rd Ed. ASM Press, Washington, pp.

Murphy, R. Y., Beard, B. I., Martin, E. M., Duncan, 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^o 4

Osaili, T. M., Griffis, C. L., Martin, E. M., Beard, B. L., Keener, A. E., Marcy, J. A. (2007). Thermal Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in Breaded Pork Patties. Food Microbiology & Safety, 72 (2): 56-61

Pathiratne, A., Widanapathirana, G. S., Chandrakanthi, W. H. S. (1994). Association of *Aeromonas hydrophila* with epizootic ulcerative syndrome (EUS) in freshwater fish in Sri Lanka. Jour. Appl. Ichthyology, 10 (2-3): 204-208

Patterson, W., Haswell, P., Fryers, P. T., Green J. (1996). Outbreak of small round structured virus gastroenteritis arose after kitchen assistant vomited. Communicable Diseases Report Reviews, 7: R 101–103

Prokopov, T., Tanchev, S. (2007). Methods of Food Preservation. In: McElhatton A. & Marschall R. J. Food Safety: A Practical and Case Study Approach. New York: Springer, pp. 3-25

Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noor Hidayah, M. S., Ubong, A., Farinazleen, M. G., Cheah, Y. K., Son, R. (2011). *Salmonella*: A foodborne pathogen. Int. Food Research Journal, 18 (2): 465-473

Rahman, (2007). Hand book of Food Preservation, 2nd edition. New York: Taylor & Francis Group, LLC

Rajkowski, K. (2012). Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on catfish and tilapia. Food Microbiology, 30, pp. 427–437

Ray, B. (2005). Fundamental Food Microbiology, 3rd edition. New York: CRC.

Rippen, T. E. (1998). Personal communication. University of Maryland: Princess Anne

Salmon, C. P., Knize, M. G., Pantelakos, F. N., Wu, R. W., Nelson, D. O., Felton, J. S. (2000). Minimization of Heterocyclic Amines and Thermal Inactivation of *Escherichia coli* in Fried Ground Beef. Journal of the National Cancer Institute, 92 (21), pp. 1773–2000

Smith, S. E., Maurer, J. L., Orta-Ramirez, A., Ryser, E. T., Smith, D. M. (2001). Thermal Inactivation of *Salmonella spp.*, *Salmonella typhimurium* DT104, and *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Beef. Food Microbiology and Safety, 66 (8), pp. 1164–1168

Su, X., L., Li, Y. (2004). A self – assembled monolayer – based piezoelectric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7. Biosensors and Bioelectronics, 19 (6): 563-574

Sugiyama, H. (1951). Studies on factors affecting the heat resistance of spores of *Clostridium botulinum*. Journal of Bacteriology, 62 (1): 81–96

The Center for Food Security and Public Health. (2016). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Other *E. coli* Causing Hemolytic Uremic Syndrome. Retrieved at 16/2/2020 [from www.cfsph.iastate.edu/](http://www.cfsph.iastate.edu/)

Todd, C. D. (2013). Globalization and epidemiology of foodborne disease. In: Labbé R. G. & García S. (eds) Guide to Foodborne Pathogens, 2nd edition. UK: John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1-25

Ulusoy, S., Alakavuk, D. U., Mol, S., Cosansu, S. (2019). Effect of microwave cooking on foodborne pathogens in fish. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43, pp. 1-6

White, H. R. (1963). The effect of variation in pH on the heat resistance of cultures of *Streptococcus faecalis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 26 (1): 91–99

Xu, A., Chuang, S., Scullen, O. J., Juand, L., Sheen, S., Sheen, L.-Y., Johson, J. R., Sommers, C. H. (2019). Thermal inactivation of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* suspended in ground chicken meat. *Food Control*, 104, pp. 269 – 277

6.2 Ελληνική βιβλιογραφία

Ανδρέου, Γ. (2011). Διερεύνηση περιστατικών τροφιμογενών λοιμώξεων στην Κύπρο. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Αρσένη, Α. (1994). Κλινική Μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων. Εκδόσεις ΖΗΤΗ

Μπλούκας, Ι. (2004). Συσκευασία τροφίμων. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη