



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ**  
**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«Συμπεριφορά και παρεμπόδιση του *Listeria monocytogenes* κατά την επεξεργασία και συντήρηση φιλέτων καπνιστής πέστροφας»**

**Σωτήριος Ι. Οικονόμου**

**Βόλος, 2020**

**«Συμπεριφορά και παρεμπόδιση του *Listeria monocytogenes* κατά την επεξεργασία και συντήρηση φιλέτων καπνιστής πέστροφας»**

**“Behavior and inhibition of *Listeria monocytogenes* during the processing and preservation of smoked trout fillets”**

**Η παρούσα διδακτορική διατριβή υποστηρίχθηκε από το Ίδρυμα Ωνάση στα πλαίσια του προγράμματος υποτροφιών αριστείας, για σπουδές στην Ελλάδα.**

**Υποτροφία Σωτήριος Οικονόμου ID: G ZN 043-1 / 2017-2018**



### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

- 1) Ιωάννης Σ. Μποζιάρης, Επιβλέπων, Καθηγητής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 2) Παναγιώτης Σκανδάμης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
- 3) Αναγνώστης Αργυρίου, Καθηγητής, Πανεπιστημίου Αιγαίου

### **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

- 1) Ιωάννης Σ. Μποζιάρης, Επιβλέπων, Καθηγητής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 2) Παναγιώτης Σκανδάμης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
- 3) Αναγνώστης Αργυρίου, Καθηγητής, Πανεπιστημίου Αιγαίου
- 4) Ευστάθιος Γκιαούρης, Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστημίου Αιγαίου
- 5) Κωνσταντίνος Κορμάς, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6) Ανδρέας Κίμων Καρατζάς, Αναπληρωτής Καθηγητής, University of Reading, Reading, UK
- 7) Αλέξανδρος Στρατάκος, Επίκουρος Καθηγητής, University of the West of England, Bristol, UK

**Σωτήριος Ι. Οικονόμου (2020)** Συμπεριφορά και παρεμπόδιση του *Listeria monocytogenes* κατά την επεξεργασία και συντήρηση φιλέτων καπνιστής πέστροφας

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 31

Συνολικός αριθμός σελίδων της διατριβής: 228

Αριθμός Πινάκων: 18

Αριθμός Σχημάτων: 43

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 464

## Ευχαριστίες

Μετά την πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, θα ήθελα να πω ένα δυνατό ευχαριστώ σε όλους τους ανθρώπους που με στήριξαν και συνέβαλαν με τον δικό τους ξεχωριστό τρόπο στην εκπόνησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Καθηγητή κ. Ιωάννη Μποζιάρη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της διατριβής, την άριστη συνεργασία μας, καθώς και για την υποστήριξη του, μέσα από τις πολλές συζητήσεις μας σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, μέχρι και την τελική συγγραφή της διατριβής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Παναγιώτη Σκανδάμη και τον Καθηγητή κ. Αναγνώστη Αργυρίου, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της παρούσας έρευνας. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής που συμμετείχαν στην κατά το δυνατό αρτιότερη παρουσίαση της διατριβής.

Ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κίμων Ανδρέα Καρατζά, για την αποδοχή και τη φιλοξενία του στο Τμήμα Χημείας, Τροφίμων & Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου του Ρέντινγκ, στην Αγγλία, στα πλαίσια της υποτροφίας μου Erasmus plus, από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ). Με τη βοήθεια και την καθοδήγησή του, κατάφερα να ενταχθώ αμέσως στην ερευνητική του ομάδα και κατάφερα να μάθω μία νέα τεχνική, άγνωστη έως τότε για εμένα, αυτή της Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης, και τα αποτελέσματα που προέκυψαν αποτέλεσαν το τελευταίο Κεφάλαιο της παρούσας διατριβής αλλά και δημοσιευμένη εργασία σε έγκριτο διεθνές περιοδικό με κριτές. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα του εργαστηρίου, για τη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο Πανεπιστήμιο του Ρέντινγκ και ιδιαίτερα τον Επίκουρο καθηγητή Dr. Sami

Bulut, του Πανεπιστημίου της Αδριανούπολης, την ερευνήτρια Δρ. Κων/να Κουρμεντζά και τον φίλο μου Φωκίωνα.

Επιπλέον, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον διευθυντή του εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής Λάρισας, Καθηγητή κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου για την άδεια χρήσης του εξοπλισμού, για την ολοκλήρωση πειραμάτων της έρευνάς μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Μαρία Κυρίτση για την αμέριστη βοήθεια της στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια των πρωτεωμικών αναλύσεων με τη χρήση της Maldi ToF MS.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις δύο Ελληνικές Βιομηχανίες παραγωγής και εμπορίας αλιευτικών προϊόντων για την άψογη συνεργασία μας, οι οποίες παρά τις δύσκολες οικονομικές συγκυρίες, κατάφεραν να υποστηρίξουν τα πειράματα της παρούσας διατριβής, παρέχοντας μας φιλέτα αλλά και πολύτιμες πληροφορίες όταν αυτό ήταν απαραίτητο. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την εταιρία Ruitenber Twello b.v. Netherlands, για την παροχή των πολύτιμων συμπυκνωμάτων υγρών καπνών που συνέβαλαν σημαντικά στη διερεύνηση της συμπεριφοράς του *L. monocytogenes*, με πολύτιμα εξαγόμενα συμπεράσματα.

Ιδιαίτερη μνεία, αξίζει στην ερευνήτρια Δρ. Φωτεινή Παρλαπάνη, πολύτιμο μέλος του εργαστηρίου, Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων, με διευθυντή τον Καθηγητή κ. Ιωάννη Μποζιάρη, για την αμέριστη βοήθεια της σε όλα τα στάδια της διδακτορικής μου διατριβής, η οποία στάθηκε δίπλα μου ως ερευνήτρια και ως φίλη με πολύτιμες συμβουλές. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου καθώς και τους πολλούς προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές με τους οποίους συνεργαστήκαμε άψογα και με πολλούς εκ των οποίων παραμείναμε φίλοι.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Κοινωνοφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Σ. Ωνάση για την υποστήριξη αυτής της διδακτορικής διατριβής στα πλαίσια του προγράμματος υποτροφιών του, με βάση την ακαδημαϊκή αριστεία. Δίχως αυτή τη στήριξη η ευτυχής και επιτυχής κατάληξη της παρούσας διατριβής δεν θα ήταν δεδομένη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα την οικογένεια μου, καθώς η παρούσα διδακτορική διατριβή δε θα ήταν δυνατόν να ολοκληρωθεί χωρίς τη συμπαράσταση και τις συμβουλές των γονιών μου, Ιωάννη και Ασπασία αλλά και τις αδερφές μου Ζωή-Ιωάννα και Κωνσταντίνα καθώς και το νέο μέλος της οικογένειας μας τον Άκη. Ευχαριστώ ολόψυχα και τη φίλη μου Αναστασία για την κατανόηση και την ψυχολογική και πνευματική ενθάρρυνση της όλα αυτά τα χρόνια. επίσης, ευχαριστώ τους φίλους μου Νίκο-Ραφαήλ και Κωστή.

Η παρούσα διατριβή αφιερώνεται στα αγαπημένα μου αυτά πρόσωπα!

## Περίληψη

Από τα σημαντικότερα αγροτικά προϊόντα που παράγει η Ελλάδα είναι τα αλιευτικά προϊόντα. Πρόκειται για τρόφιμα ευαλλοιώτα λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά που είναι δυνατό να επιμολυνθούν με παθογόνους μικροοργανισμούς σε διάφορα στάδια της παραγωγικής τους αλυσίδας από το περιβάλλον, τον άνθρωπο, τον εξοπλισμό και τους χώρους επεξεργασίας με αποτέλεσμα να καταστούν επικίνδυνα. Το *L. monocytogenes*, είναι ένα τροφιμογενές παθογόνο βακτήριο και μπορεί να απαντάται σε μια ευρεία γκάμα τροφίμων, επιβιώνει των διάφορων επεξεργασιών (κατάψυξη, αλάτιση, θερμική επεξεργασία) έχοντας ως κυριότερη πηγή τα ήπια επεξεργασμένα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (RTE). Πολλές κατηγορίες τροφίμων και αλιευτικών προϊόντων έχουν συσχετιστεί επιδημιολογικά με σποραδικές περιπτώσεις λιστερίωσης. Τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης), ανήκουν στα ήπια θερμικώς επεξεργασμένα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα τα οποία μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* και αποτέλεσαν το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Συγκεκριμένα, αφορά τη μελέτη της επίδρασης των συνθηκών επεξεργασίας και συντήρησης στη συμπεριφορά του *L. monocytogenes* στα φιλέτα καπνιστής πέστροφας.

Αρχικά, έγινε διερεύνηση της επίδρασης της αντιμικροβιακής δράσης εννέα (9) υδατοδιαλυτών συμπυκνωμάτων υγρών καπνών στο *L. monocytogenes*. Έγινε εκτίμηση της ελάχιστης παρεμποδιστικής (MIC) και βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) των υγρών καπνών, έναντι κανονικών κυττάρων (ελέγχου), κυττάρων βιοϋμενίων και ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων του *L. monocytogenes*. Ο πιο αποτελεσματικός καπνός, με την κωδική ονομασία L9, είχε ισχυρή παρεμποδιστική (MIC) και βακτηριοκτόνο δράση (MBC) που ήταν 0.25 % και 0.50 % (v/v),



αντίστοιχα και για τις δύο μελετώμενες θερμοκρασίες (7.9 και 37 °C), με μικρές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών κυττάρων που μελετήθηκαν. Η τιμή MIC για το δεύτερο αποτελεσματικότερο καπνό G6, ήταν 0.25 % (v/v) στους 7.9 °C, ενώ σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις ήταν > 2.00 % (v/v), όπως και για τα υπόλοιπα συμπυκνώματα υγρών καπνών, έναντι των κανονικών, ωσμωτικά προσαρμοσμένων και κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*.

Κατόπιν, έγινε έλεγχος της θερμοανθεκτικότητας κανονικών και ωσμωτικά προσαρμοσμένων (10.00 % w/v, NaCl για 12 ώρες) κυττάρων του *L. monocytogenes*, τα οποία υποβλήθηκαν σε θερμική καταπόνηση στους 60 °C, με ενοφθαλμισμό σε προ θερμασμένο θρεπτικό ζωμό TSB<sub>y.e.</sub> (60 °C) που περιείχε 0.50 %, 5.00 % και 10.00 % (w/v) NaCl. Ο χρόνος δεκαδικής μείωσης ( $D_{60°C}$ ) των κανονικών κυττάρων μειώνονταν καθώς αυξάνονταν η αλατότητα του μέσου θέρμανσης. Από την άλλη, τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα παρουσίασαν αξιοσημείωτη θερμοαντοχή στους 60 °C, με τιμές  $D_{60°C}$   $10.08 \pm 1.41$ ,  $14.27 \pm 1.66$  και  $8.28 \pm 1.89$  λεπτά σε μέσο θέρμανσης με 0.50 %, 5.00 % και 10.00 % (w/v) NaCl. Επιπλέον, έγινε έλεγχος της θερμοανθεκτικότητας των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, που αναπτύχθηκαν σε μεταλλικές πλάκες από ανοξείδωτο χάλυβα. Τα κύτταρα βιοϋμενίων καθώς και τα πλαγκτονικά κύτταρα του *L. monocytogenes* λήφθηκαν και υποβλήθηκαν σε θέρμανση στους 60 °C σε TSB<sub>y.e.</sub> Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι ο χρόνος δεκαδικής μείωσης ( $D_{60°C}$ ) των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* ήταν 6.29 λεπτά, ενώ για τα πλαγκτονικά κύτταρα ελέγχου ήταν 4.19 λεπτά. Συνεπώς, τα κύτταρα που προήλθαν από βιοϋμένια ήταν πιο θερμοανθεκτικά. Ταυτόχρονα, γίνονταν διερεύνηση των τραυματισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* μετά τις υποβαλλόμενες καταπονήσεις σε επιλεκτικά υλικά (PALCAM άγαρ και TSA<sub>y.e.</sub> + NaCl 5.00 %), όπου παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα

υποθανάτιου τραυματισμού. Ο αριθμός των ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* ήταν υψηλότερος από τον αντίστοιχο των κανονικών κυττάρων ελέγχου που απαριθμήθηκαν στα επιλεκτικά υλικά σε όλες τις περιπτώσεις και η διαφορά αυξάνονταν καθώς αυξάνονταν και ο χρόνος έκθεσης των κυττάρων στη θερμική καταπόνηση (60 °C). Τα κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, που απαριθμήθηκαν σε PALCAM άγαρ και TSAy.e. + NaCl 5.00 %, έφτασαν κάτω από το όριο ανίχνευσης (< 2.00 log CFU/mL) μετά από 1 και 6 λεπτά θερμικής καταπόνησης, αντίστοιχα. Τα κύτταρα βιοϋμενίων μετά από τη θερμική καταπόνηση, παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία κατά την απαρίθμηση τους στο PALCAM άγαρ.

Συμπυκνώματα υγρών καπνών (L9 και G6), ενσωματώθηκαν στα τρυβλία με TSAy.e σε κατάλληλες συγκεντρώσεις (0.25 % έως 1.00 %, v/v) με στόχο τη διερεύνηση της ευαισθησίας του *L. monocytogenes* στους υγρούς καπνούς μετά από καταπονήσεις όπως: α) το θερμικό σοκ σε πλαγκτονικά κύτταρα και κύτταρα βιοϋμενίων και β) διαδοχικές καταπονήσεις ωσμωτικού σοκ (10.00 %, w/v NaCl), και θερμικής καταπόνησης (60 °C). Ο υγρός καπνός L9, σε συγκεντρώσεις  $\geq 0.50$  % (v/v) προκάλεσε μείωση (κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης) του πληθυσμού των κανονικών και ωσμωτικά προσαρμοσμένα κυττάρων του παθογόνου πριν ή και μετά από τη θερμική επεξεργασία, χωρίς να παρουσιάσουν διαφορετική ανθεκτικότητα στην αντιμικροβιακή του δράση. Τα κύτταρα βιοϋμενίων, τα οποία είχαν υποστεί θερμική καταπόνηση στους 60 °C, ήταν πιο ανθεκτικά από τα πλαγκτονικά και μειώθηκαν μόλις 0.09 και 0.51 log CFU/mL παρουσία 0.25 % και 0.50 % (v/v) L9, αντίστοιχα. Η αποτελεσματικότητα του υγρού καπνού G6 ήταν πολύ μικρότερη συγκριτικά με τον L9. Συνεπώς, το διαφορετικό ιστορικό ανάπτυξης των κυττάρων του παθογόνου (ωσμωτικά προσαρμοσμένα, κύτταρα βιοϋμενίων και πλαγκτονικά κύτταρα)

συντέλεσε στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην επίδραση του υγρού καπνού, καθώς τα θερμικώς τραυματισμένα κύτταρα βιοϋμενίων ήταν ανθεκτικότερα.

Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών φιλέτων καπνιστής πέστροφας από 2 περιοχές (Α και Β) σε συσκευασία κενού και συντηρούμενων στους 2.0 και 7.9 °C. Από τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής εξέτασης των φιλέτων, προέκυψε ότι στη μη ορθή θερμοκρασία (7.9 °C) συντήρησης, τα φιλέτα απορρίφθηκαν μετά την 70<sup>η</sup> και 63<sup>η</sup> ημέρα (από την περιοχή Α και Β, αντίστοιχα), ενώ στους 2.0 °C η OMX των φιλέτων ακόμη και μετά από 150 ημέρες και για τις δύο περιοχές δεν ξεπέρασε τους 7.00 log CFU/g αλλά η ημέρα αλλοίωσης, ορίστηκε στις 135 ημέρες. Η κυρίαρχη ομάδα μικροοργανισμών που επικράτησαν (με βάση τις καλλιεργητικές τεχνικές) και στις 2 θερμοκρασίες και περιοχές, ήταν τα οξυγαλακτικά βακτήρια που απαριθμήθηκαν σε MRS με διαφορετικές τιμές pH (5.4, 6.4 και 7.4). Οι αποικίες που απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση πρωτεωμικής ανάλυσης με MALDI-TOF MS. Από την ταυτοποίηση των αποικιών που απομονώθηκαν από το MRS με τις 3 τιμές pH (5.4, 6.4 και 7.4), προέκυψαν 3 διαφορετικά γένη μικροοργανισμών Συγκεκριμένα, 71 αποικίες ανήκαν στα *Enterococcus* spp., 383 στα *Candida* spp. και 113 στα *Lactobacillus* spp. εκ των οποίων κάποιες ήταν κοινές στα δείγματα των φιλέτων από τις διαφορετικές περιοχές. Στα φιλέτα από την περιοχή Α, εντοπίστηκαν οι μικροοργανισμοί *C. zeylanoides* και *L. sakei*. Μεγαλύτερη ποικιλομορφία εμφανίστηκε στα φιλέτα από την περιοχή Β, όπου εντοπίστηκαν οι μικροοργανισμοί, *E. faecalis*, *C. zeylanoides*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *L. sakei* και *L. curvatus*.

Κατόπιν έγινε διερεύνηση της ανταγωνιστικής συμπεριφοράς που μπορεί να παρουσιάζεται μεταξύ των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που απομονώθηκαν και του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes*. Μελετήθηκε ο

ανταγωνισμός τους, έναντι πλαγκτονικών και κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, σε πραγματικά φιλέτα καθώς και σε μοντέλα ζωμού καπνιστής πέστροφας (μόνο- και πολυκαλλιέργειες) στους 4.0 και 7.9 °C. Στα φιλέτα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια επικράτησαν και δε φάνηκε να επηρεάζεται η ανάπτυξη τους από την παρουσία των πλαγκτονικών κυττάρων του *L. monocytogenes* και έφτασαν τους 7.57 και 7.54 log CFU/g, έπειτα από 60 ημέρες στους 4.0 και 7.9 °C, αντίστοιχα. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ανάπτυξη των πλαγκτονικών και κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* στα φιλέτα, αποθηκευμένα στους 4.0 και 7.9 °C.

Σε όλες τις περιπτώσεις συγκαλλιέργειας του *L. monocytogenes* (πλαγκτονικά και κύτταρα βιοϋμενίων, 4.0 και 7.9 °C) με το μίγμα των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων βακτηρίων, σε μοντέλα ζωμού καπνιστής πέστροφας η ανάπτυξη του παθογόνου περιορίστηκε. Η συγκαλλιέργεια των πλαγκτονικών κυττάρων του παθογόνου με τον κάθε αλλοιωγόνο μικροοργανισμό ξεχωριστά, στους 4.0 °C φάνηκε να είναι συμβιωτική ενώ στους 7.9 °C, η ανάπτυξη των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών περιορίστηκε από την παρουσία του *L. monocytogenes*. Το αντίθετο φαινόμενο παρατηρήθηκε για τα κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, με εξαίρεση στους 7.9 °C, όπου η ανάπτυξη του *L. monocytogenes* περιορίστηκε από τα *C. famata* και *C. zeylanoides*.

Τέλος, αξιολογήθηκε ο συνδυασμός δύο συμπυκνωμάτων υγρού καπνού (L9 και G6) και της υπερκατάψυξης στους -80 °C με σκοπό τη μείωση της έντασης της εφαρμοζόμενης υδροστατικής πίεσης (ΥΥΠ) που απαιτείται για την εξάλειψη του παθογόνου *L. monocytogenes* σε φιλέτα νωπής και καπνιστής πέστροφας. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στα 200 MPa για 15 λεπτά, ενώ τα δείγματα εμβολιάστηκαν με τρία διαφορετικά στελέχη του *L. monocytogenes* (LO28, EGD-e

και 10403S). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το στέλεχος 10403S του *L. monocytogenes* ήταν το πιο ανθεκτικό κατά την εφαρμογή της υψηλής υδροστατικής πίεσης (200 MPa, 15 λεπτά) και το G6 ήταν το πιο αποτελεσματικό εκχύλισμα καπνού. Στη συνέχεια, η υπερκατάψυξη των προϊόντων στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  πριν από την ΥΥΠ, φάνηκε να δρα συνεργιστικά οδηγώντας σε μείωση 2.90 και 3.23 log CFU/mL του πληθυσμού του παθογόνου, σε θρεπτικό ζωμό BHI χωρίς NaCl, παρουσία του G6 και L9, αντίστοιχα. Η εφαρμογή της ΥΥΠ, στα δείγματα καπνιστής πέστροφας με ή χωρίς συμπυκνώματα υγρού καπνού, πριν την κατάψυξη οδήγησε σε μικρή μείωση πληθυσμού ( $< 0.30\text{ log CFU/g}$ ), όπως και στα δείγματα νωπής πέστροφας. Ωστόσο, παρατηρήθηκε σημαντική συνεργιστική δράση της ΥΥΠ, των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού (L9 ή G6) και της κατάψυξης στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , όταν εφαρμόστηκαν στα φιλέτα καπνιστής πέστροφας, με αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού του *L. monocytogenes* κατά 5.48 log CFU/g. Τέλος, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα τραυματισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* (10403S), από την εφαρμογή των διαφορετικών εμποδίων.

Συνολικά, από τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, προέκυψε πως τα κύτταρα του *L. monocytogenes* που υπέστησαν ωσμωτικό σοκ παρουσίασαν αυξημένη αντοχή στη θερμική επεξεργασία, όπως και τα κύτταρα βιοϋμενίων, συγκριτικά με τα πλαγκτονικά. Ωστόσο, στο επακόλουθο εμπόδιο των υγρών καπνών μόνο τα κύτταρα βιοϋμενίων του παθογόνου παρουσίασαν ανθεκτικότητα (μετά από θερμική επεξεργασία), έναντι του αποτελεσματικότερου καπνού (L9). Παρουσία των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας, τα κύτταρα του *L. monocytogenes* (πλαγκτονικά ή βιοϋμενίων) σε άλλες περιπτώσεις επικράτησαν και σε άλλες όχι ή αναπτύσσονταν συμβιωτικά, δείχνοντας πόσο σημαντική είναι η διερεύνηση της συμπεριφοράς της φυσικής

παρουσίας του μικροβιώματος. Τελικά, παρατηρήθηκε σημαντική συνεργιστική δράση της ΥΥΠ, των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού (L9 ή G6) και της κατάψυξης στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , όταν εφαρμόστηκαν στα φιλέτα καπνιστής πέστροφας, με αποτέλεσμα τη μείωση του πιο ανθεκτικού στελέχους του *L. monocytogenes*.

**Επιστημονική περιοχή εργασίας:** Μικροβιολογία Τροφίμων

**Λέξεις ευρετηρίασης:** *Listeria monocytogenes*, καπνιστή πέστροφα, βιοϋμένια, οσμωτική καταπόνηση, θερμική επεξεργασία, υψηλή υδροστατική πίεση, υγρός καπνός, μικροβιακός ανταγωνισμός, MALDI-ToF MS

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη .....	i
Κατάλογος Πινάκων .....	xv
Κατάλογος Σχημάτων.....	xviii
<b>Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή .....</b>	<b>1</b>
1.1. Χαρακτηριστικά του <i>L. monocytogenes</i> .....	3
1.2. Λιστερίωση και επιπολασμός .....	6
1.3. Ανίχνευση του παθογόνου σε διάφορα περιβάλλοντα και στη βιομηχανία τροφίμων.....	7
1.4. Ανθεκτικότητα του <i>L. monocytogenes</i> στις διάφορες καταπονήσεις κατά την επεξεργασία και αποθήκευση τροφίμων.....	9
1.4.1. Ωσμωτική καταπόνηση.....	11
1.4.2. Καταπόνηση σε υψηλές θερμοκρασίες.....	12
1.4.3. Καταπόνηση σε χαμηλές θερμοκρασίες .....	13
1.4.4. Καταπόνηση με την εφαρμογή Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (ΥΥΠ). ..	14
1.5. Χαρακτηριστικά των βιοϋμενίων του <i>L. monocytogenes</i> .....	16
1.5.1. Εισαγωγικά στοιχεία.....	16
1.5.2. Σχηματισμός βιοϋμενίων .....	17
1.5.3. Έλεγχος και πρόληψη των βιοϋμενίων του <i>L. monocytogenes</i> .....	20
1.6. Βιομηχανία κάπνισης αλιευτικών προϊόντων - Υφιστάμενη κατάσταση.....	21
1.7. Ήπια θερμικώς επεξεργασμένα αλιευτικά προϊόντα .....	23
1.8. Παραγωγική διαδικασία φιλέτων καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης).....	25
1.9. Τεχνικές συντήρησης.....	28
1.9.1. Αλάτιση.....	28
1.9.2. Κάπνιση .....	29

1.9.3. Συσκευασία υπό κενό αέρος (Vacuum Packaging – VP) .....	30
1.9.4. Θερμοκρασία αποθήκευσης .....	31
1.10. Σκοπός και στόχοι της Διδακτορικής Διατριβής .....	32
<b>Κεφάλαιο 2. Γενικά Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>35</b>
2.1. Μικροβιακά στελέχη, υλικά και συνθήκες ανάπτυξης .....	35
2.2. Απαρίθμηση Μικροβιακών Πληθυσμών .....	36
2.2.1. Απαρίθμηση Μικροβιακού Πληθυσμού .....	36
2.2.2. Απαρίθμηση τραυματισμένων κυττάρων .....	37
2.3. Υλικά μικροβιολογικής ανάλυσης .....	38
2.4. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων αύξησης.....	39
2.5. Προετοιμασία συμπυκνωμάτων υγρού καπνού .....	39
2.6. Στατιστική ανάλυση.....	41
<b>Κεφάλαιο 3. Επίδραση της αντιμικροβιακής δράσης των υγρών καπνών στο <i>L. monocytogenes</i> .....</b>	<b>42</b>
3.1. Εισαγωγή .....	42
3.2. Υλικά και μέθοδοι.....	44
3.2.1. Προετοιμασία και σχηματισμός βιοϋμενίων του <i>L. monocytogenes</i> .....	44
3.2.2. Ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα του <i>L. monocytogenes</i> .....	46
3.2.3. Προετοιμασία συμπυκνωμάτων υγρού καπνού .....	46
3.2.4. Προσδιορισμός της Ελάχιστης Παρεμποδιστικής Συγκέντρωσης (MIC) και της Ελάχιστης Βακτηριοκτόνου Συγκέντρωσης (MBC).....	46
3.3. Αποτελέσματα.....	48
3.3.1. Ελάχιστη παρεμποδιστική και βακτηριοκτόνος συγκέντρωση των συμπυκνωμάτων υγρών καπνών .....	48



3.3.2. Συμπεριφορά των ωσμωτικά προσαρμοσμένων και κυττάρων βιοϋμενίων του <i>L. monocytogenes</i> , στην αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών .....	49
3.3.3. Έλεγχος ανάπτυξης του <i>L. monocytogenes</i> σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις άλατος .....	51
3.4. Συζήτηση.....	56
<b>Κεφάλαιο 4. Συμπεριφορά και απόκριση ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων του <i>L. monocytogenes</i> κατά τη θερμική καταπόνηση .....</b>	<b>59</b>
4.1. Εισαγωγή .....	59
4.2. Υλικά και μέθοδοι.....	61
4.2.1. Θερμική αδρανοποίηση ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων.....	61
4.2.2. Έλεγχος ανθεκτικότητας θερμικώς καταπονημένων και ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων, στην αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών	62
4.2.3. Απαρίθμηση και υπολογισμός τραυματισμένων κυττάρων.....	63
4.2.4. Στατιστική Ανάλυση .....	63
4.3. Αποτελέσματα.....	65
4.3.1. Επίδραση της ωσμωτικής καταπόνησης στη θερμοανθεκτικότητα του <i>L. monocytogenes</i> .....	65
4.3.2. Υπολογισμός τραυματισμένων κυττάρων του <i>L. monocytogenes</i> κατά τη θερμική καταπόνηση στους 60 °C .....	68
4.3.3. Ανθεκτικότητα του <i>L. monocytogenes</i> , μετά από θερμική καταπόνηση, στην αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών .....	73
4.4. Συζήτηση.....	76
<b>Κεφάλαιο 5. Συμπεριφορά και απόκριση των κυττάρων του <i>L. monocytogenes</i> προερχόμενα από βιοϋμένια κατά τη θερμική καταπόνηση στους 60 °C.....</b>	<b>81</b>
5.1. Εισαγωγή .....	81

5.2. Υλικά και μέθοδοι.....	83
5.2.1. Προετοιμασία και σχηματισμός βιοϋμενίων του <i>L. monocytogenes</i> .....	83
5.2.2. Έλεγχος σχηματισμού βιοϋμενίων του <i>L. monocytogenes</i> στις μεταλλικές επιφάνειες, παρουσία ή όχι συμπυκνωμάτων υγρού καπνού .....	83
5.2.3. Θερμική αδρανοποίηση των κυττάρων του <i>L. monocytogenes</i> προερχόμενα από βιοϋμένια .....	83
5.2.4. Απαρίθμηση επιζώντων θερμικώς καταπονημένων πλαγκτονικών και προερχόμενων από βιοϋμένια κυττάρων .....	84
5.2.5. Απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών .....	84
5.3. Αποτελέσματα.....	85
5.3.1. Σχηματισμός κυττάρων βιοϋμενίων του <i>L. monocytogenes</i> παρουσία συμπυκνωμάτων υγρού καπνού.....	85
5.3.2. Θερμική αδρανοποίηση κυττάρων προερχόμενων από βιοϋμένια του <i>L. monocytogenes</i> .....	87
5.3.3. Υπολογισμός τραυματισμένων κυττάρων βιοϋμενίων του <i>L. monocytogenes</i> κατά τη θερμική καταπόνηση στους 60 °C .....	88
5.3.4. Ανθεκτικότητα των κυττάρων βιοϋμενίων του <i>L. monocytogenes</i> , μετά από θερμική καταπόνηση, στην αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών .....	91
5.4. Συζήτηση.....	94
<b>Κεφάλαιο 6. Επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης στη μικροβιακή σύνθεση και στις φυσικοχημικές ιδιότητες των φιλέτων καπνιστής πέστροφας.</b>	<b>98</b>
6.1. Εισαγωγή .....	98
6.2. Υλικά και Μέθοδοι .....	101
6.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός.....	101
6.2.2. Προέλευση δειγμάτων .....	101

6.2.3. Οργανοληπτική αξιολόγηση .....	102
6.2.4. Μέτρηση pH .....	104
6.2.5. Μέτρηση ενεργότητας νερού ( $a_w$ ).....	104
6.2.6. Προσδιορισμός υγρασίας.....	104
6.2.7. Μέτρηση περιεκτικότητας άλατος.....	105
6.2.8. Μικροβιολογική ανάλυση φιλέτων.....	106
6.2.9. Απομόνωση μικροοργανισμών .....	106
6.2.10. Ταυτοποίηση με MALDI-TOF MS .....	106
6.3. Αποτελέσματα.....	110
6.3.1. Προσδιορισμός χρόνου απόρριψης φιλέτων καπνιστής πέστροφας.....	110
6.3.2. Υπολογισμός φυσικοχημικών παραμέτρων.....	113
6.3.3. Μεταβολές μικροβιακού πληθυσμού φιλέτων καπνιστής πέστροφας.....	114
6.3.4. Ταυτοποίηση με τη χρήση πρωτεωμικής ανάλυσης – MALDI ToF MS .	123
6.4. Συζήτηση.....	132
<b>Κεφάλαιο 7. Επίδραση του μικροβιακού πληθυσμού των φιλέτων καπνιστής πέστροφας στη συμπεριφορά του <i>L. monocytogenes</i> .....</b>	<b>139</b>
7.1. Εισαγωγή .....	139
7.2. Υλικά και Μέθοδοι .....	141
7.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός.....	141
7.2.2. Προέλευση δειγμάτων .....	141
7.2.3. Μικροβιακά στελέχη.....	141
7.2.4. Προετοιμασία στερεών μοντέλων υποστρώματος από ζωμό φιλέτων καπνιστής πέστροφας.....	142
7.2.5. Προετοιμασία εμβολίου, ενοφθαλμισμός και συνθήκες αποθήκευσης...	143

7.2.6. Μικροβιολογική ανάλυση μοντέλων και φιλέτων καπνιστής πέστροφας .....	146
7.3. Αποτελέσματα.....	147
7.3.1. Συμπεριφορά του <i>L. monocytogenes</i> σε πραγματικά φιλέτα καπνιστής πέστροφας .....	147
7.3.2. Μονοκαλλιέργειες μικροοργανισμών σε στερεά μοντέλα υποστρώματος .....	151
7.3.3. Ανταγωνιστική συμπεριφορά του <i>L. monocytogenes</i> και των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε πολυκαλλιέργειες.....	162
7.4. Συζήτηση.....	180
<b>Κεφάλαιο 8. Αδρανοποίηση του <i>L. monocytogenes</i> σε φιλέτα νωπής και καπνιστής πέστροφας με Υπερυψηλή Υδροστατική Πίεση (ΥΥΠ) .....</b>	<b>188</b>
8.1. Εισαγωγή .....	188
8.2. Υλικά και Μέθοδοι .....	191
8.2.1. Μικροβιακά στελέχη.....	191
8.2.2. Προετοιμασία συμπυκνωμάτων υγρού καπνού .....	191
8.2.3. Προσδιορισμός του πιο ανθεκτικού στελέχους έναντι των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού.....	192
8.2.4. Προετοιμασία δειγμάτων για την ΥΥΠ.....	192
8.2.5. Εφαρμογή Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης και πρόγραμμα λειτουργίας.....	194
8.2.6. Απαρίθμηση και υπολογισμός τραυματισμένων κυττάρων.....	195
8.2.7. Πειραματικός σχεδιασμός και στατιστική ανάλυση .....	195
8.3. Αποτελέσματα.....	196
8.3.1. Αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών κατά των στελεχών του <i>L. monocytogenes</i> .....	196

8.3.2. Αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών σε συνδυασμό με την εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης κατά των στελεχών του <i>L. monocytogenes</i> .....	199
8.3.3. Εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης σε υγρά μοντέλα, νωπά και καπνιστά φιλέτα πέστροφας (θερμής κάπνισης) με ή χωρίς εφαρμογή υπερκατάψυξης στους -80 °C.....	201
8.3.4. Έλεγχος υποθανάτια τραυματισμένων κυττάρων του στελέχους 10403S WT του <i>L. monocytogenes</i> .....	206
8.4. Συζήτηση.....	209
<b>Κεφάλαιο 9. Γενική συζήτηση, συμπεράσματα και προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....</b>	<b>218</b>
9.1. Γενική Συζήτηση και Συμπεράσματα .....	218
9.2. Προτάσεις για Μελλοντική έρευνα.....	226
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>229</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>307</b>

## Κατάλογος Πινάκων

**Πίνακας 1.1.** Κατηγορίες αλιευτικών προϊόντων και σχετικά χαρακτηριστικά (αναμορφώθηκε από Juneja et al., 2002).

**Πίνακας 1.2.** Βαθμοί αλατούχου διαλύματος – άλμης (αναμορφώθηκε από Bannerman, 2001).

**Πίνακας 2.1.** Στελέχη του *L. monocytogenes* που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία του μίγματος.

**Πίνακας 2.2.** Κωδικές ονομασίες και ιδιότητες των συμπυκνωμάτων καπνού<sup>a</sup>.

**Πίνακας 3.1.** Ελάχιστη παρεμποδιστική (MIC) και βακτηριοκτόνος (MBC) συγκέντρωση των 9 συμπυκνωμάτων υγρών καπνών, έπειτα από 5 ημέρες επώαση στους 7.9 και 37 °C, έναντι των κυττάρων του *L. monocytogenes*.

**Πίνακας 3.2.** Ελάχιστη παρεμποδιστική (MIC) και βακτηριοκτόνος (MBC) συγκέντρωση των συμπυκνωμάτων υγρών καπνών L9 και G6, έπειτα από 8 ημέρες επώαση στους 7.9 και 37 °C, έναντι κανονικών κυττάρων, ωσμωτικά προσαρμοσμένων και κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*.

**Πίνακας 4.1.** Δεκαδικοί χρόνοι μείωσης (τιμές D) των ωσμωτικά προσαρμοσμένων και κανονικών κυττάρων *L. monocytogenes*, έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 60 °C σε TSB<sub>y.e</sub> με διάφορες συγκεντρώσεις NaCl.

**Πίνακας 6.1.** Έντυπο οργανοληπτικής αξιολόγησης των φιλέτων καπνιστής πέστροφας. Τροποποιήθηκε από Huss, (1995).

**Πίνακας 6.2.** Εύρος βαθμολογίας που δίνει την πιθανότητα για έναν άγνωστο μικροοργανισμό να βρίσκεται ως είδος στην βάση δεδομένων του MALDI Biotyper.

**Πίνακας 6.3.** Αποτελέσματα μετρήσεων των φυσικοχημικών παραμέτρων pH και  $a_w$ , των φιλέτων καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης), από 2 περιοχές (A: Κεντρική Μακεδονία & B: Πελοπόννησος) στους 2.0 και 7.9 °C. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπ. απόκλιση, 3 επαναλήψεων.

**Πίνακας 6.4.** Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα καπνιστής πέστροφας από την περιοχή A, κατά τη συντήρηση σε συνθήκες κενού αέρα στους 2.0 και 7.9 °C. Οι τιμές (μέσοι όροι  $\pm$  τυπ. απόκλιση, 6 επαναλήψεων) εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την

προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi (Baranyi & Roberts 1994).

**Πίνακας 6.5.** Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα καπνιστής πέστροφας από την περιοχή Β, κατά τη συντήρηση σε συνθήκες κενού αέρα στους 2.0 και 7.9 °C. Οι τιμές (μέσοι όροι  $\pm$  τυπ. απόκλιση, 6 επαναλήψεων) εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi (Baranyi & Roberts 1994).

**Πίνακας 7.1.** Κωδικοποίηση όλων των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν σε μονοκαλλιέργειες.

**Πίνακας 7.2.** Κωδικοποίηση όλων των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν σε πολυκαλλιέργειες.

**Πίνακας 7.3.** Κινητικές παράμετροι των πιθανών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του *L. monocytogenes* (πλαγκτονικά και κύτταρα βιοϋμενίων) σε φιλέτα καπνιστής πέστροφας, κατά τη συντήρηση σε συνθήκες κενού αέρα στους 4.0 και 7.9 °C. Οι τιμές (μέσοι όροι  $\pm$  τυπ. απόκλιση, 3 επαναλήψεων) εκτός παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi (Baranyi & Roberts 1994).

**Πίνακας 7.4.** Κινητικές παράμετροι των πιθανών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του *L. monocytogenes* (πλαγκτονικά και κύτταρα βιοϋμενίων) σε μονοκαλλιέργειες σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη συντήρηση σε συνθήκες κενού αέρα στους 4.0 και 7.9 °C. Οι τιμές εκτός παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi (Baranyi & Roberts 1994).

**Πίνακας 7.5.** Κινητικές παράμετροι των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του *L. monocytogenes* (πλαγκτονικά και κύτταρα βιοϋμενίων) σε πολυκαλλιέργειες, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη συντήρηση σε συνθήκες κενού αέρα στους 4.0 και 7.9 °C. Οι τιμές εκτός παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή

των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi (Baranyi & Roberts 1994).

**Πίνακας 8.1.** Ποσοστό (%) τραυματισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* 10403S WT, σε θρεπτικό ζυμό BHI, σε νωπά και καπνιστά φιλέτα πέστροφας, έπειτα από εφαρμογή ΥΥΠ στα 200 MPa για 15 λεπτά με προσθήκη ή χωρίς G6 ή L9 0.50 % (v/v) και σε συνδυασμό με ή χωρίς κατάψυξη στους  $-80$  °C.



## Κατάλογος Σχημάτων

**Σχήμα 1.1.** Η επίδραση στην βιωσιμότητα των κυττάρων από μία αυξανόμενη ένταση καταπόνηση (Wesche & Ryser, 2013).

**Σχήμα 1.2.** Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων για το σχηματισμού βιοϋμενίου του *L. monocytogenes* σε στερεή επιφάνεια (McLandsborough et al., 2006).

**Σχήμα 1.3.** Διάγραμμα ροής της παραγωγικής διαδικασίας καπνιστής πέστροφας θερμής κάπνισης (προσωπική επαφή).

**Σχήμα 3.1.** Ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε TSB<sub>y</sub>.e μετά από επώαση στους 37 °C, για 10, 60, 120 και 720 λεπτά. (A) Ωσμωτικά προσαρμοσμένα και (B) Κανονικά κύτταρα (ελέγχου). Απαρίθμηση σε TSA<sub>y</sub>.e. των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε TSB<sub>y</sub>.e. με NaCl (w/v, %): (♦) 0.50, (×) 2.00 (●) 4.00 (▲) 6.00 (\*) 8.00 και (■) 10.00. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

**Σχήμα 3.2.** Ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε TSB<sub>y</sub>.e μετά από επώαση στους 37 °C, για 10, 60, 120 και 720 λεπτά. (A) Ωσμωτικά προσαρμοσμένα και (B) Κανονικά κύτταρα (ελέγχου). Απαρίθμηση σε PALCAM των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε TSB<sub>y</sub>.e. με NaCl (w/v, %): (♦) 0.50, (×) 2.00 (●) 4.00 (▲) 6.00 (\*) 8.00 και (■) 10.00. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

**Σχήμα 3.3.** Ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε TSB<sub>y</sub>.e μετά από επώαση στους 37 °C, για 10, 60, 120 και 720 λεπτά. (A) Ωσμωτικά προσαρμοσμένα και (B) Κανονικά κύτταρα (ελέγχου). Απαρίθμηση σε TSA<sub>y</sub>.e. + NaCl 5.00 %, των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε TSB<sub>y</sub>.e. με NaCl (w/v, %): (♦) 0.50, (×) 2.00 (●) 4.00 (▲) 6.00 (\*) 8.00 και (■) 10.00. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

**Σχήμα 4.1.** Θερμική αδρανοποίηση κυττάρων του *L. monocytogenes*, κανονικών (γκρι διακεκομμένη γραμμή) και ωσμωτικά προσαρμοσμένων (μαύρη διακεκομμένη γραμμή), στους 60 °C, σε TSB<sub>y</sub>.e. (A) με 0.50 %, (B) με 5.00 % και (Γ) με 10.00 % (w/v) NaCl. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6). Το επίπεδο σημαντικότητας των δειγμάτων σε σχέση με τα κανονικά κύτταρα (ελέγχου) επισημαίνεται με \* (P < 0.05).

**Σχήμα 4.2.** Πληθυσμός του *L. monocytogenes* μετά από θερμική αδρανοποίηση στους 60 °C, σε TSB<sub>y</sub>.e. (A) με 0.50 % (B) με 5.00 % και (Γ) με 10.00 % (w/v) NaCl για (1) Κανονικά και (2) Ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα; απαρίθμηση σε (■)

PALCAM, (▲) TSAy.e. + NaCl 5.00 % (◆) TSAy.e. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ). Τα κάθετα βέλη (↓) υποδεικνύουν τις τιμές που βρίσκονται κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης ( $< 2.00 \log \text{CFU/mL}$ ).

**Σχήμα 4.3.** Λογαριθμική μείωση του *L. monocytogenes*, ωσμωτικά προσαρμοσμένα και μη κύτταρα, μετά από θερμική καταπόνηση στους  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  λόγω της έκθεσης στην επιφάνεια τρυβλίων TSAy.e. με συγκεντρώσεις υγρών καπνών (L9 & G6) 0.25 % έως 1.00 % (v/v), σε επαυξήσεις των 0.25 %. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ). Με την οριζόντια διακεκομμένη γραμμή, παρουσιάζεται το όριο ανίχνευσης ( $2.00 \log \text{CFU/mL}$ ) του *L. monocytogenes*. Οι τιμές, εντός της ίδιας συγκέντρωσης υγρού καπνού, που συμβολίζονται με ίδιο μικρό γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0.05$ ). Οι τιμές, μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων για τον εκάστοτε υγρό καπνό (L9 ή G6), που συμβολίζονται με διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα είναι στατιστικώς σημαντικές ( $P < 0.05$ ).

**Σχήμα 5.1.** Καμπύλες ανάπτυξης του *L. monocytogenes* με ή χωρίς υγρό καπνό L9 και G6, σε συγκεντρώσεις 0.50 % και 1.00 %, έπειτα από επώαση 8 ημερών στους  $16 \text{ }^\circ\text{C}$  σε TSB<sub>y</sub>.e με 0.60 % yeast extract. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν τα κύτταρα βιοϋμενίων που αναπτύχθηκαν παρουσία 0.50 % (v/v) G6 (φωτεινό γκρι) και 1.00 % (v/v) G6 (σκούρο γκρι). Οι συνεχείς γραμμές αντιπροσωπεύουν τα κύτταρα βιοϋμενίων που αναπτύχθηκαν παρουσία 0.50 % (v/v) L9 (φωτεινό γκρι) και 1.00 % (v/v) L9 (σκούρο γκρι). Η συνεχής μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει τα κύτταρα βιοϋμενίων που αναπτύχθηκαν χωρίς παρουσία καπνού. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου ( $n = 6$ ). Τα κάθετα βέλη (↓) υποδεικνύουν τις τιμές που βρίσκονται κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης ( $< 1.00 \log \text{CFU/cm}^2$ ). Το επίπεδο σημαντικότητας των δειγμάτων σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου (control) επισημαίνεται με \* ( $P < 0.05$ ) και \*\* ( $P < 0.01$ ).

**Σχήμα 5.2.** Θερμική αδρανοποίηση κυττάρων του *L. monocytogenes*, πλαγκτονικά κύτταρα (γκρι διακεκομμένη γραμμή) και κύτταρα βιοϋμενίων (μαύρη διακεκομμένη γραμμή), στους  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , σε TSB<sub>y</sub>.e. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ). Το επίπεδο σημαντικότητας των δειγμάτων σε σχέση με τα πλαγκτονικά κύτταρα (ελέγχου) επισημαίνεται με \* ( $P < 0.01$ ).

**Σχήμα 5.3.** Πληθυσμός του *L. monocytogenes* μετά από θερμική αδρανοποίηση στους  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , σε TSB<sub>y</sub>.e. (A) πλαγκτονικά και (B) κύτταρα βιοϋμενίων; απαρίθμηση

σε (■) PALCAM, (▲) TSAy.e. + NaCl 5.00 % και (◆) TSAy.e (επιζώντες). Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ). Τα κάθετα βέλη ( $\downarrow$ ) υποδεικνύουν τις τιμές που βρίσκονται κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης ( $< 2.00 \log \text{CFU/mL}$ ).

**Σχήμα 5.4.** Λογαριθμική μείωση του *L. monocytogenes*, πλαγκτονικά κύτταρα και κύτταρα βιοϋμενίων, μετά από θερμική καταπόνηση στους  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  λόγω της έκθεσης στην επιφάνεια τρυβλίων TSAy.e. με συγκεντρώσεις υγρών καπνών (L9 & G6) 0.25 % έως 1.00 % (v/v), σε επαυξησεις των 0.25 %. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ). Με την οριζόντια διακεκομμένη γραμμή, παρουσιάζεται το όριο ανίχνευσης ( $2.00 \log \text{CFU/mL}$ ) του *L. monocytogenes*. Οι τιμές, εντός της ίδιας συγκέντρωσης υγρού καπνού, που συμβολίζονται με ίδιο μικρό γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0.05$ ). Οι τιμές, μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων για τον εκάστοτε υγρό καπνό (L9 ή G6), που συμβολίζονται με διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα είναι στατιστικώς σημαντικές ( $P < 0.05$ ).

**Σχήμα 6.1.** Μεταβολές των χαρακτηριστικών οσμής, γεύση και υφή των φιλέτων καπνιστής πέστροφας από την Περιοχή A, σε συσκευασία κενού αέρα A) στους  $7.9 \text{ }^\circ\text{C}$  και B) στους  $2.0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Με την κάθετη διακεκομμένη γραμμή, παρουσιάζεται ο χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης των φιλέτων. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ).

**Σχήμα 6.2.** Μεταβολές των χαρακτηριστικών οσμής, γεύση και υφή των φιλέτων καπνιστής πέστροφας από την Περιοχή B, σε συσκευασία κενού αέρα A) στους  $7.9 \text{ }^\circ\text{C}$  και B) στους  $2.0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Με την κάθετη διακεκομμένη γραμμή, παρουσιάζεται ο χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης των φιλέτων. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ).

**Σχήμα 6.3.** Μικροβιολογική ανάλυση φιλέτων καπνιστής πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*), από την Περιοχή A, κατά τη συντήρηση σε συσκευασία κενού αέρα A) στους  $2.0 \text{ }^\circ\text{C}$  και B) στους  $7.9 \text{ }^\circ\text{C}$ . Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Με την κάθετη διακεκομμένη γραμμή, παρουσιάζεται ο χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης των φιλέτων. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ).

**Σχήμα 6.4.** Μικροβιολογική ανάλυση φιλέτων καπνιστής πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*), από την Περιοχή Β, κατά τη συντήρηση σε συσκευασία κενού αέρα Α) στους 2.0 °C και Β) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Με την κάθετη διακεκομμένη γραμμή, παρουσιάζεται ο χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης των φιλέτων. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

**Σχήμα 6.5.** Ποσοστιαία κατανομή των μικροοργανισμών που ταυτοποιήθηκαν από τα φιλέτα προερχόμενα από την Βιομηχανία Α, κατά τη διάρκεια συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό αέρα στους 2.0 και 7.9 °C. Όλες οι αποικίες απαριθμήθηκαν και απομονώθηκαν από επιλεκτικό υλικό MRS με τιμές pH 5.4, 6.4 και 7.4. Η ημέρα 0 ήταν κοινή για τα φιλέτα, πριν την αποθήκευσή τους.

**Σχήμα 6.6.** Ποσοστιαία κατανομή των μικροοργανισμών που ταυτοποιήθηκαν από τα φιλέτα προερχόμενα από την Βιομηχανία Β, κατά τη διάρκεια συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό αέρα στους 2.0 και 7.9 °C. Όλες οι αποικίες απαριθμήθηκαν και απομονώθηκαν από επιλεκτικό υλικό MRS με τιμές pH 5.4, 6.4 και 7.4. Η ημέρα 0 ήταν κοινή για τα φιλέτα, πριν την αποθήκευσή τους.

**Σχήμα 6.7.** MSP δενδρόγραμμα φασμάτων αναφοράς για τις αποικίες που ταυτοποιήθηκαν από τα φιλέτα προερχόμενα από την περιοχή της κεντρικής Μακεδονίας Α) στους 2.0 °C και Β) στους 7.9 °C. Η κωδικοποίηση των μικροοργανισμών έχει ως εξής: *Candida zeylanoides* (1-4, 6, 12, 17, 19, 24, 30, 38, 43, 45, 62, 64, 67, 71, 77, 79, 81-82, 122, 124, 132-136, D2-D115, B12-B208), *Lactobacillus sakei* (5, 7-11, 13-16, 18, 20-23, 25-27, 31-37, 39-42, 44, 46, 48-56, 63, 65, 68, 73, 85, 89-90, 107, 115, 123, D154-D170). Οι αποστάσεις εμφανίζονται σε σχετικές μονάδες.

**Σχήμα 6.8.** MSP δενδρόγραμμα φασμάτων αναφοράς για τις αποικίες που ταυτοποιήθηκαν από τα φιλέτα προερχόμενα από την περιοχή της Πελοποννήσου Α) στους 2.0 °C και Β) στους 7.9 °C. Η κωδικοποίηση των μικροοργανισμών έχει ως εξής: *Lactobacillus curvatus* (GG1-GG2, GG46, GG48-GG50, GG57, GG61-GG93), *Lactobacillus sakei* (F11-F14, F16, F18, F23, F27-F29, F32, F69, F74, F79-F80, F82), *Candida zeylanoides* (F1-F3, F7-F10, F17, F20-F21, F24-F26, F31, F33-F38, F45-F48, F52-F56, F60-F63, F66-F67, F73, F81, F83-F85, F89, F92-F93, F99-F105, F117, F119, F120, F123, F127, F131-F132, F168), *Candida famata* (F42, F65, F68,

F78, F87, F90, F96, F101, F112-F113, F115-F116, F121, F125-F126, F128-F129, F151, F153-F156, F159-F160), *Enterococcus faecalis* (G5-G56, GG19, GG21-GG22, GG26-GG44, GG56, G05, G011). Οι αποστάσεις εμφανίζονται σε σχετικές μονάδες.

**Σχήμα 7.1.** Μικροβιολογική ανάλυση φιλέτων καπνιστής πέστροφας, μετά τον ενοφθαλμισμό τους με *L. monocytogenes* A) στους 4.0 °C και B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Ως ομάδα ελέγχου (control), θεωρήθηκαν οι πληθυσμιακές μεταβολές των οξυγαλακτικών βακτηρίων της φυσικής μικροβιακής σύνθεσης των φιλέτων σε MRS άγαρ. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).

**Σχήμα 7.2.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *L. monocytogenes* (μίγμα 5 οροτύπων), μετά τον ενοφθαλμισμό του σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

**Σχήμα 7.3.** Πληθυσμιακές μεταβολές των κυττάρων προερχόμενων από βιοϋμένια του *L. monocytogenes* (μίγμα 5 οροτύπων), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

**Σχήμα 7.4.** Πληθυσμιακές μεταβολές των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων οργανισμών σε μίγμα (AM), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το

μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ).

**Σχήμα 7.5.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Lactobacillus sakei* (Ls), μετά τον ενοφθαλμισμό του σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 3$ ).

**Σχήμα 7.6.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Lactobacillus curvatus* (Lc), μετά τον ενοφθαλμισμό του σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 3$ ).

**Σχήμα 7.7.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Candida famata* (Cf), μετά τον ενοφθαλμισμό του σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 3$ ).

**Σχήμα 7.8.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Candida zeylanoides* (Cz), μετά τον ενοφθαλμισμό του σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 3$ ).

**Σχήμα 7.9.** Πληθυσμιακές μεταβολές των πιθανών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε μίγμα (●) και του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ×), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό

κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

**Σχήμα 7.10.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Lactobacillus sakei* (●) και του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ×), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).

**Σχήμα 7.11.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Lactobacillus curvatus* (●) και του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ×), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).

**Σχήμα 7.12.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Candida famata* (●) και του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ×), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).

**Σχήμα 7.13.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Candida zeylanoides* (●) και του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ×), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης

στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 3$ ).

**Σχήμα 7.14.** Πληθυσμιακές μεταβολές των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε μίγμα (▲) και των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ●), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ).

**Σχήμα 7.15.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Lactobacillus sakei* (▲) και των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ●), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 3$ ).

**Σχήμα 7.16.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Lactobacillus curvatus* (▲) και των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ●), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 3$ ).

**Σχήμα 7.17.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Candida famata* (▲) και των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ●), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την



προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 3$ ).

**Σχήμα 7.18.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Candida zeylanoides* (▲) και των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ●), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 3$ ).

**Σχήμα 8.1.** Πληθυσμιακή μείωση των στελεχών του *L. monocytogenes*: (A) 10403S WT, (B) LO28 WT, (Γ) EGD-e WT, που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό ζωμό BHI, ενοφθαλμισμένο με συγκεντρώσεις των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού (L9 ή G6), 0.50 %, 0.75 % και 1.00 % για 0, 30, 60 και 180 λεπτά. Τα δείγματα ελέγχου (control) αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό ζωμό BHI χωρίς προσθήκη υγρού καπνού. Οι γραμμές εμφανίζουν τις τιμές του μέσου όρου 3 επαναλήψεων (που αναλύθηκαν εις διπλούν); οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ). Με την κάθετη διακεκομμένη γραμμή, παρουσιάζεται το όριο ανίχνευσης, 1.60 log CFU/mL.

**Σχήμα 8.2.** Επίδραση της ΥΥΠ στο *L. monocytogenes* 10403S WT, LO28 WT και EGD-e WT, σε θρεπτικό ζωμό BHI, με προσθήκη 0.50 % (v/v) G6 ή L9. Οι στήλες εμφανίζουν τις τιμές του μέσου όρου 3 επαναλήψεων (που αναλύθηκαν εις διπλούν); οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ). Οι τιμές, εντός της ίδιας διαχείρισης, που συμβολίζονται με ίδιο μικρό γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0.05$ ). Με διαφορετικά κεφαλαία γράμματα παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαχειρίσεων με ή χωρίς κατάψυξη ( $P < 0.05$ ). Οι τιμές, μεταξύ των τριών στελεχών, που συμβολίζονται με διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα είναι στατιστικώς σημαντικές ( $P < 0.05$ ).

**Σχήμα 8.3.** Επίδραση της ΥΥΠ στο *L. monocytogenes* 10403S WT, LO28 WT και EGD-e WT, σε θρεπτικό ζωμό BHI, με προσθήκη 0.50 % (v/v) G6 ή L9 με ή χωρίς NaCl, σε θερμοκρασία δωματίου (20 °C) και μετά από κατάψυξη στους -80 °C. Οι στήλες εμφανίζουν τις τιμές του μέσου όρου 3 επαναλήψεων (που αναλύθηκαν εις διπλούν); οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n =$

6). Οι τιμές, εντός της ίδιας διαχείρισης, που συμβολίζονται με ίδιο μικρό γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0.05$ ). Με διαφορετικά κεφαλαία γράμματα παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαχειρίσεων με ή χωρίς κατάψυξη ( $P < 0.05$ ). Η θερμοκρασία στην αρχή της ΥΥΠ είχε ρυθμιστεί στους  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  και καταγράφονταν σε όλη τη διάρκεια.

**Σχήμα 8.4.** Επίδραση της ΥΥΠ στο *L. monocytogenes* 10403S WT, σε νοπά φιλέτα πέστροφας, με προσθήκη 0.50 % (v/v) G6 ή L9 με ή χωρίς NaCl, σε θερμοκρασία δωματίου ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) και μετά από κατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Οι στήλες εμφανίζουν τις τιμές του μέσου όρου 3 επαναλήψεων (που αναλύθηκαν εις διπλούν); οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ). Οι τιμές, εντός της ίδιας διαχείρισης, που συμβολίζονται με ίδιο μικρό γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0.05$ ). Με διαφορετικά κεφαλαία γράμματα παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαχειρίσεων με ή χωρίς κατάψυξη ( $P < 0.05$ ). Η θερμοκρασία στην αρχή της ΥΥΠ είχε ρυθμιστεί στους  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  και καταγράφονταν σε όλη τη διάρκεια.

**Σχήμα 8.5.** Επίδραση της ΥΥΠ στο *L. monocytogenes* 10403S WT, σε φιλέτα καπνιστής πέστροφας, με προσθήκη 0.50 % (v/v) G6 ή L9, σε θερμοκρασία δωματίου ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) και μετά από κατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Οι στήλες εμφανίζουν τις τιμές του μέσου όρου 3 επαναλήψεων (που αναλύθηκαν εις διπλούν); οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ). Οι τιμές, εντός της ίδιας διαχείρισης, που συμβολίζονται με ίδιο μικρό γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0.05$ ). Με διαφορετικά κεφαλαία γράμματα παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαχειρίσεων με ή χωρίς κατάψυξη ( $P < 0.05$ ). Η θερμοκρασία στην αρχή της ΥΥΠ είχε ρυθμιστεί στους  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  και καταγράφονταν σε όλη τη διάρκεια.



## Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

Το γένος *Listeria*, απαρτίζεται από Gram-θετικά, κινητικά, ραβδόμορφα, δυνητικώς αναερόβια βακτηρίδια που δεν έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σπόρια (Seeliger et al., 1984). Στο γένος *Listeria*, ανήκουν συνολικά 20 είδη εκ των οποίων μόνο τα *L. monocytogenes* και *L. innocua* είναι παθογόνα (Liu, 2013; Gomez et al., 2014; Thakur et al., 2018). Τα υπόλοιπα 18 είδη είναι σαπροφυτικά και αναφορικά είναι τα *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. welshimeri* (Hitchins et al., 2016), *L. rocourtaie* (Leclercq et al., 2010), *L. marthii* (Graves et al., 2010), *L. weihenstephaneses* (Halter et al., 2013), το *L. fleischmanni* (Bertsch et al., 2013), *L. floridensis* (den Bakker et al., 2014), *L. aquatica* (den Bakker et al., 2014), *L. cornellensis* (den Bakker et al., 2014), *L. riparia* (den Bakker et al., 2014), *L. grandensis* (den Bakker et al., 2014), *L. booriae* (Weller et al., 2015), *L. newyorkensis* (Weller et al., 2015), *L. costaricensis* (Núñez-Montero et al., 2018), *L. goaensis* (Doijad et al., 2018) και το είδος *L. thailandensis* sp. nov. το οποίο ανακαλύφθηκε πρόσφατα κατά τη διάρκεια ελέγχου τηγανητού κοτόπουλου στην Ταϊλάνδη, από την περιοχή της οποίας πήρε το είδος το όνομα του (Leclercq et al., 2019). Το *L. monocytogenes*, είναι ένα τροφιμογενές παθογόνο βακτήριο ικανό να προκαλέσει τη λοίμωξη λιστερίωση, όπως επιβεβαιώθηκε πριν από περίπου 36 χρόνια από τους Schlech et al. (1983).

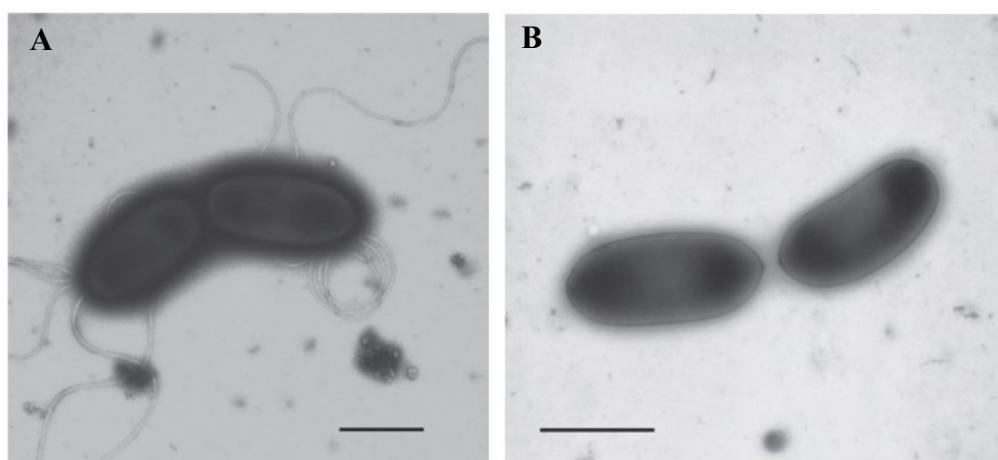
Πρόκειται για μία σχετικά σπάνια αλλά δυνητικώς θανατηφόρα ασθένεια με γαστρεντερικά συμπτώματα και πυρετό (Riedo et al., 1994). Εκδηλώνεται κατά κανόνα σε εγκύους, νεογέννητα, ηλικιωμένους, καθώς και σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Heyman, 2008; Buchanan, 2017).

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι κρούσματα λιστερίωσης, καταγράφονται κυρίως σε χώρες βιομηχανικά αναπτυγμένες, ενώ υπάρχουν ελάχιστες ή και καθόλου αναφορές για επιπολασμό της λοίμωξης σε χώρες όπως η Αφρική, η Ασία και η Νότια Αμερική

(Rocourt et al., 2000). Αυτό οφείλεται στις διαφορετικές τροφικές συνήθειες των ανθρώπων που ζουν σε αυτές τις περιοχές, στις μεθόδους συντήρησης των τροφίμων τους, και στην πιθανή υποεκτίμηση του επιπολασμού του βακτηρίου λόγω ελλιπών μετρήσεων στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας των τροφίμων (Rocourt, 1991; Rocourt & Brosch, 1992; Rocourt et al., 1997).

### 1.1. Χαρακτηριστικά του *L. monocytogenes*

Όπως και τα υπόλοιπα είδη του γένους του, το *L. monocytogenes* είναι ψυχρότροφο, Gram-θετικό, προαιρετικά αναερόβιο, ραβδόμορφο βακτήριο. Το μέγεθος των κυττάρων του μπορεί να φτάνει τα 0.4 – 0.5 μm σε διάμετρο και 0.5 – 2.0 μm σε μήκος με στρογγυλεμένα άκρα που είναι δυνατόν να σχηματίζουν και μικρές αλυσίδες. Το *L. monocytogenes* μπορεί και αναπτύσσεται σ' ένα μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος από –0.4 – 42 °C, με βέλτιστη θερμοκρασία επώασης τους 30 – 37 °C (Pietzka et al., 2011; Sauders et al., 2012). Πρόκειται για μικροοργανισμό που διαθέτει την ικανότητα κίνησης μέσω μαστιγίων σε θερμοκρασίες δωματίου (20 – 25 °C), την οποία όμως χάνει στους 36 – 37 °C, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.1, επειδή το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της φλαγγελίνης (flagellin) δεν μεταγράφεται σ' αυτή την υψηλή θερμοκρασία (Griffiths et al., 2003).



**Εικόνα 1.1.** Εικόνες τραβηγμένες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, όπου εμφανίζεται το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes*, στην αριστερή φωτογραφία (A), έπειτα από υγρή καλλιέργεια στους 20 °C τα κύτταρα του παθογόνου διαθέτουν το μαστίγιο και στην δεξιά φωτογραφία (B), έπειτα από υγρή καλλιέργεια στους 36 °C τα κύτταρα του *L. monocytogenes* έχουν χάσει την ικανότητα κίνησης μη διαθέτοντας το μαστίγιο. Η μπάρα έχει μέγεθος 1 μm (Allerberger et al., 2015).

Το *L. monocytogenes* είναι αυξοτροφικός μικροοργανισμός, που σημαίνει ότι μπορεί να αναπτυχθεί στο θρεπτικό μέσο μόνο παρουσία ορισμένων απαραίτητων παραγόντων. Συγκεκριμένα, το θρεπτικό υλικό θα πρέπει να περιέχει τα εξής 7 αμινοξέα: λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη, μεθειονίνη, αργινίνη, κυστεΐνη και γλουταμίνη (Premaratne et al., 1991). Ακόμη, είναι απαραίτητη η ύπαρξη 4 βιταμινών, οι οποίες είναι η ριβοφλαβίνη, η βιοτίνη, η θειαμίνη και το θειοκτικό οξύ (α-λιποϊκό οξύ; Premaratne et al., 1991). Γενικά, πρόκειται για έναν ιδιαίτερα απαιτητικό μικροοργανισμό σε αφθονία θρεπτικών συστατικών στο υλικό ανάπτυξής του. Παρόλα αυτά, το *L. monocytogenes*, μπορεί και αναπτύσσεται ικανοποιητικά και σε υγρά θρεπτικά μέσα γενικής χρήσης εκτός από τα επιλεκτικά μέσα. Ο ζωμός Brain Heart Infusion (BHI) και το Tryptic Soy Broth (TSB) με προσθήκη ή χωρίς yeast extract 0.6 % (TSBy.e.) χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανάπτυξη των κυττάρων του παθογόνου (Atlas, 2006; Jones & D’Orazio, 2013). Σε κάθε περίπτωση το είδος του τροφίμου, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού και το φυσικό μικροβίωμα του τροφίμου θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τη σωστή επιλογή θρεπτικού ανάπτυξης (Brackett & Beuchat, 1989).

Για την αποτελεσματικότερη ανίχνευση του παθογόνου *L. monocytogenes* και τον επιτυχή διαχωρισμό του από άλλα είδη του γένους, έχει αναπτυχθεί μια μεγάλη ποικιλία εκλεκτικών υλικών καθώς και άλλων χρωμογόνων υποστρώματων (Curtis et al., McClain & Lee, Van Netten et al., 1989). Τα επιλεκτικά υποστρώματα PALCAM, Oxford και modified Oxford agar (MOX) επιτρέπουν τον διαχωρισμό των *Listeria* spp. από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς, αφού είναι σχεδιασμένα να ανιχνεύουν την υδρόλυση του γλυκοζίτη εσκουλίνη (McLauchlin, 1987). Για τον επιτυχή διαχωρισμό του παθογόνου *L. monocytogenes* από τα υπόλοιπα είδη του γένους *Listeria* τα τελευταία 20 χρόνια έχουν αναπτυχθεί ειδικά χρωμογόνα υποστρώματα,

όπως είναι το BBL CHROMagar *Listeria*, το ALOA, το Rapid'L. mono agar, CHROMagar *Listeria*, και Oxoid chromogenic *Listeria* agar (OCLA), Brilliance *Listeria* Agar (Ottaviani et al., 1997; Willis et al., 2006; Hedge et al., 2007; Park et al., 2014).

Το *L. monocytogenes*, παραδοσιακά διαιρείται σε 13 ορότυπους με βάση τους μοναδικούς συνδυασμούς των σωματικών Ο και των μαστιγωτών Η αντιγόνων. Συγκεκριμένα, η διαίρεση τους είδους γίνεται στους ορότυπους (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, και 7) εκ των οποίων οι ορότυποι 1/2a, 1/2b και 4b εμπλέκονται κυρίως και είναι υπεύθυνοι για το 95 % των κρουσμάτων λιστερίωσης που προκαλούνται από τα τρόφιμα (Jordan & McAuliffe, 2018). Η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός των στελεχών και ιδιαίτερα των μολυσματικών του *L. monocytogenes* είναι πρωταρχικής σημασίας για τις επιδημιολογικές έρευνες αλλά και για τη βιομηχανία τροφίμων, όπου η παρουσία του παθογόνου μπορεί να προκαλέσει μεγάλη ανησυχία (Doumith et al., 2004). Από το 2005 και έπειτα οι 13 ορότυποι του *L. monocytogenes* έχουν αντικατασταθεί και κατηγοριοποιηθεί σε 5 γονιδιακές ομάδες (genoserogroups) που ανέπτυξαν οι Doumith et al. (2004) με τη χρήση της μεθόδου PCR. Με τον τρόπο αυτό κατάφεραν να διαχωρίσουν σε διαφορετικές ομάδες τους 4 κυριότερους ορότυπους του *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b) που απομονώνονται συχνότερα από τα τρόφιμα και τους ανθρώπους με 100 % συσχέτιση μεταξύ των οροτύπων και των ομάδων τους (Leong et al., 2017). Αναλυτικά, οι ομάδες που προέκυψαν και οι ορότυποι που εντάσσονται σε αυτές ήταν: Πα (ορότυποι 1/2a και 3a), Πb (ορότυποι 1/2b και 3b), Πc (ορότυποι 1/2c και 3c), IVb (ορότυποι 4b, 4d, και 4e) και L (ορότυποι 4a, 4ab, 4c και 7).



## 1.2. Λιστερίωση και επιπολασμός

Η λιστερίωση είναι ένα τροφιμογενές νόσημα και παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τη δημόσια υγεία λόγω κυρίως της υψηλής θνητότητας και των συμπτωμάτων της. Εκτιμάται ότι το 99 % των κρουσμάτων λιστερίωσης προέρχεται από την κατανάλωση επιμολυσμένων τροφίμων και ειδικά έτοιμων προς κατανάλωση (RTE), όπως είναι τα κατεψυγμένα λαχανικά, διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα, κρεατοπαρασκευάσματα, καπνιστά ψάρια και άλλα αλιευτικά προϊόντα (Handa et al., 2005; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007; Scallan et al., 2011; Acciari et al., 2017; EFSA & ECDC, 2018), είτε πρόκειται για μεμονωμένα κρούσματα είτε για επιδημίες. Εκδηλώνεται κατά κανόνα σε εγκύους, νεογέννητα, ηλικιωμένους (ηλικία  $\geq 60$ ), καθώς και σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Η κλινική εικόνα του νοσήματος περιλαμβάνει πυρετό, μυαλγίες και ενίοτε συμπτώματα από το γαστρεντερικό σύστημα, όπως ναυτία ή διάρροια. Η μέση περίοδος επώασης της νόσου υπολογίζεται περίπου στις 3 εβδομάδες ενώ έπειτα από επιδημιολογικές εξάρσεις έχουν καταγραφεί περίοδοι επώασης από 3 έως και 70 ημέρες (Heymann, 2008).

Σχετικά με την Ελληνική βιομηχανία έχουν καταγραφεί δύο πρόσφατα κρούσματα ανάκλησης προϊόντων που οφείλονταν στο *L. monocytogenes*. Στην πρώτη περίπτωση που καταγράφηκε τον Φεβρουάριο του 2014, έπειτα από έλεγχο του Ενιαίου φορέα ελέγχου τροφίμων (ΕΦΕΤ) σε εγχώρια βιομηχανία επεξεργασίας αλιευτικών προϊόντων βρέθηκε *L. monocytogenes* σε συγκεκριμένες παρτίδες καπνιστής πέστροφας και απαιτήθηκε η ανάκλησή τους ([http 1](#)). Στη δεύτερη περίπτωση τον Δεκέμβριο του 2012, ο Αμερικάνικος Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration – FDA), αναφέρει ότι Ελληνική εταιρία, ανακάλεσε όλες τις παρτίδες καπνιστής πέστροφας από την αγορά της Αμερικής, λόγω περιπτώσεων λιστερίωσης ([http 2](#)).

Η Ευρωπαϊκή ένωση, έχει θεσπίσει ως αποδεκτό όριο τα 100 κύτταρα/γρ τροφίμου (100 CFU/g), για τα τρόφιμα που δεν είναι ικανά να υποστηρίξουν την περαιτέρω ανάπτυξη του βακτηρίου κατά τη συντήρησή τους καθώς για τα προϊόντα που δυνητικά μπορούν να επιτρέψουν την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* απαιτείται η απουσία του, καθώς ο κίνδυνος για λιστερίωση παραμένει ακόμη και όταν το βακτήριο απαντάται σε πολύ χαμηλό πληθυσμό (ECDC, 2018; EFSA, 2012; European Commission, 2005). Τα χαρακτηριστικά των τροφίμων που ορίζονται ως μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του παθογόνου είναι: pH = 4.4 και  $a_w \leq 0.92$  ή pH  $\leq 5.0$  και  $a_w \leq 0.94$  και διάρκεια ζωής μικρότερη των 5 ημερών (European Commission, 2005). Είναι κοινώς αποδεκτό ότι το παθογόνο μπορεί να απαντάται σε μια ευρεία γκάμα τροφίμων έχοντας ως κυριότερη πηγή τα ήπια επεξεργασμένα τρόφιμα, δηλαδή τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Ready-To-Eat – RTE; Smith et al., 2011; McCollum et al., 2013; Choi et al., 2014; McIntyre et al., 2015). Ενδεικτικό είναι το γεγονός ότι για την περίοδο 2004 – 2006, τα έτοιμα προς κατανάλωση (RTE) προϊόντα κρέατος και ψαριών βρέθηκαν στην πρώτη θέση των θετικά επιμολυσμένων τροφίμων με *L. monocytogenes* (EFSA & ECDC, 2014).

Ο επιπολασμός της λιστερίωσης κυμαίνεται από 0.1 έως και 11.3 περιπτώσεις ανά 1.000.000 άτομα σε όλο τον κόσμο. Παρά το μικρό επιπολασμό της νόσου, τα υψηλά ποσοστά 20 – 30 % την καθιστούν ιδιαίτερα επικίνδυνη (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

### **1.3. Ανίχνευση του παθογόνου σε διάφορα περιβάλλοντα και στη βιομηχανία τροφίμων**

Το *L. monocytogenes* είναι ένας παθογόνος μικροοργανισμός ο οποίος απαντάται σε όλα σχεδόν τα περιβάλλοντα με υψηλά ποσοστά ανίχνευσης, στο έδαφος με ή χωρίς υψηλά ποσοστά υγρασίας, στο νερό καθώς και σε καλλιεργούμενες γεωργικές

εκτάσεις, στις υδατοκαλλιέργειες και ως επακόλουθο στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων (Strawn et al., 2013). Οι διάφορες συνθήκες που επικρατούν σ' ένα ενδιαίτημα αλλά και τα ποσοστά υγρασίας και τα διαθέσιμα θρεπτικά υλικά μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την επιβίωση και επομένως την ανίχνευση του παθογόνου σε αυτά (McLaughlin et al., 2011).

Η μεταφορά του *L. monocytogenes* στο τρόφιμο μπορεί να έχει γίνει είτε από το περιβάλλον είτε κατά την διάρκεια των διαφόρων σταδίων της παραγωγικής επεξεργασίας. Πολυάριθμες εργασίες αποδεικνύουν ότι το τροφιμογενές παθογόνο *L. monocytogenes* είναι ευρέως διαδεδομένο στο περιβάλλον των βιομηχανιών επεξεργασίας τροφίμων (Bolocan et al., 2016; Leong et al., 2017; Taguchi et al., 2017). Κατά την είσοδο του βακτηρίου σ' ένα χώρο, λόγω των ιδιοτήτων του αλλά και μιας σειράς ανθρώπινων αστοχιών, όπως είναι οι κακές εγκαταστάσεις, η λανθασμένη τους συντήρηση και η ατελής και αναποτελεσματική καθαριότητα και αποστείρωση του χώρου και του εξοπλισμού, δίνουν τη δυνατότητα στον μικροοργανισμό να επιζήσει και να παραμείνει (Carpentier & Cerf, 2011; Wang et al., 2015).

Συχνά γίνεται αναφορά για εύρεση και απομόνωση των ίδιων στελεχών του *L. monocytogenes* από εγκαταστάσεις και εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων (Fox et al., 2011). Τα στελέχη αυτά του παθογόνου χαρακτηρίζονται ως ανθεκτικά εάν υπάρχουν στον ίδιο χώρο για διάστημα μεγαλύτερο των 6 μηνών (Ferreira et al., 2014). Στην περίπτωση αυτή προκύπτει ότι το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσιάζει αυξημένη ανθεκτικότητα στις επεξεργασίες που λαμβάνουν χώρα στη συγκεκριμένη βιομηχανική μονάδα, ανεξαιρέτως των διαδικασιών εξυγίανσης των εγκαταστάσεων και του εξοπλισμού (Carpentier & Cerf, 2011). Πολλά στελέχη του παθογόνου, *L. monocytogenes* παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε διάφορες καταπονήσεις, όπως η

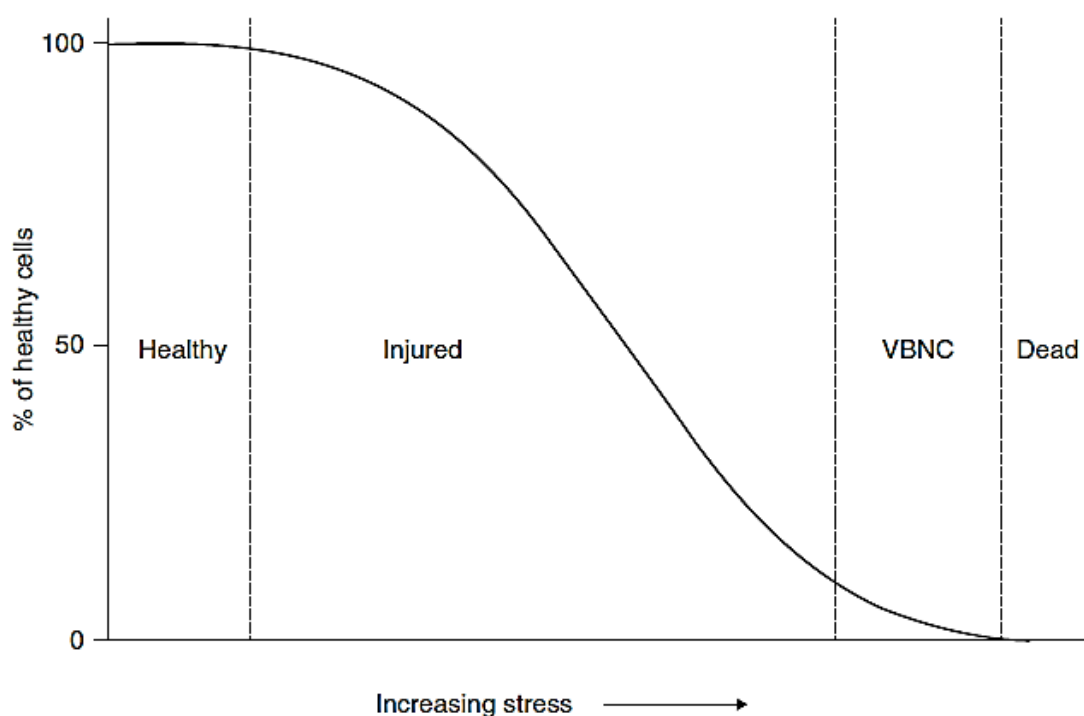
υψηλή αλατότητα ή οξύτητα, χαμηλά επίπεδα οξυγόνου, ενεργότητας νερού ( $a_w$ ) ή ακόμη και αυξημένη αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες κατά την επεξεργασία των τροφίμων. Επίσης, οι Walker et al. (1990) παρατήρησαν ότι ο μικροοργανισμός κατάφερε να επιζήσει και να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες ψυγείου που κυμαίνονταν από  $-0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  έως και  $9.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Έτσι λοιπόν για όλους τους λόγους που περιεγράφηκαν παραπάνω θα πρέπει να αποκτήσουμε καλύτερη κατανόηση των χαρακτηριστικών του μικροοργανισμού, των μηχανισμών ανθεκτικότητάς και τις αλληλεπιδράσεις του στο τρόφιμο για τον καλύτερο σχεδιασμό μέτρων για την προάσπιση της δημόσιας υγείας και της μείωσης της συχνότητας εμφάνισης της λιστερίωσης. Είναι απαραίτητη η καλύτερη επίγνωση της κατάστασης σε επίπεδο λιανικής σχετικά με την παρουσία του παθογόνου, καθώς είναι το τελικό στάδιο πριν το προϊόν καταλήξει στον καταναλωτή (Jordan & McAuliffe, 2018).

#### **1.4. Ανθεκτικότητα του *L. monocytogenes* στις διάφορες καταπονήσεις κατά την επεξεργασία και αποθήκευση τροφίμων.**

Οι περισσότερες ερευνητικές προσπάθειες έχουν υποδείξει, ότι η παρατεταμένη παραμονή του παθογόνου στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων μπορεί να σχετίζεται με την ικανότητά του να σχηματίζει βιοϋμένια ή να αναπτύσσει συστήματα ανθεκτικότητας που το βοηθούν να επιβιώνει και να ανταπεξέρχεται στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Tresse et al., 2007; Renier et al., 2011; Pilchová et al., 2014). Όταν ένας μικροοργανισμός εκτίθεται στις διάφορες καταπονήσεις, ένα μέρος του πληθυσμού του θα τραυματιστεί (injured) παρουσιάζοντας διαφορετικά επίπεδα τραυματισμού για κάθε κύτταρο μεμονωμένα, ανάλογα με την φυσιολογική του κατάσταση ή το ιστορικό ανάπτυξης. Ένα μέρος του πληθυσμού μπορεί να μείνει

ανεπηρέαστο (healthy), ενώ τα κύτταρα που παρουσιάζουν υποθανάτιο τραυματισμό (injured) δεν μπορούν να ανιχνευθούν με καλλιέργεια σε επιλεκτικά υλικά, λόγω της ευαισθησίας τους στους επιλεκτικούς παράγοντες. Ωστόσο, εφόσον η καταπόνηση υποχωρήσει και απουσία παρεμποδιστικών παραγόντων, μπορούν να επιδιορθώσουν τις κυτταρικές τους βλάβες (repair) και να ανακάμψουν πλήρως (recovery) ή αν η καταπόνηση επιμείνει να υποχωρήσουν στην πίεση της και να εισέλθουν σε μία κατάσταση όπου δεν μπορούν να αυξηθούν (viable-but-nonculturable – VBNC) και τέλος να οδηγηθούν σε θάνατο (Dead; Σχήμα 1.1).



**Σχήμα 1.1.** Η επίδραση στην βιωσιμότητα των κυττάρων από μία αυξανόμενη ένταση καταπόνηση (Wesche & Ryser, 2013).

Το περιβάλλον των τροφίμων είναι σχετικά στρεσογόνο για τα βακτήρια, καθώς τα περισσότερα θρεπτικά συστατικά έχουν τη μορφή σύνθετων υποστρωμάτων, μπορεί να υπάρχουν μειωμένα επίπεδα υγρασίας, παρουσία οξέων ή και άλλων χημικών ουσιών ή ακόμη και ανταγωνισμός μεταξύ των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται

στο ίδιο το τρόφιμο (Sofos, 2002). Παραδοσιακά τα εμπόδια που εφαρμόζονται για την συντήρηση των τροφίμων και για την αντιμετώπιση των παθογόνων είναι η θερμότητα (υψηλή ή χαμηλή θερμοκρασία), η οξύτητα (μείωση pH), η μείωση της ενεργότητας ύδατος ( $a_w$ ) με προσθήκη άλατος, η προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών και η τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Αυτά τα εμπόδια μεμονωμένα ή και σε συνδυασμό μπορούν να λειτουργήσουν αποτελεσματικά για τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας, όμως η έκθεση του *L. monocytogenes* σε μία από αυτές τις καταπονήσεις μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ανθεκτικότητα του βακτηρίου αλλά και προστασία από άλλες καταπονήσεις (Leistner, 1995; Archer, 1996).

#### **1.4.1. Ωσμωτική καταπόνηση**

Η αλάτιση αποτελεί μία από τις αρχαιότερες και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους συντήρησης τροφίμων. Η ωσμωτική καταπόνηση των βακτηρίων στα τρόφιμα είναι το αποτέλεσμα από την προσθήκη αλάτων ή σακχάρων σε αυτό για τη βελτίωση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών και την αύξηση της διάρκειας ζωής ευπαθών προϊόντων όπως είναι τα ψάρια, τα θαλασσινά, τα τυριά κ.α. (Burgess et al., 2016). Ωστόσο, η αυξημένη ανθεκτικότητα του *L. monocytogenes* στις υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων κάνει τον έλεγχο του βακτηρίου ιδιαίτερα δύσκολο καθώς έχει βρεθεί να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται σε συγκεντρώσεις NaCl έως και 10 % (McClure et al., 1989). Προκειμένου το παθογόνο να ανταπεξέλθει σε μια τέτοιου είδους στρεσογόνο κατάσταση και να επιβιώσει στις αυξημένες συγκεντρώσεις αλάτων, θα πρέπει να διατηρήσει την ισορροπία του κυτταροπλάσματος και του εξωτερικού του περιβάλλοντος (Bae et al., 2012).

Για να καταφέρουν να επιβιώσουν από την ωσμωτική καταπόνηση τα κύτταρα του *L. monocytogenes* χρησιμοποιούν τον παρακάτω μηχανισμό. Η λειτουργία του μηχανισμού σχετίζεται με την συσσώρευση οσμολυτών όπως η καρνιτίνη, η γλυκίνη -

βηταΐνη, γνωστές ως και συμβατές διαλυμένες ουσίες, στο κυτταρόπλασμα για τη μείωση της ωσμωτικής πίεσης αλλά και τον έλεγχο απώλειας νερού από τα κύτταρα (Duché et al., 2002; Beales, 2004). Οι οσμολύτες είναι οργανικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που επηρεάζουν τις ιδιότητες των βιολογικών υγρών, χωρίς να επηρεάζουν τις μεταβολικές ιδιότητες των κυττάρων. Εκτός όμως από την ιδιότητα τους να διατηρούν την πίεση σπαργής του κυτταροπλάσματος, οι οσμολύτες έχει αποδειχθεί ότι σταθεροποιούν τη δομή και τη λειτουργία των ενζύμων κατά την ωσμωτική καταπόνηση (Lippert & Galinski, 1992). Ακόμη, παρατηρείται αυξημένη έκφραση γονιδίων ( $\sigma$  factor,  $\sigma^B$ ) που εμπλέκονται στη σύνθεση των απαιτούμενων πρωτεϊνών για τη σύνθεση και τη μεταφορά των αντίστοιχων ωσμωπροστατευτικών οσμολυτών (Abee & Wouters, 1999; Cacace et al., 2010, Bae et al., 2012). Έτσι λοιπόν, η προσαρμογή των κυττάρων του παθογόνου στην ωσμωτική καταπόνηση μπορεί να ευθύνεται και για την αυξημένη ανθεκτικότητα αυτών σε επιπρόσθετα εμπόδια (Rodriguez-Romo et al., 2005).

#### **1.4.2. Καταπόνηση σε υψηλές θερμοκρασίες**

Για την καταπολέμηση των βλαστικών, των αλλοιωγόνων και των παθογόνων κυττάρων που απαντώνται στα τρόφιμα, η βιομηχανία τροφίμων εφαρμόζει ήπια θερμική επεξεργασία (<100 °C). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ασφάλεια των προϊόντων και η επέκταση της διάρκειας ζωής τους σε συνδυασμό με τη σωστή συσκευασία τους και τη διανομή και αποθήκευση κάτω από τις κατάλληλες θερμοκρασίες (van Boekel et al., 2010). Η θερμική καταπόνηση των μικροοργανισμών ορίζεται ως η έκθεση των κυττάρων σε θερμοκρασίες υψηλότερες από την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους που μπορεί να προκαλέσει εμφανή θάνατο στον πληθυσμό τους (Rodriguez-Romo et al., 2005). Η θερμική καταπόνηση είναι ακόμη πιο εμφανής όταν αυτή προκαλεί μικρή μείωση στον πληθυσμό του

μικροοργανισμού και συγκεκριμένα  $< 1.00 \log$ . Ωστόσο η κυριότερη ανησυχία κατά τη θερμική καταπόνηση, παραμένει η ικανότητα των παθογόνων να ανακάμπτουν από το υποθανάτιο σοκ και να πολλαπλασιάζονται στο τελικό προϊόν κατά την αποθήκευσή του (Mackey et al., 1994; Lundén et al., 2008; Li et al., 2017).

Συγκεκριμένα, το *L. monocytogenes* αν και δεν εμφανίζει ιδιαίτερα υψηλή αντοχή στην υψηλή θερμοκρασία, έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο θερμοάντοχο σε σχέση με άλλα μη σπορογόνα βακτήρια όπως η *Salmonella* και το *Escherichia coli* (Abdel Kareem & Mattar, 2001; Huang, 2004). Για να ανταπεξέλθει το παθογόνο αυτής της καταπόνησης, οδηγείται στην έκφραση μεγάλου αριθμού θερμοανθεκτικών πρωτεϊνών που προστατεύουν από την καταστροφή τους τα κύτταρα και του προσδίδουν επίσης, ανθεκτικότητα και σε άλλες καταπονήσεις (Juneja & Novak, 2003). Ο ρόλος των πρωτεϊνών είναι η επισκευή των τραυματισμένων κυττάρων και η συμμετοχή τους ως μοριακοί συνοδοί (π.χ. DnaK και GroEL) στην αναδίπλωση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών (Vorob'eva, 2004). Άλλες πρωτεΐνες (π.χ. όπως η ClpP) εμπλέκονται στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών που έχουν υποστεί ζημιά κατά τη θερμική επεξεργασία (Krüger et al., 2001). Επιπρόσθετα, οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανθεκτικότητα του *L. monocytogenes* στη θερμική επεξεργασία μπορεί να ποικίλλουν μεταξύ των στελεχών, της ηλικίας των κυττάρων, των συνθηκών μελέτης και ανάπτυξης τους, των προηγούμενων καταπονήσεων ή τα συστατικά του τροφίμου (Doyle et al., 2001).

#### **1.4.3. Καταπόνηση σε χαμηλές θερμοκρασίες**

Η καταπόνηση του *L. monocytogenes* στις χαμηλές θερμοκρασίες οδηγεί σε μείωση της μεταβολικής του δραστηριότητας, καθώς επίσης στην ανάπτυξη μηχανισμών για να καταφέρει να επιβιώσει. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν αλλαγές στη λιπιδική σύνθεση της μεμβράνης, έκφραση κρυοπροστατευτικών πρωτεϊνών (Cold



shock proteins - Csps) και τέλος πρόσληψη κρυοπροστατευτικών οσμολυτών όπως η καρνιτίνη και η βηταΐνη (Neunlist et al., 2005; Rantsiou et al., 2012; Durack et al., 2013; Cordero et al., 2016). Προκειμένου το παθογόνο να καταφέρει να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες μικρότερες της βέλτιστης (7.0 °C) αυξάνει τον αριθμό των ακόρεστων λιπαρών οξέων, διατηρώντας έτσι τη ρευστότητα της μεμβράνης (Beales, 2004). Σχετικά με την έκφραση πρωτεϊνών στις χαμηλές θερμοκρασίες το *L. monocytogenes* αυξάνει την έκφραση πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως GroEL, ClpP και ClpB τα οποία εμπλέκονται στην επιδιόρθωση τραυματισμένων κυττάρων λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας (Liu et al., 2002). Επίσης, για την επιβίωση του *L. monocytogenes* στις χαμηλές θερμοκρασίες είναι υπεύθυνες οι κρυοπροστατευτικές πρωτεΐνες (Csps) και οι πρωτεΐνες εγκλιματισμού (Cold acclimation proteins – Caps) που συντίθενται κατά την απόκριση του παθογόνου στη μείωση της θερμοκρασίας (Bayles et al., 1996). Τέλος, η απότομη μείωση της θερμοκρασίας οδηγεί στη μεταγραφή γονιδίων του παράγοντα  $\sigma^B$  που ευθύνονται για την πρόσληψη κρυοπροστατευτικών οσμολυτών όπως η καρνιτίνη και η βηταΐνη (Angelidis & Smith, 2003).

#### **1.4.4. Καταπόνηση με την εφαρμογή Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (ΥΥΠ)**

Η επεξεργασία των τροφίμων και ιδιαίτερα των έτοιμων προς κατανάλωση (RTE) με τη χρήση της υπερυψηλής πίεσης (High Pressure Processing - HPP) έχει προταθεί ως μία σύγχρονη μη θερμική μέθοδος για την αδρανοποίηση των μικροοργανισμών και των παθογόνων βακτηρίων (Georget et al., 2015; Syed et al., 2016). Μπορεί να βρει εφαρμογή σε ένα μεγάλο εύρος προϊόντων, όπως κρέας και προϊόντα κρέατος, ψάρια και θαλασσινά, χυμούς, φρούτα κ.α. Οι πιέσεις που εφαρμόζονται κυμαίνονται στα 100 – 1000 MPa, ενώ στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούνται κυρίως πιέσεις από 200 – 750 MPa ανάλογα με τους μικροοργανισμούς στόχους. Τα κύτταρα των

βακτηρίων που υποβάλλονται σε ΥΥΠ, παρουσιάζουν αλλαγές στη μορφολογία και τη φυσιολογία τους οι οποίες μπορεί να είναι αναστρέψιμες, ανάλογα με την εφαρμοζόμενη πίεση και τον χρόνο συγκράτησης. Τα κύρια αποτελέσματα της ΥΥΠ είναι η αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, η διατάραξη της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών και κατά συνέπεια η αναστολή του μεταβολισμού, της αντιγραφής και της μεταγραφής των κυττάρων (Huang et al., 2014).

Από την άλλη μεριά, πολυάριθμες έρευνες έχουν αποδείξει ότι το *L. monocytogenes* καταφέρνει και ανταπεξέρχεται των πιέσεων σε διαφορετικά τρόφιμα όπως ψάρια (Ramaswamy et al., 2008), αλιευτικά προϊόντα (Das et al., 2016), χυμούς (Alpas & Bozoglu, 2003), τυριά (Tomasula et al., 2014; Evert-Arriagada, 2018) και έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα (Hereu et al., 2012; Jung et al., 2014). Από τα αποτελέσματα των ερευνών διαφαίνεται ότι η αντίσταση του *L. monocytogenes* στην καταπόνηση με ΥΥΠ ποικίλει ανάλογα με το στέλεχος, το είδος του τροφίμου καθώς και τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά. Οι βιταμίνες, τα αμινοξέα και τα κατιόντα μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ) και ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ) μπορεί να έχουν προστατευτικά αποτελέσματα καθώς όπως είναι γνωστό τα κατιόντα μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ) σταθεροποιούν τη δομή των ριβοσωμάτων και τα κατιόντα ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ) ενισχύουν την εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων (Niven et al., 1999). Επίσης, όπως περιεγράφηκε και στο 1.5.1. για την ωσμωτική καταπόνηση, ο Abe (2007) αναφέρει ότι σε περιβάλλον με υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων γίνεται πρόσληψη οσμολυτών οι οποίοι σταθεροποιούν τη δομή και τη λειτουργία των ενζύμων στο κυτταρόπλασμα κατά την καταπόνηση με ΥΥΠ.

Τα αποτελέσματα της έρευνας των Karatzas & Bennik (2002), έδειξαν ότι ακόμη και το στάδιο ανάπτυξης στο οποίο βρίσκεται το *L. monocytogenes* μπορεί να καθορίσει

την ανθεκτικότητα του στις εφαρμοζόμενες πιέσεις της ΥΥΠ. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι ένα τυχαίο ανθεκτικό στέλεχος και το Scott A, του *L. monocytogenes* κατά την στατική φάση ανάπτυξης ήταν πιο ανθεκτικά στην καταπόνηση σε σχέση με όταν βρίσκονταν στην εκθετική τους φάση. Η έρευνα των Bowman et al. (2008) σε γονιδιακό επίπεδο, έδειξε ότι κατά την καταπόνηση του *L. monocytogenes* με ΥΥΠ παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA, τη μεταγραφή, τη μετάφραση, την κυτταρική διαίρεση, την έκφραση πρωτεϊνών, τη σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος. Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην ίδια μελέτη είχε η παρατήρηση της συχνής μεταγραφής γονιδίων υπεύθυνων για την έκφραση των κρυοπροστατευτικών πρωτεϊνών (Csps), υποδηλώνοντας ότι η καταπόνηση με ΥΥΠ μπορεί να προσδίδει αυξημένη αντοχή και σε άλλες καταπονήσεις.

## **1.5. Χαρακτηριστικά των βιοϋμενίων του *L. monocytogenes***

### **1.5.1. Εισαγωγικά στοιχεία**

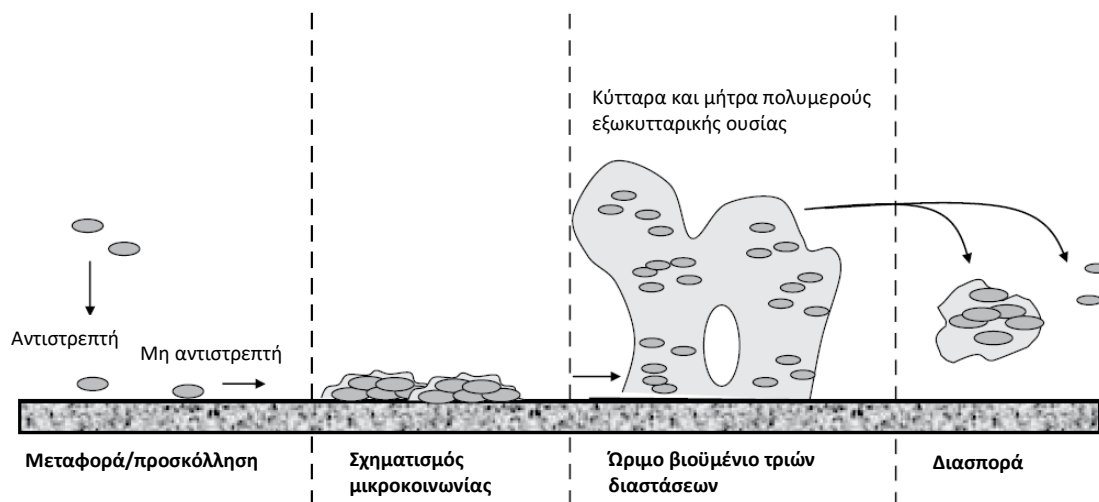
Τα βακτήρια καταφέρνουν να προσαρμόζονται και να επιβιώνουν σε διαφορετικά περιβάλλοντα, λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν σύνθετες κοινότητες προσκολλημένων κυττάρων σε διάφορες επιφάνειες που ονομάζονται βιοϋμένια (Costerton et al., 1995). Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν βιοϋμένια αν βρεθούν στις κατάλληλες συνθήκες. Με απλά λόγια τα βιοϋμένια είναι μία μήτρα προσκολλημένων κυττάρων μεταξύ τους ή σε μία επιφάνεια, τα οποία δημιουργούν ένα δυναμικό περιβάλλον για την καλύτερη δυνατή εκμετάλλευση από τον μικροοργανισμό όλων των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών και την επιβίωση του.

Σχηματισμός βιοϋμενίων παρατηρείται σε όλα τα φυσικά περιβάλλοντα και σχεδόν σε οποιαδήποτε επιφάνεια με αρκετά υψηλό επίπεδο υγρασίας που υποστηρίζει την ανάπτυξη τους (Bryers, 2000; Whitehead & Verran, 2015). Τα τελευταία 15 – 20 χρόνια η ερευνητική κοινότητα έχει συνειδητοποιήσει ότι ο σχηματισμός βιοϋμενίων στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων από έναν ή περισσότερους μικροοργανισμούς αποτελεί σημαντική πηγή επιμόλυνσης των προϊόντων από παθογόνα όπως είναι το *L. monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Cronobacter sakasaki*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, και το *Staphylococcus aureus* (Chmielewski & Frank, 2003; Brooks & Flint, 2008; Shi & Zhu, 2009; Wirtanen et al., 2014). Έτσι λοιπόν, η οργάνωση των μικροοργανισμών σε βιοϋμενία, τους προσδίδει μεγαλύτερη αντοχή σε διάφορες περιβαλλοντικές πιέσεις, σε καταπονήσεις που εμφανίζονται κατά την επεξεργασία των τροφίμων αλλά και κατά τη διάρκεια καθαρισμού και εξυγίανσης του εξοπλισμού και των χώρων επεξεργασίας (Wirtanen, 1995; Vogeleer et al., 2014). Η ικανότητα του *L. monocytogenes* να παραμείνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα στον εξοπλισμό και το περιβάλλον των βιομηχανιών τροφίμων, ιδιαίτερα κάτω από αντίξοες συνθήκες, μπορεί να σχετίζεται με το σχηματισμό βιοϋμενίων, απασχολώντας έντονα την επιστημονική κοινότητα.

### **1.5.2. Σχηματισμός βιοϋμενίων**

Υπάρχουν πέντε βασικά στάδια που σχετίζονται με τον σχηματισμό των βιοϋμενίων σε στερεές επιφάνειες, όπως έχουν περιγραφεί από τον Lasa, (2006) και είναι: 1) προσκόλληση των βακτηριακών πλαγκτονικών κυττάρων σε μια στερεή επιφάνεια μέσω των δυνάμεων van der Waals, των ηλεκτροστατικών δυνάμεων ή λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, 2) εμφάνιση κυτταρικού πολλαπλασιασμού και παραγωγής πολυμερούς εξωκυτταρικής ουσίας (extracellular polymeric substance –

EPS), 3) σχηματισμός μικροκοινωνιών σε πιο σύνθετες δομές, 4) σχηματισμός ώριμου βιοϋμενίου σε τρεις διαστάσεις (3D), το οποίο περιέχει κανάλια διανομής θρεπτικών και διαφόρων ουσιών και τέλος, 5) επέρχεται η διασπορά των κυττάρων και η επαναποίκιση τους σε νέες επιφάνειες.



**Σχήμα 1.2.** Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων για το σχηματισμού βιοϋμενίου του *L. monocytogenes* σε στερεή επιφάνεια (McLandsborough et al., 2006).

Το πρώτο στάδιο για τον σχηματισμό των βιοϋμενίων είναι η μεταφορά και η προσκόλληση του παθογόνου σε μια στέρεα επιφάνεια. Το *L. monocytogenes* μπορεί να προσκολληθεί σ' ένα εύρος επιφανειών που έρχονται καθημερινά σε επαφή με τα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των επιφανειών από πολυστυρένιο (polystyrene), πολυπροπυλένιο (polypropylene), γυαλί, ανοξείδωτο χάλυβα (Papaioannou et al., 2018), χαλαζία, μάρμαρο και γρανίτη (Silva et al. 2008). Ο παθογόνος μεταφέρεται μέσω της κινητικότητας του ή παρασύρεται με τα νερά του περιβάλλοντος ή του χώρου επεξεργασίας. Το *L. monocytogenes* σχηματίζει βιοϋμένια των οποίων ο πληθυσμός δεν ξεπερνάει σε CFU/cm<sup>2</sup> τα 10<sup>4</sup> – 10<sup>7</sup> (Gram et al., 2007).

Μόλις τα βακτήρια πλησιάσουν στην κατάλληλη απόσταση από την επιφάνεια ξεκινάνε να ασκούνται ελκτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Αυτές οι

αλληλεπιδράσεις είναι γνωστές ως Van der Waals είναι πάντοτε ελκτικές και λαμβάνουν χώρα σε αποστάσεις  $> 50$  nm, ενώ για αποστάσεις  $2 - 10$  nm ασκούνται ηλεκτροστατικές δυνάμεις (ελκτικές και απωστικές) και για αποστάσεις τόσο μικρές όσο τα  $0.5 - 2.0$  nm, παρατηρούνται υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Handley et al., 1991). Το τελικό μέγεθος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που ασκούνται εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον, όπως είναι το pH, η ιοντική ισχύς κ.ά. (Jenkinson & Lappin-Scott, 2001). Όσον αφορά τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, στο νερό είναι ισχυρότερες από τις ελκτικές δυνάμεις Van der Waals και αναφέρεται ότι μπορεί να είναι υπεύθυνες για την υπέρβαση των απωστικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, μεταξύ της κυτταρικής επιφάνειας και του στερεού υποστρώματος (Handley et al., 1991).

Μετά την αρχική προσκόλληση στην επιφάνεια, τα βακτήρια αρχίζουν να προσκολλώνται το ένα με το άλλο συνθέτοντας τις εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS) που διευκολύνουν τη μη αντιστρεπτή προσκόλληση τους στην επιφάνεια και συμβάλλουν στη διατήρηση της μικροκοινωνίας και τη δομή του βιοϋμενίου (Poulsen, 1999; McLandsborough et al., 2006). Το εξωπολυσακχαριτικό στρώμα (EPS) έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο, ενισχύοντας τη δέσμευση θρεπτικών ουσιών και στην ανθεκτικότητα των κυττάρων στις διάφορες καταπονήσεις και τους αντιμικροβιακούς παράγοντες (Shi & Zhu, 2009). Κατά το στάδιο που έχουν δημιουργηθεί τα ώριμα βιοϋμενία παρατηρείται μια καλά δομημένη μήτρα με ένα δίκτυο κατακόρυφων και οριζόντιων διαύλων που επιτρέπουν τη ροή υγρών που εξασφαλίζουν την παροχή θρεπτικών συστατικών καθώς και τη απομάκρυνση των αποβλήτων που παράγονται ως μέρος των φυσικών διεργασιών των κυττάρων (Nwodo et al., 2012; Flemming et al., 2016). Η σύνθεση και η δομή της μήτρας μπορεί να ποικίλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με τους μικροοργανισμούς,

τη φυσιολογική τους κατάσταση, τις διαθέσιμες θρεπτικές ουσίες και τις φυσικές συνθήκες που επικρατούν (Da Silva & De Martinis, 2013; Bonsaglia et al., 2014).

### 1.5.3. Έλεγχος και πρόληψη των βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*

Τα τελευταία χρόνια έχουν υιοθετηθεί πολλές στρατηγικές για τον έλεγχο και την πρόληψη από τον σχηματισμό βιοϋμενίων στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων αλλά και τις επιφάνειες που έρχονται σ' επαφή με τα τρόφιμα. Σύμφωνα με τους Francolini & Donelli (2010), οι κύριες στρατηγικές είναι (α) η αναστολή και παρεμπόδιση της αρχικής προσκόλλησης και αποικισμού των κυττάρων στις επιφάνειες, (β) η παρέμβαση στα μοριακά σήματα που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των βιοϋμενίων και (γ) η αποσύνθεση του εξωπολυσακχαριτικού στρώματος (EPS).

Ο έλεγχος των βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων γίνεται κυρίως μέσω καθαρισμού και απολύμανσης του εξοπλισμού με διαλύματα των ουσιών όπως είναι το οξικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, το υποχλωριώδες νάτριο, το τεταρτοταγές αμμώνιο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Για την επίτευξη των βέλτιστων αποτελεσμάτων είναι σημαντικό να καθορίζονται οι βέλτιστες συνθήκες που αφορούν τον χρόνο έκθεσης, τη θερμοκρασία και τις κατάλληλες συγκεντρώσεις της ουσίας, συνδυάζοντας έτσι τη χημική και μηχανική απομάκρυνση των κυττάρων (Sofos, 2009; Yang et al., 2009). Οι συμβατικές μέθοδοι καθαρισμού και απολύμανσης είναι αποτελεσματικές έναντι των νεοεισερχόμενων κυττάρων πριν αυτά φτάσουν στη μη αντιστρέψιμη κατάσταση τους αφότου βρεθούν στις επιφάνειες και αυτό συμβαίνει λόγω των ιδιοτήτων του εξωπολυσακχαριτικού στρώματος (EPS) που τα περικλείει και τα προστατεύει (Czaczuk & Myszka, 2007). Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα προσκολλημένα κύτταρα των βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* είναι ανθεκτικότερα (Aarnisalo et al., 2000; Chavant et al., 2004; Pan et al., 2006) συγκριτικά με τα πλαγκτονικά στα διάφορα καθαριστικά και απολυμαντικά που

χρησιμοποιούνται (Norwood & Gilmour, 2000; Simões et al., 2010). Για τον λόγο αυτό έχουν προταθεί διάφορες εναλλακτικές βιολογικές λύσεις όπως, η χρήση απορρυπαντικών με ένζυμα, η χρήση βακτηριοφάγων για τη λύση των κυττάρων και ακόμη οι αλληλεπιδράσεις του παθογόνου με άλλους ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς και τους μεταβολίτες τους με βακτηριοστατική ή ακόμη και βακτηριοκτόνο δράση (Simões et al., 2010; Soni et al., 2010).

### **1.6. Βιομηχανία κάπνισης αλιευτικών προϊόντων - Υφιστάμενη κατάσταση**

Η υδατοκαλλιέργεια και κυρίως η ιχθυοκαλλιέργεια αποτελούν έναν από τους πιο σημαντικούς κλάδους του πρωτογενούς τομέα ζωικής παραγωγής που έχει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της συμβολής της στην οικονομική ανάπτυξη και την κοινωνική συνοχή της Ελλάδας. Η Ισπανία, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Γαλλία, η Ιταλία και η Ελλάδα είναι οι πέντε μεγαλύτερες χώρες παραγωγοί στην υδατοκαλλιέργεια (TOP-5). Η συνολική ελληνική παραγωγή ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας σε θαλάσσια, εσωτερικά ύδατα και λιμνοθάλασσες, ανήλθε συνολικά σε 115.555 τόνους αξίας 621,41 εκ. ευρώ για το έτος 2015 (ΥΠΑΑΤ, 2014). Η υδατοκαλλιέργεια των εσωτερικών υδάτων κατέχει μια ιδιαίτερη θέση καθώς αποτελεί μια παραδοσιακή μορφή πρωτογενούς παραγωγής και πηγή κύριας ή συμπληρωματικής απασχόλησης και εισοδήματος για τους κατοίκους ορεινών και απομακρυσμένων ηπειρωτικών περιοχών. Σήμερα δραστηριοποιούνται 78 μονάδες εντατικής εκτροφής ιχθύων, με κυριότερο είδος την ιριδίζουσα πέστροφα, ενώ σε μικρότερη κλίμακα εκτρέφονται ο κυπρίνος και το ευρωπαϊκό χέλι (Bobori & Economidis, 2006).

Η πέστροφα και συγκεκριμένα η Ιριδίζουσα πέστροφα του είδους *Oncorhynchus mykiss*, αποτελεί το κυριότερο καλλιεργήσιμο είδος γλυκών υδάτων στην Ελλάδα η παραγωγή της οποίας για το έτος 2015 ήταν 1.800 τόνους αξίας 5.67 εκ. ευρώ



(ΥΠΑΑΤ, 2014). Γενικότερα, οι επίσημες εκτιμήσεις για τη συνολική παραγωγή πέστροφας για το ίδιο έτος, από χερσαίες εγκαταστάσεις ποικίλουν και κυμαίνονται από 1.800 τόνους έως και 2.500 σύμφωνα με την παγκόσμια Τράπεζα Αγροτικής Ανάπτυξης και το Υπουργείο Γεωργίας της Ελλάδας αντίστοιχα. Οι περισσότερες εκμεταλλεύσεις πέστροφας στη χώρα μας είναι πολύ μικρές, και μερικές λειτουργούν μόνο περιοδικά. Εξάιρεση αποτελεί ένας συνεταιρισμός στα Ιωάννινα, στην οποία ανήκουν 16 χερσαίες εγκαταστάσεις με συνολική ετήσια παραγωγή περίπου στους 300 τόνους ετησίως.

Τα ψάρια από τις υδατοκαλλιέργειες διατίθενται κυρίως στην ελληνική αγορά ως νωπά ψάρια "μεσαίου μεγέθους" των 300-350 g. Τα ψάρια είναι διαθέσιμα στην Ευρωπαϊκή αγορά κατά τη διάρκεια του έτους και πωλούνται ολόκληρα ή σε φιλέτο, νωπά ή καπνιστά. Ορισμένοι παραγωγοί έχουν καθετοποιήσει την αγορά, προχωρώντας στην κάπνιση των ψαριών σε ειδικά διαμορφωμένους χώρους. Όταν εκτρέφονται για μεγαλύτερο διάστημα και φτάνουν σε βάρος το 1.5 κιλό, οι ιριδίζουσες πέστροφες πωλούνται, όπως και ο σολομός, νωπές ή καπνιστές (φιλεταρισμένες). Τα ψάρια υποβάλλονται σε ψυχρή κάπνιση αλλά και σε θερμή κάπνιση, ιδίως στην περίπτωση της πέστροφας του γλυκού νερού.

Ωστόσο, λόγω των συνεχώς αυξανόμενων απαιτήσεων των καταναλωτών στην Ευρώπη έχει παρατηρηθεί η ανάγκη για αυξημένη προσφορά εγχώριων ήπια επεξεργασμένων, έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων (π.χ. καπνιστά φιλέτα πέστροφας). Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization – FAO, 2016; 2018) η τάση αυτή θα ενταθεί και προκειμένου η ελληνική βιομηχανία καπνιστής πέστροφας να ακολουθήσει την αγορά, οι υφιστάμενες εγκαταστάσεις επεξεργασίας θα πρέπει να εκσυγχρονιστούν.

Ο εκσυγχρονισμός προϋποθέτει, την απλοποίηση της εργασίας και κυρίως τη βελτιστοποίηση των συνθηκών υγιεινής κατά την παραγωγική διαδικασία.

### **1.7. Ήπια θερμικώς επεξεργασμένα αλιευτικά προϊόντα**

Τα αλιευτικά προϊόντα μπορούν να διαχωριστούν σε έξι βασικές κατηγορίες ανάλογα με τη θερμική επεξεργασία που έχουν υποστεί αλλά και με τις υπόλοιπες τεχνικές επεξεργασίας τους (Πίν. 1.1). Τα προϊόντα αυτών των κατηγοριών μπορεί να καταναλώνονται ωμά, να είναι ελαφρώς επεξεργασμένα (χωρίς να μαγειρευτούν), ήπια θερμικώς επεξεργασμένα, καπνιστά, μαριναρισμένα, ωμά, παστά και παστεριωμένα (Juneja et al., 2002).

Σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση των Huss et al. (2000), οι εξής κατηγορίες αλιευτικών προϊόντων κατατάσσονται στα τρόφιμα υψηλού ρίσκου: ιχθυηρά έτοιμα προς κατανάλωση (χωρίς να μαγειρευτούν), ήπια θερμικώς επεξεργασμένα ιχθυηρά και οστρακοειδή και ελαφρώς επεξεργασμένα αλιευτικά προϊόντα (με NaCl < 6.0 % w/w ή pH > 5.0) στα οποία περιλαμβάνονται διάφορα παστά, μαριναρισμένα και καπνιστά. Η καπνιστή πέστροφα ανήκει στην πρώτη κατηγορία η οποία θα αποτελέσει το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Αυτά τα προϊόντα χαρακτηρίζονται ως προϊόντα έτοιμα προς κατανάλωση (RTE) και καταναλώνονται χωρίς περαιτέρω μαγείρεμα (Gram & Huss, 1996).

**Πίνακας 1.1.** Κατηγορίες αλιευτικών προϊόντων και σχετικά χαρακτηριστικά (αναμορφώθηκε από Juneja et al., 2002).

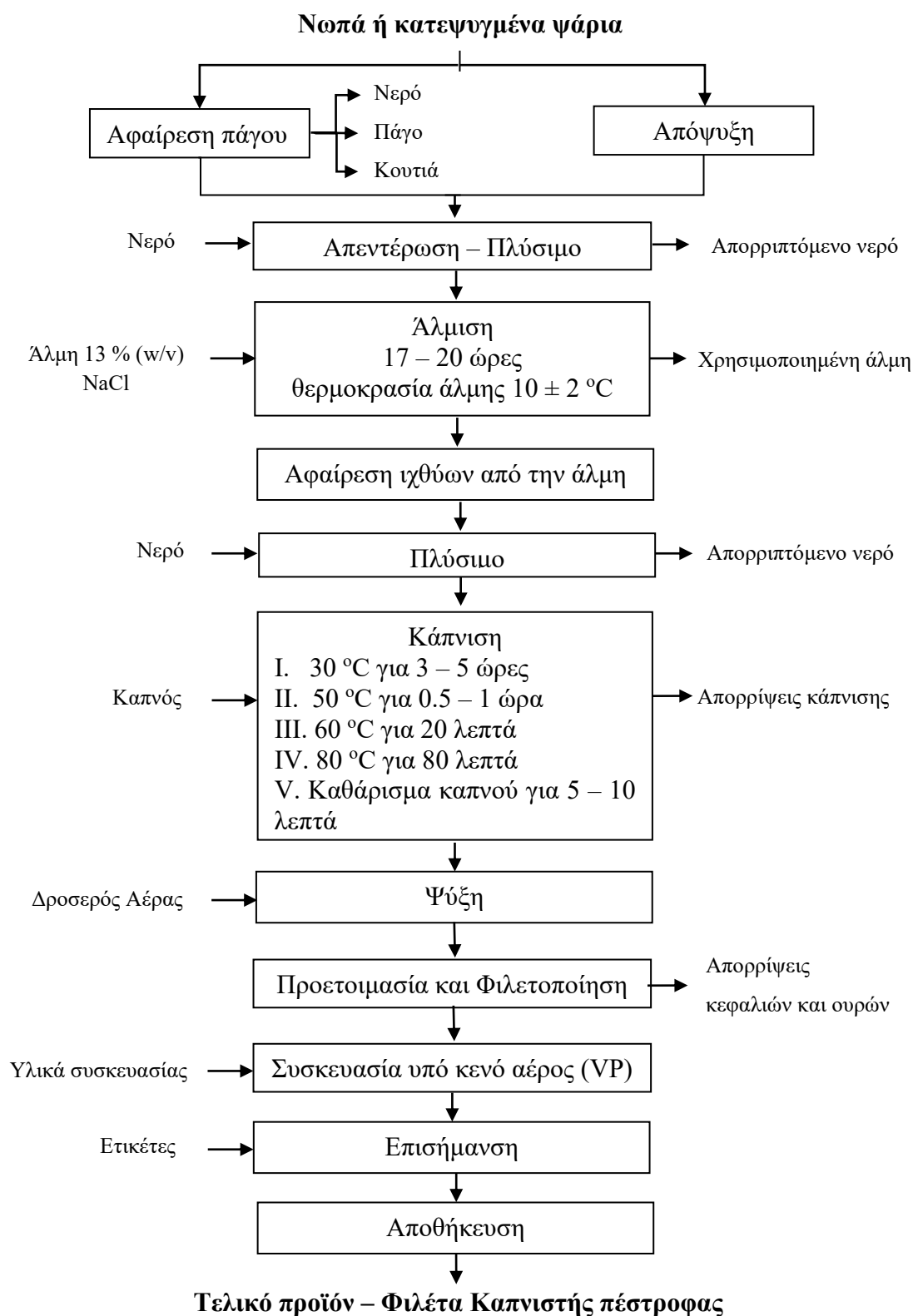
	<b>Χαρακτηριστικά</b>	<b>Πιθανές πηγές επιμόλυνσης από το <i>L. monocytogenes</i></b>
<b>Ελαφρώς επεξεργασμένα – Lightly Preserved</b>		
Καπνιστά ιχθυηρά (ψυχρής κάπνισης)	NaCl < 6.0 %	Πρώτη ύλη
Ωριμασμένα	w/w στην υγρή	Μετά την επεξεργασία του τελικού προϊόντος
Αλίπαστα	φάση pH > 5.0	
Μαριναρισμένα		
Gravlax		
<b>Ήπια θερμικώς επεξεργασμένα – Mildly Heat Preserved</b>		
Καπνιστά ιχθυηρά (θερμής κάπνισης)	Θερμικώς επεξεργασμένα	Μετά την επεξεργασία του τελικού προϊόντος
Προ μαγειρεμένα καρκινοειδή – Pre-cooked crustaceans	(μαγειρεμένα)	Παραγωγική διαδικασία
<b>Ωμά έτοιμα προς κατανάλωση ιχθυηρά – Raw RTE Seafood</b>		
Δίθυρα μαλάκια	Καταναλώνονται ωμά	Μετά την επεξεργασία του τελικού προϊόντος
Ωμά ψάρια		Παραγωγική διαδικασία
<b>Θερμικώς επεξεργασμένα – Heat Processed</b>		
Αποστειρωμένα, συσκευασμένα σε κονσέρβες	Εμπορικά αποστειρωμένα (κονσερβοποίηση)	Κατά τη μεταχείριση από τον καταναλωτή και την προετοιμασία
<b>Φρέσκα Αλιεύματα – Fresh fish</b>		
	Μαγειρεύονται από τον καταναλωτή	Κατά τη μεταχείριση από τον καταναλωτή και την προετοιμασία
<b>Παστά ιχθυηρά – Dried fish</b>		
Παστά, αλίπαστα, καπνιστά παστά ιχθυηρά	> 6.0 % NaCl (w/w) στην υδάτινη φάση	Μη πιθανή επιμόλυνση

### **1.8. Παραγωγική διαδικασία φιλέτων καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης)**

Ο κλάδος της μεταποίησης έχει σημαντική συνεισφορά στην αλιευτική βιομηχανία διότι μετατρέπει ένα υψηλής διατροφικής αξίας, αλλά ιδιαίτερα ευπαθές προϊόν, σε μορφές που μπορούν να καταναλωθούν σε μεταγενέστερο χρόνο λόγω της παράτασης της διάρκειας ζωής του και το τελικό προϊόν αποκτά έτσι προστιθέμενη αξία.

Αρχικά, φρέσκα ή κατεψυγμένα ψάρια Ιριδίζουσας πέστροφας (*O. mykiss*) άριστης ποιότητας αποτελούν την πρώτη ύλη. Στη συνέχεια τα ψάρια ολόκληρα, ξεπλένονται και γίνεται απεντέρωση με μηχανικό τρόπο, ταυτόχρονα με το αρχικό πλύσιμο, ώστε να απομακρυνθούν από την επιφάνεια τους τυχόν ξένες ύλες, τα βράγχια και η γλίτσα. Στην έξοδο του μηχανήματος απεντέρωσης γίνεται έλεγχος της απεντέρωσης και προαιρετικός έλεγχος απουσίας παρασίτων (τα παράσιτα καταστρέφονται στο στάδιο της θερμής κάπνισης). Οι πέστροφες ξεπλένονται εκ νέου πριν τη διαδικασία της αλάτισης. Η προτεινόμενη άλμιση γίνεται σε αλατόνερο περίπου 13 % (w/v) NaCl και pH μικρότερο από 5.8. Η θερμοκρασία της άλμης καθ' όλη τη διάρκεια της άλμισης, διατηρείται στους  $10 \pm 2$  °C για 17 ώρες (μικρά ψάρια 350 γρ) και 20 ώρες (μεγάλα ψάρια 450 γρ). Ο χρόνος άλμισης και οι βαθμοί του αλατόνερου μπορεί να ποικίλουν. Πριν την κάπνιση ξεπλένονται με νερό για την απομάκρυνση της περίσσειας άλμης. Αμέσως μετά, τα ψάρια αγκιστρώνονται σε γάντζους μέσα σε ειδικά διαμορφωμένο θάλαμο με τέτοιο τρόπο ώστε πάντοτε το μπροστινό σημείο (κεφάλι) να έχει κατεύθυνση προς τη ροή του καπνού. Τα φιλέτα τοποθετούνται πάνω σε μεταλλικά πλέγματα. Η κάπνιση γίνεται σε 5 στάδια: I) Απομάκρυνση της υγρασίας για 3 ώρες (μικρά ψάρια με λιγότερο λίπος) και 5 ώρες (μεγάλα ψάρια με περισσότερο λίπος), η θερμοκρασία του φούρνου διατηρείται στους 30 °C, II) Η θερμοκρασία του χώρου ανέρχεται μέχρι στους 50 °C, έπειτα από 0.5 – 1 ώρα, III) Πρωταρχική θερμική επεξεργασία των ιχθύων στους 60 °C για 20 λεπτά, IV)

Θερμική επεξεργασία στους 80 °C για 80 λεπτά και τέλος V) Το καθάρισμα του καπνού από το φούρνο, που διαρκεί 5 – 10 λεπτά, με τη θερμοκρασία του προϊόντος να παραμένει στους  $62 \pm 1$  °C (Σχ. 1.3). Μετά την κάπνιση αφήνονται να κρυώσουν σε ειδικό κλιματιζόμενο χώρο. Όταν το προϊόν φτάσει στην επιθυμητή θερμοκρασία (8 °C, σε λιγότερο από 4 ώρες), γίνεται απομάκρυνση του κεφαλιού και της ουράς και χάραξη του ραχιαίου τμήματος της πέστροφας. Ακολουθεί η φιλετοποίηση του προϊόντος. Στο χώρο φιλετοποίησης η θερμοκρασία διατηρείται κάτω από τους 16 °C. Τα δείγματα που συσκευάζονται σε συσκευασίες υπό κενό αέρος δεν πρέπει να ψύχονται καθώς μπορεί να αλλοιωθεί η εμφάνιση τους και τοποθετούνται στη συσκευασία και αφήνονται μόνο σε θερμοκρασία δωματίου να ψυχθούν και στη συνέχεια σφραγίζονται. Τέλος, τοποθετούνται οι ετικέτες τους και αποθηκεύονται στην κατάλληλη θερμοκρασία ψύξης (0 – 2 °C) μέχρι και την τελική διανομή τους.



**Σχήμα 1.3.** Διάγραμμα ροής της παραγωγικής διαδικασίας καπνιστής πέστροφας θερμής κάπνισης (προσωπική επαφή).

## 1.9. Τεχνικές συντήρησης

### 1.9.1. Αλάτιση

Η διαδικασία της αλάτισης των φιλέτων της καπνιστής πέστροφας προηγείται της κάπνισης η οποία περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια. Το αλάτισμα γίνεται με την μέθοδο του υγρού αλατισμού με εμβάπτιση για ορισμένο χρόνο των ιχθύων ή των φιλέτων στην άλμη (αλατούχο διάλυμα). Ο υγρός αλατισμός μπορεί να γίνει με διαλύματα άλατος διαφορετικών πυκνοτήτων με διαφορετικούς χρόνους εμβάπτισης και προσδίδει γεύση στο προϊόν, ενώ έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή πιο εκλεκτών προϊόντων σε σύγκριση με το ξηρό αλάτισμα (Andres et al., 2004; Aursand et al., 2008). Η μονάδα μέτρησης του αλατούχου διαλύματος είναι η κλίμακα Baumé, η οποία είναι ένα μέτρο υπολογισμού της ειδικής βαρύτητας ενός διαλύματος.

**Πίνακας 1.2.** Βαθμοί αλατούχου διαλύματος – άλμης (αναμορφώθηκε από Bannerman, 2001).

<b>Βαθμοί Baumé</b>	<b>Καθαρό βάρος NaCl, g/L άλμης</b>
10	26.4
20	52.8
30	79.2
40	105.6
50	132.0
60	158.4
70	184.8
80	211.2
90	237.6
100	264.0

Οι προτεινόμενοι βαθμοί για την άλμιση των καπνιστών φιλέτων πέστροφας (θερμής κάπνισης) είναι οι 80 °Bé καθώς έχει βρεθεί ότι αποτελεί την καλύτερη επιλογή για ομοιόμορφη απορρόφηση του άλατος από το ψάρι σε σχέση με τον χρόνο (Bannerman, 2001). Επίσης, ο χρόνος εμβάπτισης των φιλέτων στην άλμη ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος, το πάχος και την περιεκτικότητά τους σε λίπος. Η

συγκέντρωση του άλατος στην υδάτινη φάση, των φιλέτων που προορίζονται για θερμή κάπνιση είναι μεγάλης σημασίας για τη δημόσια υγεία. Η συγκέντρωση θα πρέπει να είναι αρκετά υψηλή, ώστε να αναστέλλεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και ιδιαίτερα του *Clostridium botulinum*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την πρόκληση αλλαντίασης τύπου E (type E botulism; Korkeala et al., 1998). Η ελάχιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση άλατος στην υδάτινη φάση στα 100 g φιλέτου σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA (2001) είναι 3.50 %.

### **1.9.2. Κάπνιση**

Η κάπνιση των ευπαθών προϊόντων όπως είναι τα κρεατοπαρασκευάσματα αλλά και τα ψάρια και τα αλιευτικά προϊόντα χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες ως μέθοδος συντήρησης (Hattula et al., 2001). Σε πολλές περιπτώσεις η κάπνιση πραγματοποιείται κυρίως λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών, όπως χρώμα, γεύση και άρωμα που μπορεί να προσδώσει σ' ένα προϊόν και όχι ως διαδικασία συντήρησής του (Suñen et al., 2003; Guillen et al., 2006).

Υπάρχουν δύο μέθοδοι κάπνισης των αλιευτικών προϊόντων και διαχωρίζονται ανάλογα με το θερμοκρασιακό τους εύρος, στη ψυχρή και θερμή κάπνιση. Το τελικό προϊόν μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων κάπνισης διαφέρει σημαντικά. Η ψυχρή κάπνιση πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 33 °C για να αποφευχθεί το ψήσιμο (θέρμανση) του τροφίμου και απαιτείται μαγείρεμα του τελικού προϊόντος πριν την κατανάλωση του. Αντιθέτως, η θερμή κάπνιση πραγματοποιείται σε υψηλότερες θερμοκρασίες από 70 – 80 °C, όπου το προϊόν μαγειρεύεται λόγω της υψηλής θερμοκρασίας και μπορεί να καταναλωθεί χωρίς περαιτέρω μαγείρεμα από τον καταναλωτή. Η κάπνιση θα πρέπει να συνεχιστεί μέχρι η θερμοκρασία στο γεωμετρικό κέντρο του τροφίμου να φτάσει τους 70 °C, ώστε να διασφαλιστεί η μετουσίωση των πρωτεϊνών αλλά και η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη



θανάτωση των μικροοργανισμών στη σάρκα του τροφίμου (Bykowski & Dutkiewicz, 1996).

Με τον παραδοσιακό τρόπο κάπνισης είναι σχεδόν αδύνατο κάθε φορά να επιτευχθούν τα ίδια αποτελέσματα στο τελικό προϊόν και η επαναληψιμότητα των θεμιτών αποτελεσμάτων έγκειται κυρίως στην εμπειρία του εκάστοτε χειριστή του θαλάμου κάπνισης (Ramakrishnan & Moeller, 2002; Bykowski & Dutkiewicz, 1996).

Τα τελευταία χρόνια οι βιομηχανίες καπνιστών τροφίμων έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούν υγρά συμπυκνώματα καπνού (Lingbeck et al., 2014). Παράγονται μέσω της ελεγχόμενης διαδικασίας πυρόλυσης διαφόρων ειδών ξύλων ανάλογα με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του συμπυκνώματος κάθε φορά (IOFI, 2012). Η χρήση συμπυκνωμάτων καπνού επιτρέπει στον χειριστή να ελέγχει την τελική συγκέντρωση που προσθέτει και να επιτυγχάνει κάθε φορά τα ίδια χαρακτηριστικά στο τελικό προϊόν (Suñen et al., 2001). Θεωρούνται επίσης, φιλικά προς το περιβάλλον σε σχέση με την παραδοσιακή κάπνιση καθώς δεν απελευθερώνουν ρύπους (Andrews, 2012).

Ο καπνός που παράγεται κατά την παραδοσιακή κάπνιση, είτε τα συμπυκνώματα καπνού είναι γνωστό ότι έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι των Gram αρνητικών και θετικών αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών (Sofos et al., 1988; Ramakrishnan & Moeller, 2002; Milly et al., 2005; Kim et al. 2012; Van Loo et al. 2012). Οι ουσίες που προσδίδουν αυτές τις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες στον καπνό είναι κυρίως οι φαινολικές ενώσεις, τα καρβονύλια και τα διάφορα οργανικά οξέα που παράγονται κατά την καύση διαφορετικών ειδών ξύλου (Boyle et al., 1988; Sofos et al., 1988).

### **1.9.3. Συσσκευασία υπό κενό αέρος (Vacuum Packaging – VP)**

Κατά τη συσκευασία των καπνιστών αλιευτικών προϊόντων χρησιμοποιούνται διαφορετικοί τύποι συσκευασίας, όπως είναι η συσκευασία τροποποιημένης

ατμόσφαιρας (Modified Atmosphere Packaging – MAP) και υπό κενό αέρος (Vacuum Packaging – VP) για την παράταση της διάρκειας ζωής και για τη διατήρηση της μικροβιολογικής τους ποιότητας (Cakli et al., 2006; Lindström, 2003). Επιπλέον, η συσκευασία προστατεύει το τρόφιμο από τυχόν επιμολύνσεις από το περιβάλλον, από την οξείδωση του λίπους, την αλλαγή χρώματος και άλλες φθορές. Τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας, θερμής κάπνισης αποθηκεύονται σε συσκευασία υπό κενό που περιλαμβάνει την απομάκρυνση του αέρα από το εσωτερικό πριν από το ερμητικό κλείσιμο. Τα φιλέτα μετά την κάπνιση αφήνονται να ηρεμήσουν και να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου μαζί με τη συσκευασία τους, χωρίς αυτή να έχει σφραγιστεί. Το στάδιο αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία για το τελικό προϊόν καθώς εάν τα φιλέτα ψυχθούν και στη συνέχεια συσκευασθούν η τελική εμφάνιση του προϊόντος θα δίνει την εντύπωση ότι έχει καταψυχθεί και αποψυχθεί (Bannerman, 2001). Τέλος, όταν η θερμοκρασία φτάσει στο κατάλληλο επίπεδο, η συσκευασία σφραγίζεται ερμητικά και τα προϊόντα αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες ψύξης από 0.0 – 5.0 °C.

#### **1.9.4. Θερμοκρασία αποθήκευσης**

Η θερμοκρασία αποθήκευσης αποτελεί τη σημαντικότερη παράμετρο για τη συντήρηση των ήπια επεξεργασμένων αλιευτικών προϊόντων, όπως είναι τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας και επηρεάζει άμεσα τον ρυθμό ανάπτυξης αλλά και τους μικροοργανισμούς που προκαλούν αλλοίωση. Σε αντίθεση με τη θερμική επεξεργασία, η χαμηλή θερμοκρασία δεν καταστρέφει τους μικροοργανισμούς ή τα ένζυμα, αλλά μειώνει τη δραστηριότητά τους (Berk, 2018) με αποτέλεσμα την παράταση της διάρκειας ζωής των τροφίμων.

Τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας, θερμής κάπνισης πρέπει να κρατούνται, να διανέμονται και να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία από 0.0 – 5.0 °C. Στο θερμοκρασιακό εύρος από 0.0 – 10.0 °C παρατηρούνται τα μέγιστα αποτελέσματα

στην αναστολή των μικροοργανισμών συγκριτικά με τις πολύ μικρές παρατηρούμενες αλλαγές στο τρόφιμο (Huss, 1988; Korkeala et al., 1989). Έτσι λοιπόν, σε θερμοκρασίες ψύξης μικρότερες των 7.0 °C, οι κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί είναι οι ψυχρότροφοι, στους οποίους ανήκουν και τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic acid bacteria – LAB) που απομονώνονται συχνά στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής των καπνιστών αλιευτικών προϊόντων και ευθύνονται για την αλλοίωσή τους (Cakli et al., 2006; Doyle et al., 1997). Η διάρκεια ζωής των φιλέτων σε συσκευασία υπό κενό αέρος (VP) μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τις διακυμάνσεις στη θερμοκρασία αποθήκευσης.

#### **1.10. Σκοπός και στόχοι της Διδακτορικής Διατριβής**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματεύεται ένα πολύ κρίσιμο και ενδιαφέρον αντικείμενο αιχμής για τη μικροβιολογική ασφάλεια των τροφίμων που είναι η συμπεριφορά και επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών σε συνθήκες καταπόνησης. Συγκεκριμένα, αφορά τη μελέτη της επίδρασης των συνθηκών επεξεργασίας και συντήρησης στη συμπεριφορά του *L. monocytogenes* σε υψηλής προστιθέμενης αξίας αλιευτικά προϊόντα, όπως είναι τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας. Σκοπός είναι η παραγωγή κατάλληλης επιστημονικής γνώσης για τη Βιομηχανική Εφαρμογή της τεχνολογίας εμποδίων, με στόχο την ασφάλεια και επέκταση του χρόνου ζωής των Ελληνικών προϊόντων.

Για την επίτευξη του σκοπού της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε η συστηματική ολοκλήρωση των επιμέρους στόχων που είναι:

**1<sup>ος</sup>:** Η αποσαφήνιση της συμπεριφοράς και απόκρισης του *L. monocytogenes* στις διάφορες καταπονήσεις, όπως χαμηλή ενεργότητα νερού ( $a_w$ ) και θερμή κάπνιση που εφαρμόζονται κατά την επεξεργασία της καπνιστής πέστροφας. Συγκεκριμένα, για να διερευνηθεί η απόκριση (response) του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων

οροτύπων) στα διάφορα εμπόδια και καταπονήσεις (stresses) που εφαρμόζονται κατά την παραγωγική διαδικασία και τη συντήρηση της καπνιστής πέστροφας όπως: χαμηλή  $a_w$ , (αλάτιση), θέρμανση, επίδραση αντιμικροβιακών συστατικών του καπνού (θερμή κάπνιση) αλλά και ανταγωνισμού με άλλους μικροοργανισμούς, μελετήθηκαν τα εξής σενάρια:

α) απόκριση των προσαρμοσμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* σε ωσμωτική καταπόνηση λόγω αλάτισης στις διάφορες επακόλουθες καταπονήσεις όπως, το θερμικό σοκ και η αντιμικροβιακή δράση υγρών καπνών

β) μελέτη συμπεριφοράς και απόκρισης των κυττάρων του *L. monocytogenes*, προσομοιάζοντας την επιμόλυνση στα διάφορα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας.

i) επιμόλυνση με *L. monocytogenes* της αρχικής πρώτης ύλης και πριν το στάδιο της θερμικής επεξεργασίας (60 °C) και ii) μετά τη θερμή κάπνιση (πριν την τελική συσκευασία), μελετώντας τη συμπεριφορά πλαγκτονικών κυττάρων και κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα, ίδιου με αυτού που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων.

**2<sup>ος</sup>:** Αλληλεπίδραση του *L. monocytogenes* με τους πιθανούς ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση πρωτεωμικής ανάλυσης και ειδικότερα με Ιοντισμό με Εκρόφηση από Μήτρα μέσω Λείζερ – MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) με φασματομετρία μάζας – Mass Spectrometry (MS). Πραγματοποιήθηκε διερεύνηση του ανταγωνισμού των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που απομονώθηκαν, με το *L. monocytogenes* σε διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας και σε συσκευασία κενού αέρα, ενοφθαλμίζοντας σε πραγματικό προϊόν αλλά και στείρα υποστρώματα καπνιστής πέστροφας.

**3<sup>ος</sup>:** Αδρανοποίηση του *L. monocytogenes* στο τελικό προϊόν με τη χρήση νέων μεθόδων και συγκεκριμένα με τη χρήση της Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης – ΥΥΠ (High Pressure Processing – HHP) σε συνδυασμό με την εφαρμογή συμπυκνωμάτων υγρού καπνού αλλά και υπερκατάψυξης στους –80 °C, με σκοπό τη μείωση της εφαρμοζόμενης έντασης επεξεργασίας με ΥΥΠ.

Η πρωτοτυπία της παρούσας έρευνας έγκειται στο γεγονός ότι αποτελεί μια ολιστική προσέγγιση της ασφάλειας του συγκεκριμένου Ελληνικού προϊόντος, διότι αφορά τη μελέτη της αλληλουχίας των καταπονήσεων που εφαρμόζονται για το συγκεκριμένο προϊόν η οποία δεν έχει μελετηθεί. Ακόμη, η συμπεριφορά του *L. monocytogenes* σε σχέση με τον ανταγωνισμό από τους πιθανούς ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς του συγκεκριμένου προϊόντος επίσης δεν έχει μελετηθεί. Τέλος, υπάρχουν ελάχιστες μελέτες για τη συμπεριφορά του *L. monocytogenes* σε φιλέτα καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης) γενικότερα, σε αντίθεση με άλλα προϊόντα της Διεθνούς Αγοράς.

## Κεφάλαιο 2. Γενικά Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1. Μικροβιακά στελέχη, υλικά και συνθήκες ανάπτυξης

Πέντε διαφορετικά στελέχη του *L. monocytogenes* (Πίν. 2.1) χρησιμοποιήθηκαν σε μίγμα (cocktail), προσομοιάζοντας καλύτερα τις πραγματικές συνθήκες εύρεσης του παθογόνου στο πραγματικό περιβάλλον αλλά και στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων. Όλα τα στελέχη ήταν αποθηκευμένα στην υπερκατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , σε μικροφιαλίδια τύπου “bead vials” (Protect; Technical Service Consultants, Ltd., Heywood, Lancashire, United Kingdom). Για την ανανέωση τους γίνονταν μεταφορά ενός bead για κάθε στέλεχος χωριστά, σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν θρεπτικό μέσο αύξησης Tryptone Soy Broth (TSB; Lab M; International Diagnostics Group Plc, Bury, Lancashire, UK) εμπλουτισμένο με 0.6 % (w/v) yeast extract (YE; Lab M, International Diagnostics Group Plc, Bury, Lancashire, UK) και επωάζονταν για 24 ώρες στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ως προ-καλλιέργειες. Μετά την υπερκατάψυξη έγινε εκ νέου ανανέωση των στελεχών που θα χρησιμοποιούνταν ως κύριες καλλιέργειες για τη συνέχεια των πειραμάτων σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 10 mL, TSBy.e. και αφήνονταν άλλες 24 ώρες στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  για επώαση. Τα βακτηριακά στελέχη στη στατική φάση ανάπτυξης, συλλέγονταν με φυγοκέντρηση στα  $6770 \times g$  για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (Hettich, MIKRO 200 R, Benchtop Centrifuge), ξεπλένονταν εις διπλούν και επαναδιαλυτοποιούνταν σε αποστειρωμένο διάλυμα σαλίνης 0.85 % (w/v) NaCl. Κατόπιν, όλα τα στελέχη του *L. monocytogenes* συλλέγονταν σ’ ένα αποστειρωμένο falcon 50 mL (SARSTEDT AG & Co. KG, Germany) που περιείχε σαλίνη 0.85 % (w/v) NaCl για την προετοιμασία του τελικού μίγματος με τελικό πληθυσμό  $10^{7-8}$  CFU/mL. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε κατά την προετοιμασία των εμβολίων, ώστε να περιέχουν όλα τον ίδιο βακτηριακό πληθυσμό.

**Πίνακας 2.1.** Στελέχη του *L. monocytogenes* που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία του μίγματος.

Στέλεχος	Περιγραφή	Προέλευση
Scott A	Ορότυπος 4b, κλινικό στέλεχος	Από τη συλλογή του Εργαστηρίου Εμπορίας & Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος, Ελλάδα)
20060		Ευγενικά παραχωρημένο από τον Dr. Ν. Ανδρίτσο (Αναλυτικά εργαστήρια Α.Ε., Αθήνα, Ελλάδα)
20072	Ορότυπος 1/2a, 3a, απομονωμένα από Καπνιστή πέστροφα φιλέτο	
20078		
LQC15188	Ορότυπος 4b, απομονωμένο από πραγματικό προϊόν (Hadjilouka et al. 2014)	Ευγενικά παραχωρημένο από τον Καθ. Γ. Ι. Νυχά, από τη συλλογή του εργαστηρίου Ελέγχου Ποιότητας & Υγιεινής Τροφίμων (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα)

## 2.2. Απαρίθμηση Μικροβιακών Πληθυσμών

### 2.2.1. Απαρίθμηση Μικροβιακού Πληθυσμού

Για τις δειγματοληψίες, από τα φιλέτα λαμβάνονταν 10 γρ και κατόπιν μεταφέρονταν σε αποστειρωμένη σακούλα τύπου Stomacher (BagLight PolySilk, Interscience, Saint Nom, France) η οποία περιείχε 90 mL αποστειρωμένου ισοτονικού πεπτονούχου ύδατος (Maximum recovery diluent: MRD, 0.1 % w/v πεπτόνη και 0.85 % w/v NaCl). Η ομογενοποίηση για τη δημιουργία της πρώτης δεκαδικής αραιώσης των δειγμάτων πραγματοποιούνταν με τη βοήθεια ομογενοποιητή τύπου Stomacher (Bag Mixer, Interscience, London, UK) για 2 λεπτά.

Οι δεκαδικές αραιώσεις πραγματοποιούνταν με τη μεταφορά 1 mL δείγματος σε 9 mL αποστειρωμένου ισοτονικού πεπτονούχου ύδατος. Ακολουθούσε λήψη 0.1 mL

και επίστρωση σε τρυβλία Petri με το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, με τη μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης. Για την μέθοδο της ενσωμάτωσης λαμβάνονταν 1 mL δείγματος το οποίο τοποθετούνταν σε άδειο τρυβλίο και στη συνέχεια τοποθετούνταν περίπου 10 mL θρεπτικού υλικού σε υγρή μορφή το οποίο είχε αφηθεί σε υδατόλουτρο στους 50 °C, ομογενοποιούνταν με απαλές κυκλικές κινήσεις, αφήνονταν να κρυώσει για να στερεοποιηθεί και κατόπιν προσθέτονταν άλλη μία στρώση και αφήνονταν εκ νέου να κρυώσει και αφού είχε στερεοποιηθεί τοποθετούνταν για επώαση.

### **2.2.2. Απαρίθμηση τραυματισμένων κυττάρων**

Η απαρίθμηση του πληθυσμού των υγιών (μη τραυματισμένων) κυττάρων του *L. monocytogenes*, έγινε σε TSAy.e., (Tryptone Soy Agar (TSA; Lab M; International Diagnostics Group Plc, Bury, Lancashire, UK) εμπλουτισμένο με 0.6 % (w/v) yeast extract (YE; Lab M, International Diagnostics Group Plc, Bury, Lancashire, UK) ενώ η απαρίθμηση των τραυματισμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε στο επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα PALCAM άγαρ (LAB M, Lancashire, UK), καθώς και σε TSAy.e. εμπλουτισμένο με NaCl σε τελική συγκέντρωση 5.00 % (w/v) ως ένα άλλο επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα, όπως αναφέρουν και οι Dallmier & Martin (1990) οι οποίοι χρησιμοποίησαν TSA με 5.5 % (w/v) NaCl για τον ίδιο σκοπό. Όλα τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37 °C για 24 – 48 ώρες.

Για τον έλεγχο και τον υπολογισμό του τελικού ποσοστού των υποθανάτια τραυματισμένων κυττάρων μετά τις καταπονήσεις εφαρμόστηκε η παρακάτω εξίσωση (Busch & Donnelly, 1992; Dykes, 1999; Wang et al., 2017; Sibanda & Buys, 2017) η οποία βασίζεται στη διαφορά μεταξύ των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο μη επιλεκτικό (non-selective -  $N_{\text{non-selective}}$ ) και στο επιλεκτικό (selective media -  $N_{\text{selective}}$ ) θρεπτικό υπόστρωμα:



$$\% \text{Sublethal Injury} = \frac{N_{\text{non-selective}} - N_{\text{selective}}}{N_{\text{non-selective}}} \times 100 \quad (1)$$

### 2.3. Υλικά μικροβιολογικής ανάλυσης

Οι μικροβιολογικές παράμετροι που απαριθμήθηκαν ήταν:

α) Ολικός Μικροβιακός Πληθυσμός (Total Viable Counts – TVC) σε Tryptone Soy Agar (TSA) μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 48-72 ώρες,

β) Βακτήρια που παράγουν H<sub>2</sub>S σε Iron Agar (IA) το οποίο προετοιμάστηκε σύμφωνα με τους Gram et al. (1987) και περιείχε: peptone 20 g/L, meat extract 3.0 g, yeast extract 3.0 g/L, ferric citrate 3.0 g/L, sodium thiosulphate 0.3 g/L, NaCl 5 g, L-cysteine 0.6 g/L, agar 14 g/L. Το pH ρυθμίστηκε στο 7.4. Τα χημικά αντιδραστήρια προέρχονταν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Τα τρυβλία επωάζονταν στους 25 °C για 72 ώρες,

γ) Enterobacteriaceae σε Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) και καταμέτρηση των μωβ αποικιών με δακτύλιο, μετά από επώαση στους 37 °C για 24 ώρες,

δ) Οξυγαλακτικά βακτήρια σε de Mann, Rogosa, Sharpe Agar (MRS Agar), έπειτα από ρύθμιση του pH στις τιμές 5.4, 6.4 και 7.4, και καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25 °C για 72 ώρες,

ε) *Pseudomonas* spp. σε (Cetrimide-Fucidin-Cephaloridine Agar (CFC) και καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25 °C για 48 ώρες.

Η απαρίθμηση όλων των μικροοργανισμών της οικογένειας των Enterobacteriaceae και των οξυγαλακτικών βακτηρίων, έγινε με την τεχνική της ενσωμάτωσης, ενώ η τεχνική της επίστρωσης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό όλων των υπολοίπων μικροοργανισμών.

#### **2.4. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων αύξησης**

Οι κινητικές παράμετροι των βακτηριακών πληθυσμών που παρουσίαζαν γραμμική αύξηση, ακολουθούμενη από την στατική τους φάση, υπολογίστηκαν με το πρόσθετο του Excel, DFMMFit 3.5 (Institute of Food Research, Norwich, UK) που ακολουθεί το πρωτογενές πρότυπο Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994). Οι κινητικές παράμετροι που υπολογίστηκαν ήταν: η φάση προσαρμογής (lag time), ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) και ο τελικός μικροβιακός πληθυσμός ( $N_{max}$ ).

#### **2.5. Προετοιμασία συμπυκνωμάτων υγρού καπνού**

Όλα τα συμπυκνώματα υγρών καπνών μας τα παρείχε δωρεάν η εταιρία “Ruitenberg Ingredients b.v., Τουέλο, Ολλανδία”. Συνολικά έγινε δοκιμή εννέα (9) διαφορετικών υδατοδιαλυτών συμπυκνωμάτων υγρού καπνού, οι ονομασίες και ιδιότητες των οποίων αναφέρονται στον Πίνακα 2.2. Το συμπύκνωμα με την κωδική ονομασία L9, στην πραγματικότητα δεν είναι υγρός καπνός αλλά συγκαταλέγεται στα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται κατά τη θερμική επεξεργασία για να προσδίδουν χαρακτηριστικά, όπως άρωμα και χρώμα στο τελικό προϊόν. Για τη συνέχεια της διδακτορικής διατριβής θα αναφέρεται και αυτός ως υγρός καπνός για λόγους διευκόλυνσης. Η περιεκτικότητα τους σε φαινόλες ήταν χαμηλή και όμοια για τα περισσότερα συμπυκνώματα εκτός από το C3, το οποίο περιείχε περίπου 16.0 – 26.0 g/l. Αντίστοιχα η περιεκτικότητα σε καρβονύλια κατά αύξουσα σειρά για όλα τα συμπυκνώματα ήταν (H7 = K8) < A1 < E5 < D4 < B2 < C3 < G6 < L9. Ακόμη, σύμφωνα με τις προδιαγραφές τους, μπορεί να περιέχουν έως και 10 ppb (0.01 mg/kg) benzo[a]pyrene και 20 ppb (0.02 mg/kg) benzo[a]anthracene (BaP). Προέρχονται από μη γενετικώς τροποποιημένους οργανισμούς (non-GMO) και θεωρούνται γενικά ασφαλείς (Generally Regarded as Safe – GRAS) από τον

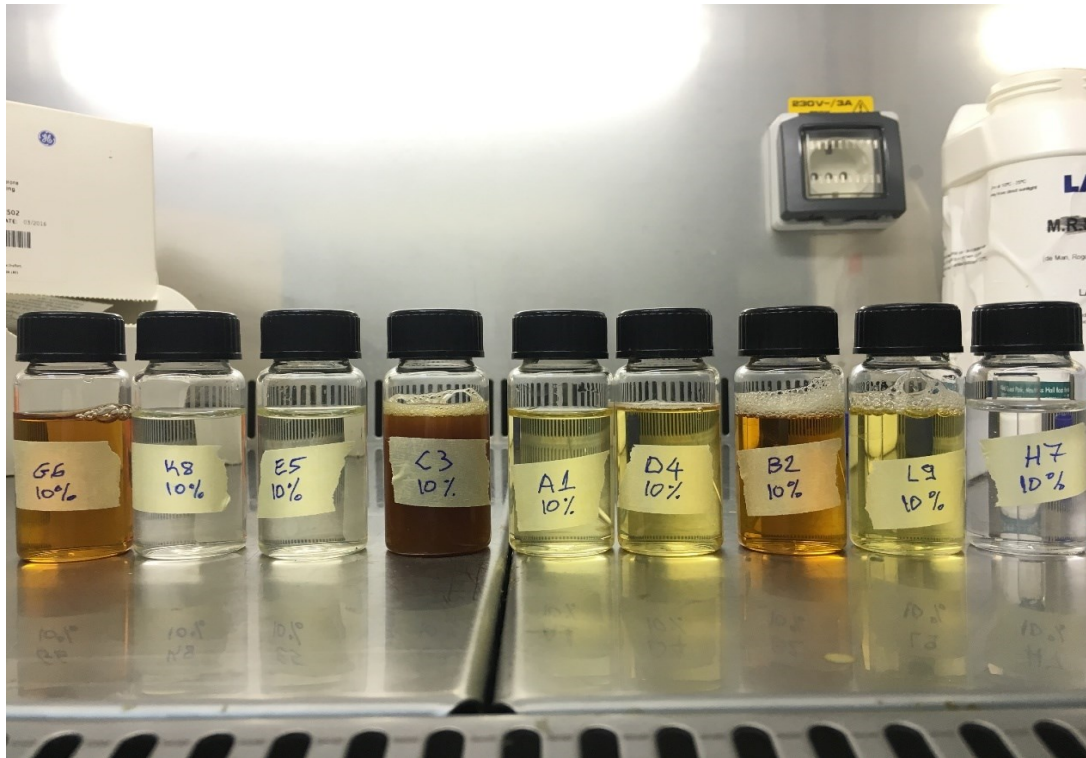
Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA – Food and Drug Administration) και είναι επίσης εγκεκριμένοι από το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών (USDA – United States Department of Agriculture).

**Πίνακας 2.2.** Κωδικές ονομασίες και ιδιότητες των συμπυκνωμάτων καπνού<sup>a</sup>.

Ονομασία	Γεύση	Οξύτητα (%)	pH	Καρβονόλια (g/l)	Φαινόλες (g/l)
<b>A1</b>	Χαμηλή	6.5 έως 7.8	2.1 έως 2.5	30.0	1.4 – 4.0
<b>B2</b>	Δυνατή	9.0 έως 12.0	2.0 έως 2.5	85.0 – 130.0	7.0 – 17.0
<b>C3</b>	Δυνατή	9.0 έως 11.0	2.0 έως 2.5	100.0 – 130.0	16.0 – 26.0
<b>D4</b>	Χαμηλή	7.0 έως 8.0	2.0 έως 2.5	44.0 – 54.0	0.0 – 3.0
<b>E5</b>	Καθόλου	0.1 έως 0.85	4.8 έως 6.0	15.0 – 40.0	0.25
<b>G6</b>	Χαμηλή	5.0 έως 8.0	2.0 έως 3.0	160.0	0.0 – 2.0
<b>H7</b>	Καθόλου	0.0 έως 5.0	2.0 έως 3.0	0.0 – 20.0	0.0 – 1.0
<b>K8</b>	Καθόλου	0.0 έως 5.0	2.0 έως 3.0	0.0 – 20.0	0.0 – 1.0
<b>L9</b>	Καθόλου	0.0 έως 3.0	2.5 έως 3.0	350.0	0.0 – 1.0

<sup>a</sup> Πηγή: Ruitenbergh Ingredients b.v.

Από την αρχική συνολική ποσότητα, προετοιμάστηκαν διαλύματα των 20 mL, αφού ρυθμίστηκε πρώτα το pH τους στην τιμή 7 με τη χρήση 5 N Υδροξειδίου του Νατρίου (NaOH) για περαιτέρω έλεγχο της πιθανής αντιμικροβιακής τους ιδιότητας. Τα διαλύματα που προετοιμάστηκαν πριν χρησιμοποιηθούν αποστειρώθηκαν με τη χρήση φίλτρων με διαμέτρημα πόρων μεμβράνης 0.22 μm (Durapore, Millipore) και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 2.0 °C.



**Εικόνα 2.1.** Αποστειρωμένα συμπυκνώματα των 9 υδατοδιαλυτών υγρών καπνών, τελικής συγκέντρωσης 10 % (v/v) (φωτογραφία του συγγραφέα).

## 2.6. Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα εκφράζονταν σε μέσου όρους, οι οποίοι υπολογίστηκαν με τη χρήση του Excel Microsoft® Office 365 (ver. 16.18). Για τα δείγματα που παρουσίασαν κανονική κατανομή, πραγματοποιήθηκε έλεγχος σημαντικότητας Student's t-test. Για να εκτιμηθούν οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών επεξεργασιών που υποβλήθηκαν τα δείγματα πραγματοποιήθηκε ανάλυση διασποράς ως προς έναν παράγοντα (one- way ANOVA) και ο έλεγχος Tukey (Tukey post hoc test) για τη σύγκριση των δεδομένων με τη χρήση του λογισμικού IBM SPSS® statistics 19 για Windows (SPSS Inc., U.S.). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 5.00 % και οι τιμές με  $P < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές.

## **Κεφάλαιο 3. Επίδραση της αντιμικροβιακής δράσης των υγρών καπνών στο *L. monocytogenes***

### **3.1. Εισαγωγή**

Τα συμπυκνώματα υγρών καπνών χρησιμοποιούνται παραδοσιακά πλέον σε τρόφιμα όπως είναι τα διάφορα κρεατοπαρασκευάσματα, τα πουλερικά αλλά και τα αλιευτικά προϊόντα. Βρίσκουν ακόμη χρήση ως πρόσθετα των χαρακτηριστικών της γεύσης και του αρώματος του καπνιστού σε μαρινάδες, τυποποιημένες σάλτσες (dipping sauce), τυριά, ακόμη και ζωοτροφές (Rozum, 2009). Άλλα πλεονεκτήματα από την χρήση τους στα τρόφιμα, εκτός από την εύκολη μεταχείριση τους είναι και η αντιμικροβιακή δράση που παρουσιάζουν, έναντι διαφόρων παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (Suñen et al., 2001; 2003; Soares et al., 2016).

Οι φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες μπορεί να προέρχονται από διάφορα φυτά, είδη ζώων αλλά και βακτηρίων (Davidson et al., 2013; Lingbeck et al., 2014). Παρά την εκτενή χρήση των υγρών καπνών στα τρόφιμα τα τελευταία χρόνια, δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες που να αποδεικνύουν τη χρήση τους ως φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες. Παραταύτα, έχουν βρεθεί αρκετές κοινές ενώσεις μεταξύ αιθέριων ελαίων και συμπυκνωμάτων καπνού, με αντιμικροβιακή δράση έναντι διάφορων παθογόνων μικροοργανισμών (Kivanc et al., 1991). Στην ανασκόπηση που πραγματοποίησαν οι Holley & Patel (2005), αναφέρουν ξεκάθαρα ότι τα συμπυκνώματα υγρών καπνών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες στα τρόφιμα, όμως λόγω των πολλών διαφορετικών ενώσεων που περιέχονται σε αυτά, είναι απαραίτητος ο έλεγχος τους αλλά και η εύρεση της συγκέντρωσης που απαιτείται για κάθε μικροοργανισμό στόχο.

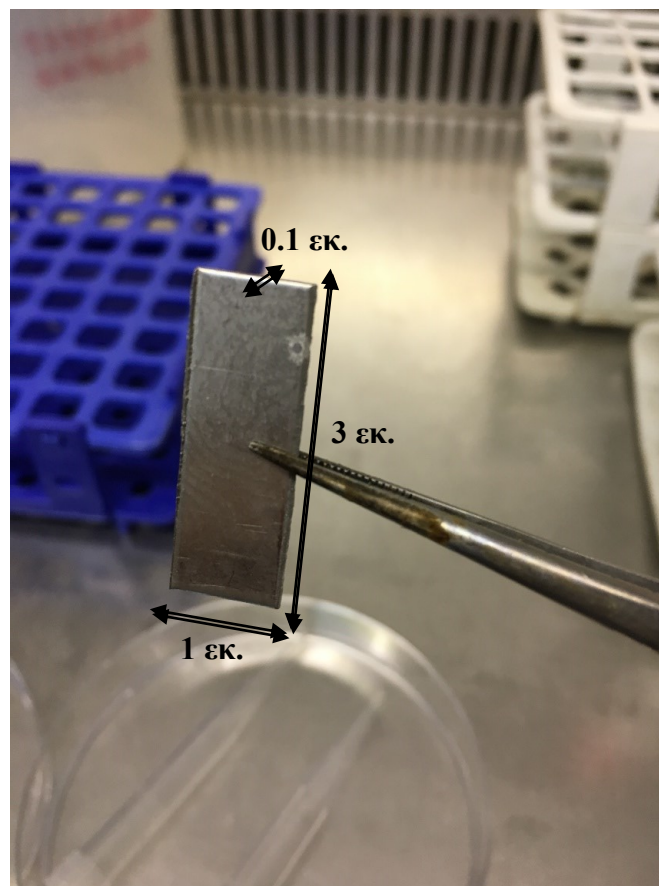
Κατά την παραγωγική διαδικασία των φιλέτων καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης) πραγματοποιείται άλμιση των φιλέτων πριν την κάπνιση με τη χρήση άλμης διαφορετικών συγκεντρώσεων άλατος ανάλογα με το εκάστοτε προϊόν ή παραγωγό. Για τον λόγο αυτό, είναι σημαντική η διερεύνηση της επίδρασης των διαφορετικών συμπυκνωμάτων υγρού καπνού στα κύτταρα του τροφιμογενούς παθογόνου *L. monocytogenes* που προέρχονται από διαφορετικά περιβάλλοντα ή έχουν διαφορετικό ιστορικό ανάπτυξης (κύτταρα πλαγκτονικά ή βιοϋμενίων, οσμωτικά προσαρμοσμένα ή όχι). Έτσι, στόχος ήταν να εκτιμηθεί η ελάχιστη βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνος συγκέντρωση των υγρών καπνών, έναντι των κυττάρων του *L. monocytogenes* προερχόμενου από διαφορετικά περιβάλλοντα ή με διαφορετικό ιστορικό ανάπτυξης.

## 3.2. Υλικά και μέθοδοι

### 3.2.1. Προετοιμασία και σχηματισμός βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*

#### 3.2.1.1. Προετοιμασία επιφανειών από ανοξείδωτο χάλυβα (ατσάλι)

Για την προσκόλληση των κυττάρων του *L. monocytogenes* και τον σχηματισμό των βιοϋμενίων χρησιμοποιήθηκαν μεταλλικές επιφάνειες (κουπόνια) από ανοξείδωτο χάλυβα κομμένες σε διαστάσεις 3 × 1 × 0.1 εκ., (type AISI-304; Χαλυβουργική Α.Ε.; Αθήνα, Ελλάδα). Λόγω της φυσικοχημικής σταθερότητας και της υψηλής αντοχής του, το υλικό χρησιμοποιείται ευρέως στις βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων ως κατασκευαστικό υλικό για τον εξοπλισμό τους (Papaioannou et al., 2018). Πριν τη χρήση τους όλα τα κουπόνια καθαρίζονταν μεθοδικά και αποστειρώνονταν σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφουν οι Kostaki et al. (2012).



**Εικόνα 3.1.** Μεταλλική επιφάνεια (κουπόνι) από ανοξείδωτο χάλυβα (Φωτογραφία του συγγραφέα).

### **3.2.1.2. Μεταφορά και προσκόλληση βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* στις μεταλλικές επιφάνειες**

Μετά την προετοιμασία του μίγματος πέντε στελεχών του *L. monocytogenes*, (όπως περιεγράφηκε στο 2.1), λήφθηκε εμβόλιο 100  $\mu\text{L}$  και προστέθηκε σε 6 mL αποστειρωμένης σαλίνης (0.85 % w/v NaCl), ώστε ο τελικός πληθυσμός του παθογόνου στο διάλυμα να είναι  $10^{7-8}$  CFU/mL. Νωρίτερα τα αποστειρωμένα κουπόνια είχαν τοποθετηθεί στο διάλυμα σαλίνης και εν τέλει αφέθηκαν για 2 ώρες, χωρίς ανατάραξη σε θερμοκρασία δωματίου να γίνει η προσκόλληση των κυττάρων. Μετά το πέρας των 2 ωρών, έγινε ξέπλυμα όλων των μεταλλικών επιφανειών μία προς μία με τη χρήση πιπέτας, ρίχνοντας 3 mL σαλίνης σε κάθε πλευρά για την απομάκρυνση των μη προσκολλημένων ή των ελαφρώς προσκολλημένων κυττάρων. Αμέσως, τα κουπόνια επανατοποθετούνταν σε νέους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 6 mL TSBy.e. και αφήνονταν για επώαση στους 16 °C.

### **3.2.1.3. Ανάπτυξη κυττάρων βιοϋμενίων**

Από τους αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν τις μεταλλικές επιφάνειες, την αρχική ημέρα (ημέρα 0) και κάθε δύο ημέρες, λαμβάνονταν υπό άσηπτες συνθήκες με αποστειρωμένη λαβίδα μία μεταλλική επιφάνεια και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο falcon των 15 mL. Το falcon περιείχε 6 mL MRD (LABM, Lancashire UK) και περίπου 1  $\mu\text{g}$  γυάλινα σφαιρίδια διαμετρήματος 0.1 mm. Κατόπιν, γίνονταν ανατάραξη για 1 λεπτό, σε ανακινητή Vortex (F20, Velp Scientifica, Italy) για την απόξεση των προσκολλημένων κυττάρων, των σχηματιζόμενων βιοϋμενίων από τα κουπόνια. Έπειτα πραγματοποιούνταν οι κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις λαμβάνοντας 1 mL από το εναιώρημα το οποίο



μεταφέρονταν σε 9 mL MRD. Η απαρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού έγινε, όπως περιγράφεται στο 2.2. Τέλος, τα υπόλοιπα κουπόνια σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας επανατοποθετούνταν σε νέους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες με φρέσκο θρεπτικό υλικό TSB<sub>y.e.</sub> (6 mL) και αφήνονταν για επώαση στους 16 °C.

### **3.2.2. Ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα του *L. monocytogenes***

Κύτταρα προερχόμενα από φρέσκες ανανεωμένες υγρές καλλιέργειες συγκεντρώθηκαν για τον σχηματισμό του μίγματος πέντε στελεχών του *L. monocytogenes*, (βλέπε 2.1). Λήφθηκε εμβόλιο 100 μL και προστέθηκε σε 9.9 mL TSB<sub>y.e.</sub> εμπλουτισμένο με ή χωρίς 10 % (w/v) NaCl, ώστε ο τελικός πληθυσμός του παθογόνου στο διάλυμα να είναι 10<sup>7</sup> CFU/mL. Έπειτα, ακολούθησε επώαση για 12 ώρες στους 16 °C, προσομοιάζοντας τις θερμοκρασιακές συνθήκες που επικρατούν στον χώρο άλμισης των προϊόντων. Μετά το πέρας των 12 ωρών ο πληθυσμός των κυττάρων στο TSB<sub>y.e.</sub> χωρίς αλάτι είχε αυξηθεί κατά 1.00 log, ενώ δεν παρατηρήθηκε αύξηση για τα κύτταρα που βρίσκονταν στο TSB<sub>y.e.</sub> παρουσία άλατος.

### **3.2.3. Προετοιμασία συμπυκνωμάτων υγρού καπνού**

Βλέπε 2.5.

### **3.2.4. Προσδιορισμός της Ελάχιστης Παρεμποδιστικής Συγκέντρωσης (MIC) και της Ελάχιστης Βακτηριοκτόνου Συγκέντρωσης (MBC)**

Στο παρόν κεφάλαιο έγινε προσδιορισμός της MIC για το *L. monocytogenes*, με τη χρήση της μεθόδου σε υγρό θρεπτικό υλικό, όπως περιγράφεται από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την Δοκιμή ευαισθησίας κατά της μικροβιακής αντοχής (EUCAST, 2003).

Συγκεκριμένα, έγινε δοκιμή με χρήση κυττάρων του *L. monocytogenes* προερχόμενα από διάφορες καταστάσεις. Κύτταρα προερχόμενα από ωσμωτική καταπόνηση και από βιοϋμένια καθώς και κύτταρα ελέγχου (κανονικά) ενοφθαλμίστηκαν για να φτάσουν σε τελικό πληθυσμό τα  $10^3$  CFU/φιαλίδιο. Ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης των συμπυκνωμάτων καπνού πραγματοποιήθηκε σε γυάλινα φιαλίδια που περιείχαν θρεπτικό μέσο αύξησης TSB<sub>y</sub>.e. με τιμή pH 6.4 εις τριπλούν.

Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν για τον προσδιορισμό της MIC και MBC, κυμαίνονταν από 0.25 % έως και 2.00 % με προσαυξήσεις της τάξης των 0.25 % σε δύο θερμοκρασίες, στους 37 °C (βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *L. monocytogenes*) και στους 7.9 °C (μη ορθή θερμοκρασία ψύξης οικιακού ψυγείου). Για την εύρεση της MIC σε κάθε καταμέτρηση γίνονταν καθημερινός έλεγχος της θολερότητας του θρεπτικού μέσου με το μάτι. Για την τελική έκφραση του αποτελέσματος, εάν έστω και ένα φιαλίδιο (από τα συνολικά 3) σε κάθε συγκέντρωση παρουσίαζε θολερότητα κατά την καθημερινή παρατήρηση απορρίπτονταν και η MIC κάθε φορά θεωρούνταν η αμέσως υψηλότερη συγκέντρωση, όπου το θρεπτικό μέσο για όλα τα δείγματα ήταν διαυγές. Για τον προσδιορισμό της MBC λαμβάνονταν καθημερινά ποσότητα 100 μL από όλα τα φιαλίδια χωρίς παρατηρούμενη αύξηση, για επίστρωση σε τρυβλία Petri με TSA<sub>y</sub>.e. με τη μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης και επώαση για 24 – 48 ώρες, στους 37 °C.

### 3.3. Αποτελέσματα

#### 3.3.1. Ελάχιστη παρεμποδιστική και βακτηριοκτόνος συγκέντρωση των συμπυκνωμάτων υγρών καπνών

Οι ιδιότητες όλων των συμπυκνωμάτων υγρών καπνών περιγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.2, του προηγούμενου κεφαλαίου. Όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 3.1, για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης, προσδιορίστηκαν η ελάχιστη παρεμποδιστική και βακτηριοκτόνος δράση των συμπυκνωμάτων υγρών καπνών στους 7.9 °C και στους 37 °C.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι ο πιο αποτελεσματικός καπνός έναντι των κυττάρων του *L. monocytogenes* ήταν ο L9, ο οποίος έχει την χαμηλότερη οξύτητα (%), από τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών και την υψηλότερη συγκέντρωση καρβονυλίων. Η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση για τον L9, βρέθηκε να είναι ίση με 0.25 % (v/v). Ο υγρός καπνός με την κωδική ονομασία B2, έδειξε μικρή παρεμποδιστική δράση στους 37 °C, την πρώτη ημέρα με τιμή MIC 2.00 % (v/v) η οποία μετά την 2<sup>η</sup> ημέρα ήταν > 2.00 % (Πίν. 3.1). Ο καπνός G6, φάνηκε να έχει ικανοποιητική παρεμποδιστική δράση έναντι του *L. monocytogenes* στους 37 °C, έως και την τρίτη ημέρα, όπου η τιμή MIC ήταν 1.50 % (v/v), ενώ τελικά μέχρι και την 5<sup>η</sup> ημέρα ήταν > 2.00 % (v/v). Ο G6, ομοίως με τον L9 έχει υψηλή συγκέντρωση σε καρβονύλια, χαμηλό pH αλλά αρκετά υψηλότερη οξύτητα, ίση με 5.00 – 8.00 %. Πολύ καλή βακτηριοκτόνο δράση εμφάνισε και πάλι ο L9, με ποσοστό 0.50 % για την ιδανική θερμοκρασία επώασης (37 °C) του *L. monocytogenes* (Πίν. 3.1). Όλοι οι υπόλοιποι υγροί καπνοί δεν επέδειξαν καμία ανασταλτική ή βακτηριοκτόνο δράση έναντι του τροφιμογενούς παθογόνου.

**Πίνακας 3.1.** Ελάχιστη παρεμποδιστική (MIC) και βακτηριοκτόνος (MBC) συγκέντρωση των 9 συμπυκνωμάτων υγρών καπνών, έπειτα από 5 ημέρες επώαση στους 7.9 και 37 °C, έναντι των κυττάρων του *L. monocytogenes*.

Υγρός καπνός	MIC (v/v %)		MBC (%)	
	7.9 °C	37 °C	7.9 °C	37 °C
A1	>2.00	>2.00	>2.00	>2.00
B2	>2.00	>2.00	>2.00	>2.00
C3	>2.00	>2.00	>2.00	>2.00
D4	>2.00	>2.00	>2.00	>2.00
E5	>2.00	>2.00	>2.00	>2.00
G6	0.25	>2.00	>2.00	>2.00
H7	>2.00	>2.00	>2.00	>2.00
K8	>2.00	>2.00	>2.00	>2.00
L9	0.25	0.25	0.50	0.50

Στους 7.9 °C, ο καπνός L9 και πάλι ήταν ο πιο αποτελεσματικός καθώς η τιμή MIC ήταν 0.25 % (v/v) και η MBC ίση με 0.50 % (Πίν. 3.1). Ομοίως η ανασταλτική συγκέντρωση του G6 στους 7.9 °C ήταν 0.25 % (v/v). Παρά την αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση του G6 στους 7.9 °C, δεν παρουσιάστηκε εξίσου σημαντική βακτηριοκτόνος δράση (MBC), καθώς σε καμία συγκέντρωση δεν παρεμποδίστηκε η ανάπτυξη των κυττάρων του *L. monocytogenes*, στο θρεπτικό υπόστρωμα (TSAy.e.). Παρατηρώντας την δράση των υπόλοιπων συμπυκνωμάτων, οι καπνοί B2 και C3, εμφάνισαν ανασταλτική δράση στη συγκέντρωση 2.00 %, η οποία από την 2<sup>η</sup> έως και την 5<sup>η</sup> ημέρα ξεπέρασε το 2.00 % (Πίν. 3.1).

### **3.3.2. Συμπεριφορά των ωσμωτικά προσαρμοσμένων και κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, στην αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών**

Στον πίνακα 3.2, παρουσιάζονται οι τιμές των αποτελεσμάτων για την ελάχιστη παρεμποδιστική και βακτηριοκτόνο συγκέντρωση των υγρών καπνών έναντι των ωσμωτικά προσαρμοσμένων, κανονικών (ελέγχου) καθώς και κυττάρων του *L. monocytogenes* προερχόμενα από βιοϋμένια. Ο υπολογισμός των τιμών έγινε στη

βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του παθογόνου (37 °C) και στη μη ορθή θερμοκρασία ψύξης οικιακού ψυγείου (7.9 °C).

**Πίνακας 3.2.** Ελάχιστη παρεμποδιστική (MIC) και βακτηριοκτόνος (MBC) συγκέντρωση των συμπυκνωμάτων υγρών καπνών L9 και G6, έπειτα από 8 ημέρες επώαση στους 7.9 και 37 °C, έναντι κανονικών κυττάρων, ωσμωτικά προσαρμοσμένων και κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*.

Υγρός καπνός	Κατάσταση M/O	MIC (v/v %)		MBC (%)	
		7.9 °C	37 °C	7.9 °C	37 °C
L9	Ωσμωτικά	0.25	0.50	0.50	0.50
	Βιοϋμένια	0.50	0.50	0.75	0.75
	Κανονικά	0.25	0.25	0.50	0.50
G6	Ωσμωτικά	0.25	>2.00	>2.00	>2.00
	Βιοϋμένια	0.25	>2.00	>2.00	>2.00
	Κανονικά	0.25	>2.00	>2.00	>2.00

Η MIC του L9 για τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα του *L. monocytogenes*, έπειτα από 2 ημέρες επώασης στους 7.9 °C ήταν 0.25 % (v/v) (Πίν. 3.2). Ο L9 παρουσίασε, επίσης, πολύ καλή βακτηριοκτόνο δράση, έναντι των καταπονημένων (ωσμωτικά) κυττάρων, καθώς δεν απαριθμήθηκαν καθόλου αποικίες στα τρυβλία TSAy.e. και για τις 2 θερμοκρασίες στη συγκέντρωση 0.50 % ακόμη και μετά από 8 ημέρες (Πίν. 3.2).

Ο L9 ήταν ο πιο αποτελεσματικός καπνός έναντι των κυττάρων βιοϋμενίων στους 37 °C, με τιμή MIC 0.50 % (v/v) (Πίν. 3.2). Αντίστοιχα, στις ίδιες συνθήκες, χρειάστηκαν μόλις 2 ημέρες για τον L9 (0.50 %) να προκαλέσει αδρανοποίηση του 99 % των κανονικών κυττάρων (ελέγχου) του *L. monocytogenes*. Ο καπνός G6 δεν μπόρεσε να αναστείλει την ανάπτυξη των κυττάρων από βιοϋμένια στους 37 °C (> 2.00 % v/v; Πίν. 3.2).

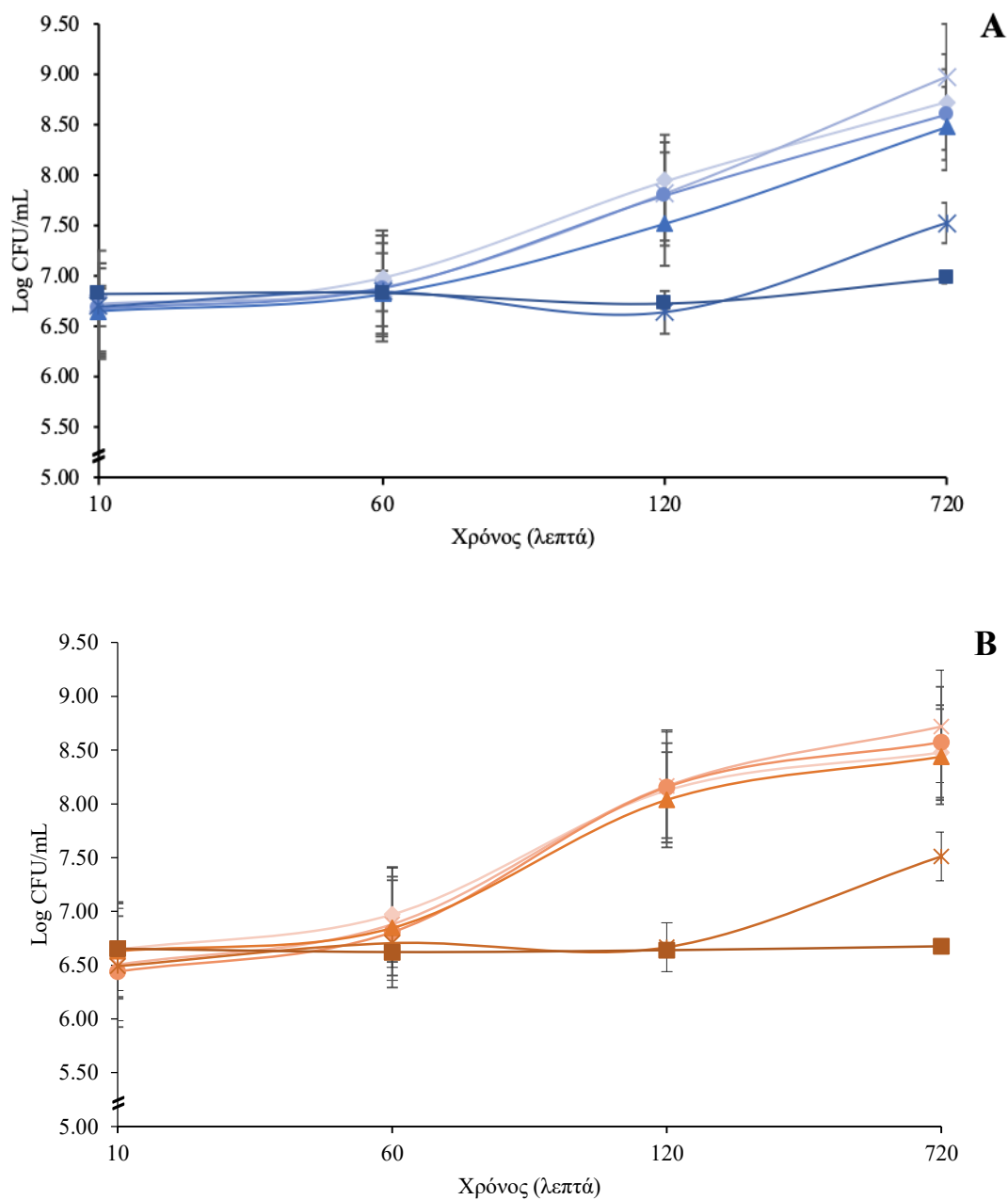
Στη θερμοκρασία των 7.9 °C η τιμή MIC του L9, για τα κύτταρα βιοϋμενίων την 6<sup>η</sup> ημέρα διαμορφώθηκε και παρέμεινε στο 0.50 % (v/v, Πίν. 3.2). Στην ίδια

θερμοκρασία ο G6, ήταν πιο αποτελεσματικός παρουσιάζοντας παρεμποδιστική δράση στη μικρότερη συγκέντρωση ίση με 0.25 % (v/v), έναντι όλων των κυττάρων (Πίν. 3.2). Στους 7.9 °C και σε συγκέντρωση 0.75 % (MBC) ο L9 απέτρεψε την ανάπτυξη των βιοϋμενικών κυττάρων, ενώ ο G6 δεν παρουσίασε κάποια βακτηριοκτόνο δράση (> 2.00 %) μετά από 8 ημέρες (Πίν. 3.2). Η βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) του L9 για τα κανονικά κύτταρα του *L. monocytogenes* και στις δύο θερμοκρασίες ήταν 0.50 % (Πίν. 3.2). Ο καπνός G6, ήταν αποτελεσματικός έναντι όλων των κυττάρων μόνο στους 7.9 °C με τιμή MIC 0.25 % (Πίν. 3.2). Τέλος, όπως προέκυψε ο υγρός καπνός L9 ήταν ο πιο αποτελεσματικός.

### **3.3.3. Έλεγχος ανάπτυξης του *L. monocytogenes* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις άλατος**

Στα σχήματα 3.1 έως και 3.3, παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του παθογόνου. Ο αρχικός πληθυσμός του εμβολίου ήταν περίπου 6.50 log CFU/mL. Τόσο τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα όσο και τα κανονικά κύτταρα (ελέγχου) που απαριθμήθηκαν σε TSAy.e., παρουσίασαν γραμμική αύξηση σε log σε σχέση με τον χρόνο επώασης τους στο θρεπτικό υλικό TSBy.e. με 0.50 έως και 6.00 % NaCl (w/v; Σχ. 3.1 A & B). Αντιθέτως, στα κύτταρα του *L. monocytogenes* που αναπτύχθηκαν στο TSBy.e. με προσθήκη 8.00 % (w/v) άλατος, φάνηκε να παρατείνεται η στατική τους φάση (lag phase), και να παρουσιάζουν αύξηση, φτάνοντας σε πληθυσμό τους 7.53 και 7.51 log CFU/mL, έπειτα από 720 λεπτά για τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα και κανονικά κύτταρα (ελέγχου), αντίστοιχα (Σχ. 3.1 A & B). Η υψηλότερη αλατότητα της τάξης του 10.00 % (w/v), στα όρια του υποθανάτιου στρες, αποδείχθηκε καθοριστική, καθώς ακόμη και μετά από 720 λεπτά επώασης του

παθογόνου, παρατηρήθηκε ελάχιστη αύξηση ίση ή μικρότερη από 0.10 log CFU/mL, για τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα και μη κύτταρα (Σχ. 3.1 A & B).

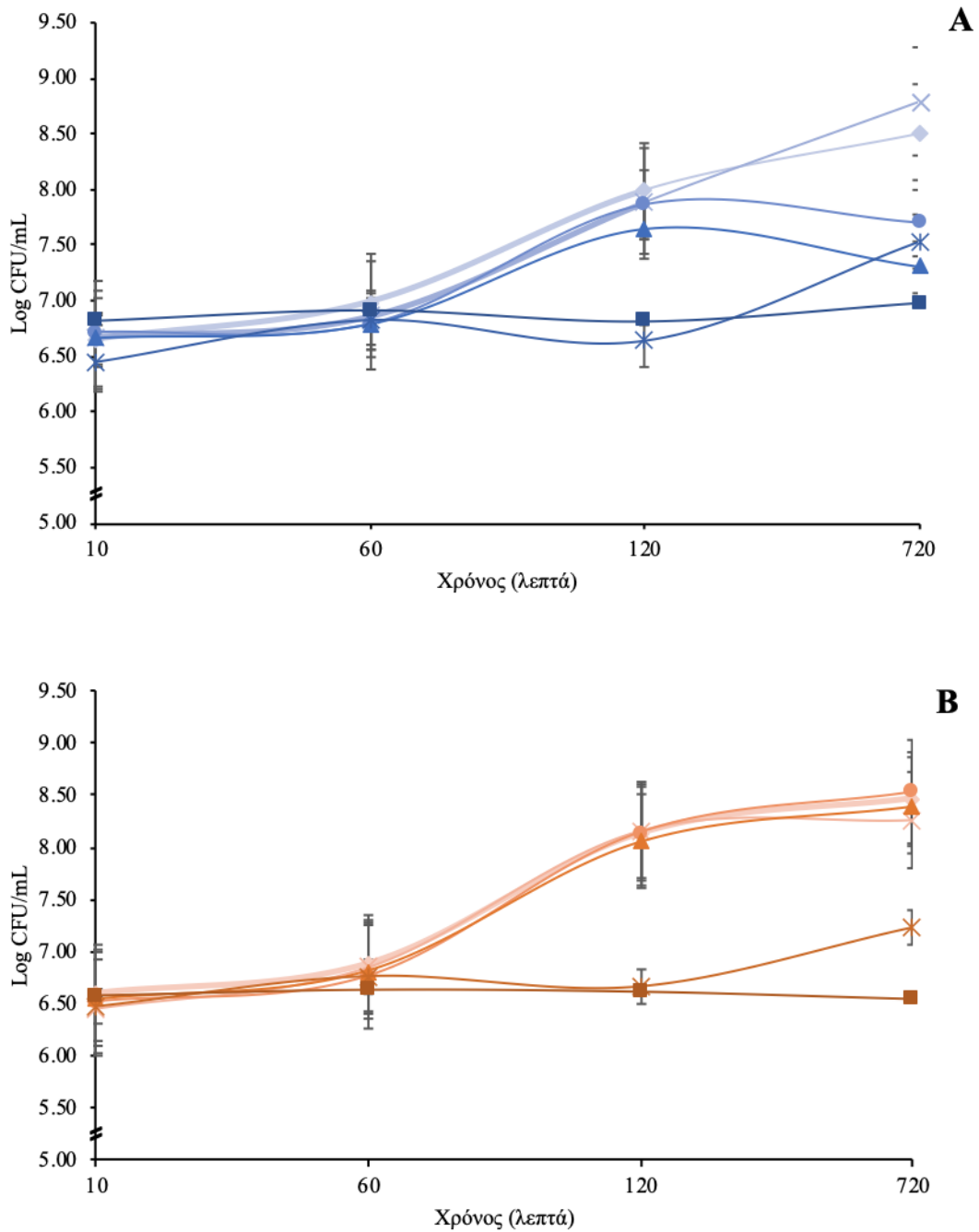


**Σχήμα 3.1.** Ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε TSBY.e μετά από επώαση στους 37 °C, για 10, 60, 120 και 720 λεπτά. (A) Ωσμωτικά προσαρμοσμένα και (B) Κανονικά κύτταρα (ελέγχου). Απαρίθμηση σε TSAy.e. των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε TSBY.e. με NaCl (w/v, %): (◆) 0.50, (×) 2.00 (●) 4.00 (▲) 6.00 (\*) 8.00 και (■) 10.00. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

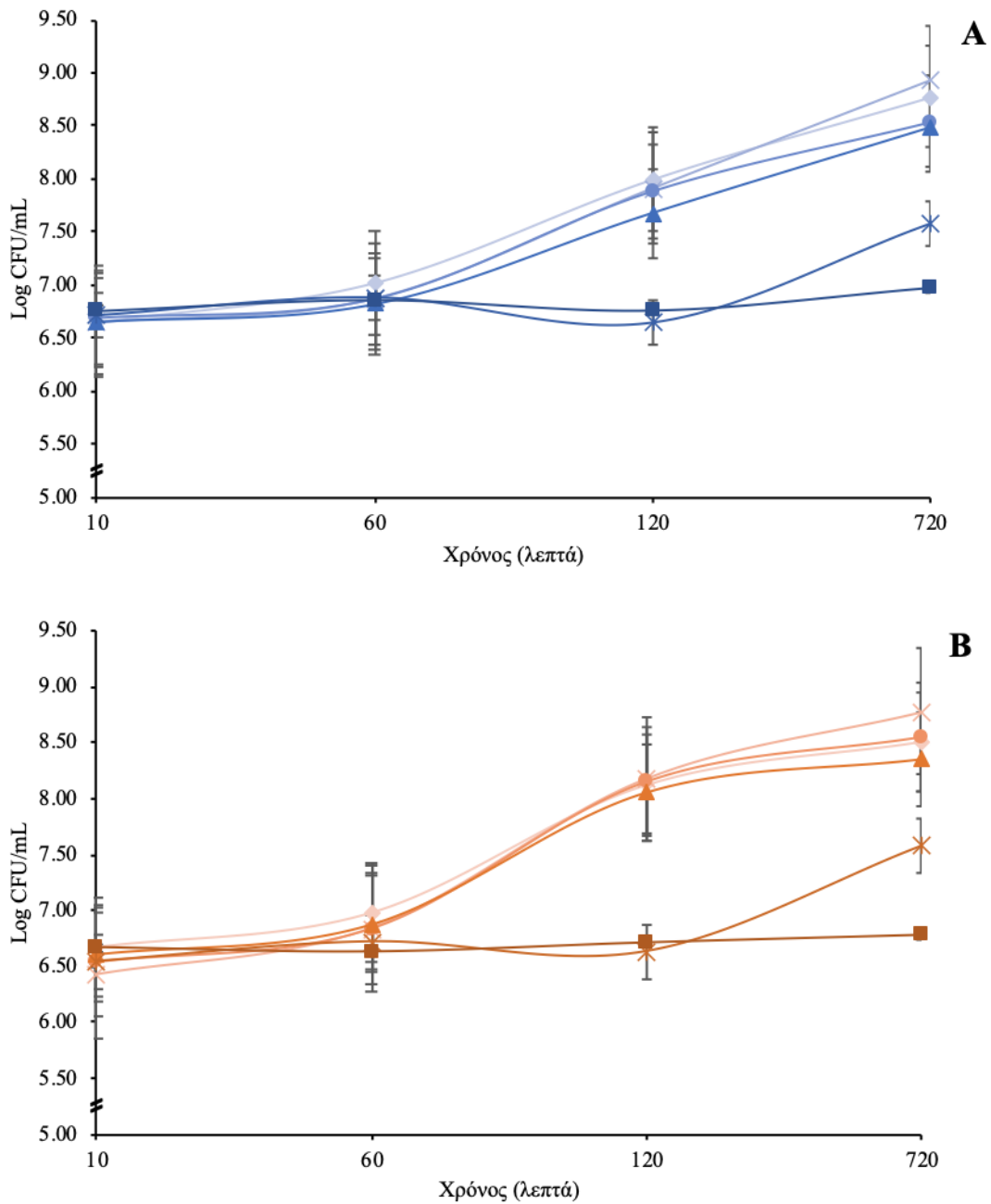
Στο σχήμα 3.2 (A), φάνηκε πως η χαμηλή αλατότητα έως και 2.00 % (w/v) δεν επηρέασε την ανάπτυξη των προσαρμοσμένων κυττάρων στην επιφάνεια του PALCAM. Ωστόσο, η παραμονή των ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων στο θρεπτικό με αλατότητα 4.00 % και 6.00 % (w/v), οδήγησε αρχικά στην αύξηση του πληθυσμού τους και μετά τα 720 λεπτά στη μείωσή τους φτάνοντας 7.30 και 7.70 log CFU/mL, αντίστοιχα (Σχ. 3.2 A). Τα κανονικά κύτταρα (ελέγχου) του *L. monocytogenes* από όλες τις μελετώμενες συγκεντρώσεις NaCl, όταν απαριθμήθηκαν σε PALCAM άγαρ, συγκριτικά με το TSAy.e. δεν παρουσίασαν διαφορές στην ανάπτυξη τους (Σχ. 3.2 B).

Στο σχήμα 3.3 (A & B), διαφάνηκε ότι, μετά από επώαση στους 37 °C, για 10, 60, 120 και 720 λεπτά, η ανάπτυξη τόσο των κανονικών όσο και των ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* στις περισσότερες περιπτώσεις ήταν ανοδική. Εξαιρέση αποτέλεσαν τα κύτταρα του παθογόνου (προσαρμοσμένα και κανονικά) που αναπτύχθηκαν σε TSBY.e. με 10.00 % NaCl (w/v) και ο πληθυσμός τους παρέμεινε σχεδόν ίδιος, ακόμη και μετά από 720 λεπτά επώασης (Σχ. 3.3 A & B).





**Σχήμα 3.2.** Ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε TSBY.e μετά από επώαση στους 37 °C, για 10, 60, 120 και 720 λεπτά. (A) Ωσμωτικά προσαρμοσμένα και (B) Κανονικά κύτταρα (ελέγχου). Απαρίθμηση σε PALCAM των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε TSBY.e. με NaCl (w/v, %): (◆) 0.50, (×) 2.00 (●) 4.00 (▲) 6.00 (\*) 8.00 και (■) 10.00. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).



**Σχήμα 3.3.** Ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε TSBy.e μετά από επώαση στους 37 °C, για 10, 60, 120 και 720 λεπτά. (A) Ωσμωτικά προσαρμοσμένα και (B) Κανονικά κύτταρα (ελέγχου). Απαρίθμηση σε TSAy.e. + NaCl 5.00 %, των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε TSBy.e. με NaCl (w/v, %): (◆) 0.50, (×) 2.00 (●) 4.00 (▲) 6.00 (\*) 8.00 και (■) 10.00. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

### 3.4. Συζήτηση

Οι καπνοί με την κωδική ονομασία B2, C3, G6 και L9, είχαν θετικά αποτελέσματα εμφανίζοντας διαφορετική αντιμικροβιακή δράση κατά του μίγματος (5 στελεχών) του *L. monocytogenes* σε υγρές καλλιέργειες, στις επιτρεπόμενες και ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην βιομηχανία καπνιστών αλιευτικών προϊόντων. Ο πιο αποτελεσματικός καπνός, ήταν ο L9, που περιείχε υψηλά ποσοστά καρβονυλίων, χαμηλά ποσοστά φαινολικών ουσιών και χαμηλή οξύτητα. Οι Milly et al. (2005), χρησιμοποίησαν εννέα (9) συμπυκνώματα υγρών καπνών με χαμηλές τιμές φαινολικών ουσιών για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής τους δράση έναντι του *Listeria innocua* M1 και άλλων Gram αρνητικών βακτηρίων. Αναφέρουν ότι, οι τιμές MIC για όλα τα βακτήρια φάνηκε να εξαρτώνται από το περιεχόμενο των υγρών καπνών σε φαινολικές ουσίες και κυμάνθηκαν από 1.50 % έως και 3.00 %. Στις περισσότερες περιπτώσεις και στις 2 θερμοκρασίες (7.9 °C και 37 °C) η τιμή MIC 0.50 % (v/v) L9, ήταν αρκετή για την αναστολή της ανάπτυξης των ωσμωτικά προσαρμοσμένων και κυττάρων βιοϋμενίων. Ο G6 παρουσίασε πολύ καλή ανασταλτική δράση μόνο στη θερμοκρασία των 7.9 °C με τιμή MIC 0.25 % (v/v) για όλα τα κύτταρα. Αποτελεί μία από τις πιο χαμηλές συγκεντρώσεις (0.25 %) που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για παρόμοιες έρευνες σε διάφορα στελέχη του *L. monocytogenes* (Suñen et al., 1998; Milly et al., 2005; Lingbeck et al., 2014). Σε αντίθεση με τους Milly et al. (2005), οι δύο αποτελεσματικότεροι υγροί καπνοί, έναντι των κυττάρων του *L. monocytogenes*, ήταν οι L9 και G6, οι οποίοι είχαν με διαφορά την υψηλότερη συγκέντρωση καρβονυλίων. Αυτή η αντίθεση των αποτελεσμάτων ωστόσο, είναι γνωστό φαινόμενο καθώς ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η αντιμικροβιακή δράση των συμπυκνωμάτων υγρών καπνών, έναντι του *L. monocytogenes* και άλλων παθογόνων βακτηρίων,

οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις (Vitt et al., 2001; Paranjpye et al., 2005; Gedela et al., 2007; Kim et al., 2012; Van Loo et al., 2012), ενώ οι υπόλοιποι αναφέρουν ότι οι καρβονυλικές ενώσεις είναι αυτές που προσδίδουν τις αντιμικροβιακές ιδιότητες (Milly et al., 2005; Montazeri et al., 2013).

Τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα (10.00 %, w/v) κύτταρα και τα κύτταρα ελέγχου του *L. monocytogenes* φάνηκε να είναι πιο ευαίσθητα, στην αντιμικροβιακή δράση του υγρού καπνού L9, συγκριτικά με τα κύτταρα βιοϋμενίων. Οι Faezi-Ghasemi & Kazemi (2015), αναφέρουν ότι τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα (7.00 %, w/v) κύτταρα του *L. monocytogenes* παρουσίασαν μειωμένη ανθεκτικότητα έναντι συγκεκριμένων αντιβιοτικών ουσιών. Αντιθέτως, οι Al-Nabulsi et al. (2015) βρήκαν, πως έπειτα από προσαρμογή των κυττάρων του *L. monocytogenes* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις άλατος, παρατηρήθηκε αντοχή των κυττάρων με έως και 4 φορές υψηλότερες τιμές MIC, σε αντιβιοτικά όπως είναι η αμπικιλίνη, η τετρακυκλίνη, η δοξυκυκλίνη, η γενταμυκίνη, η βανκομυκίνη κ.ά. Είναι γνωστή η ικανότητα του *L. monocytogenes* να καταφέρνει να επιβιώνει ακόμη και να αναπτύσσεται, κάτω από ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών και ιδιαίτερα αυξημένης αλατότητας (10.00 % NaCl; McClure et al., 1989; Sleator et al., 2003; Ferreira et al., 2014).

Το παθογόνο, έχει την ικανότητα προσαρμογής σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις άλατος, μέσω του μηχανισμού του, που του επιτρέπει την συσσώρευση συμβατών διαλυμένων ουσιών ή και οσμολυτών συμβάλλοντας στην αποκατάσταση της ωσμωτικής ισορροπίας (Ko & Smith, 1999). Πράγματι, από τα αποτελέσματα μας προκύπτει ότι κατά την παραμονή των κυττάρων του *L. monocytogenes* στην υποθανάτια συγκέντρωση άλατος 10.00 % (w/v), μπορεί να παρατηρηθούν φαινόμενα προσαρμογής των κυττάρων με συνέπεια την ανάπτυξη αντοχής στα επιπρόσθετα εμπόδια (ίδιας ή χαμηλότερης έντασης) κατά τη διάρκεια της

παραγωγικής διαδικασίας. Η ικανότητα ανάπτυξης των ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* σε μέσα με υψηλή αλατότητα, είναι αποτέλεσμα της εγγενούς ανθεκτικότητας του παθογόνου στο αλάτι (Bergholz et al., 2010). Πολυάριθμες έρευνες αναφέρουν παρόμοια φαινόμενα προσαρμοστικότητας των κυττάρων του *L. monocytogenes* σε ωσμωτικό σοκ οδηγώντας στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε συνθήκες όξινου περιβάλλοντος – χαμηλού pH (Belessi et al., 2011b; Makariti et al., 2015), στις αντιμικροβιακές ουσίες (Al-Nabulsi et al., 2015) ή και στην υψηλή θερμοκρασία (Jorgensen et al., 1995; Skandamis et al., 2009).

Καταλήγοντας, ο πιο αποτελεσματικός καπνός ήταν ο L9 και τα κύτταρα βιοϋμενίων ήταν τα πιο ανθεκτικά και ακολούθησαν τα κύτταρα που είχαν προηγουμένως υποστεί ωσμωτική καταπόνηση σε 10.00 % (w/v) NaCl. Αυτό μπορεί να οφείλεται στις ιδιότητες του εξωπολυσακχαριτικού στρώματος (EPS) που περικλείει και προστατεύει τα κύτταρα βιοϋμενίων και στην αυξημένη ανθεκτικότητα που αναπτύσσουν τα κύτταρα του παθογόνου, μετά την ωσμωτική καταπόνηση. Τέλος, διαπιστώθηκε ότι τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα του *L. monocytogenes* εμφάνισαν αυξημένη αντοχή, κατά την έκθεση τους σε μέσα με υψηλή αλατότητα (10.00 %, w/v).

Τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου υποδηλώνουν ότι οι διαφορές στο ιστορικό ανάπτυξης των κυττάρων (ωσμωτικά προσαρμοσμένα ή βιοϋμένια) του παθογόνου μπορεί να τους προσδώσουν αυξημένη αντοχή στις αντιμικροβιακές ουσίες των υγρών καπνών.

## **Κεφάλαιο 4. Συμπεριφορά και απόκριση ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* κατά τη θερμική καταπόνηση**

### **4.1. Εισαγωγή**

Η Λιστέρια, συνεχίζει και αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για την βιομηχανία των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων (RTE). Μία ευρεία γκάμα αλιευτικών προϊόντων και συγκεκριμένα τα ήπια επεξεργασμένα τρόφιμα (< 6.00 % NaCl στην υδάτινη φάση και pH > 5), όπως είναι τα καπνιστά ψάρια (ψυχρής ή θερμής κάπνισης) ανήκουν στην παραπάνω κατηγορία και εμπλέκονται συχνά στη μετάδοση του παθογόνου (Huss et al., 2000).

Το γεγονός ότι κατά την παραγωγική επεξεργασία των τροφίμων συνήθως χρησιμοποιούνται θερμοκρασίες κάτω των 65 °C, αποτελεί ενδεχόμενο κίνδυνο καθώς το *L. monocytogenes* μπορεί και αναπτύσσει θερμοανθεκτικότητα σε αυτό το θερμοκρασιακό εύρος, κάνοντας την αντιμετώπιση του δυσκολότερη (Juneja & Novak, 2005; Rosnes et al., 2011). Ένα ακόμη σημαντικό στάδιο συγκεκριμένα για τη βιομηχανία καπνιστών αλιευμάτων, το οποίο αποτελεί και κρίσιμο σημείο του σχεδίου HACCP, είναι η αποτελεσματική κάπνιση των αλιευμάτων κατά τη θέρμανση τους (Hilderbrand, 1997). Επομένως, συμπεραίνουμε ότι το *L. monocytogenes* μπορεί να εκτεθεί διαδοχικά κατά την επεξεργασία καπνιστών αλιευτικών προϊόντων σε ωσμωτική (10 % NaCl) και θερμική (60 °C) καταπόνηση, αλλά και καταπόνηση από τις αντιμικροβιακές ουσίες που μπορεί να περιέχονται στον καπνό που εφαρμόζεται στο τρόφιμο κατά την κάπνιση.

Σκοπός του κεφαλαίου ήταν η διερεύνηση της ανάπτυξης ανθεκτικότητας του *L. monocytogenes* έπειτα από έκθεση και προσαρμογή του σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (10.00 %, w/v; 12 ώρες), στις επακόλουθες καταπονήσεις όπως, το θερμικό σοκ και η αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών (L9 & G6) ώστε να προσομοιώνονται οι καταπονήσεις που παρουσιάζονται κατά τη παραγωγική διαδικασία των φιλέτων καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης).

## 4.2. Υλικά και μέθοδοι

### 4.2.1. Θερμική αδρανοποίηση ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων

Για την εκτίμηση της απόκρισης των κυττάρων του *L. monocytogenes* στην ωσμωτική καταπόνηση και την πιθανή εμφάνιση θερμοανθεκτικότητας μελετήθηκαν τα εξής σενάρια: κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία 10.00 % (w/v) NaCl (ωσμωτικά προσαρμοσμένα) και κανονικά, κύτταρα ελέγχου, υποβλήθηκαν σε θερμική καταπόνηση με ενοφθαλμισμό, σε προ θερμασμένο θρεπτικό ζωμό TSB<sub>y.e</sub> (60 °C) που περιείχε 0.50 %, 5.00 % και 10.00 % (w/v) NaCl. Αυτό πραγματοποιήθηκε δοκιμάζοντας τη θερμοανθεκτικότητα των ωσμωτικά προσαρμοσμένων και κανονικών κυττάρων (ελέγχου), έπειτα και από τις εναλλαγές σε υψηλότερες (upshift) ή χαμηλότερες (downshift) συγκεντρώσεις άλατος από το μέσο αύξησης τους.

Τα μικροβιακά στελέχη αναπτύχθηκαν όπως περιεγράφηκε στο 3.2.2. Στη συνέχεια, λαμβάνονταν δείγμα 0.5 mL και προθέτονταν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer flask των 50 mL, που περιείχαν προ θερμασμένο TSB<sub>y.e.</sub> (50 mL) στους 60 °C με συγκεντρώσεις άλατος 0.50 %, 5.00 % και 10.00 % (w/v) και πραγματοποιούνταν θερμική αδρανοποίηση των κυττάρων για 20 λεπτά.

Οι κωνικές φιάλες που περιείχαν το υγρό θρεπτικό ήταν σταθερά τοποθετημένες και βυθισμένες, εντός του θερμομονωμένου υδατόλουτρου, όπου το νερό θερμαίνονταν στους 60 °C με τη χρήση ενός θερμοστάτη ακριβείας 1500 W, με κυκλοφορητή (Buffalo DM868, China). Η θερμοκρασία του υλικού εντός της κωνικής φιάλης, μετρούνταν στο γεωμετρικό κέντρο του υγρού με τη χρήση αποστειρωμένου μεταλλικού καθετήρα ενός ηλεκτρονικού θερμόμετρου (Electronic Digital Food Thermometer, H-010, HIDANCE, China). Δείγμα 1 mL λαμβάνονταν κάθε 30 δευτ. για τα πρώτα 3 λεπτά ενώ τα επόμενα δείγματα λαμβάνονταν, έπειτα από 3, 6, 9, 12,



16 και 20 λεπτά και τοποθετούνταν σε MRD με θερμοκρασία μικρότερη από 20 °C, για την άμεση διακοπή της θερμικής καταπόνησης στα κύτταρα.

#### **4.2.2. Έλεγχος ανθεκτικότητας θερμικώς καταπονημένων και ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων, στην αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών**

Για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης του υγρού καπνού έναντι του *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκαν τα δύο αποτελεσματικότερα συμπυκνώματα (L9 & G6), όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα του Κεφαλαίου 3. Ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα του παθογόνου που υποβλήθηκαν σε θερμική καταπόνηση, επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των υγρών καπνών με την τεχνική των αραιώσεων σε άγαρ (agar dilution technique), όπως περιγράφεται από τους Davidson & Parish (1989). Συγκεκριμένα, έγινε επίστρωσή τους σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα TSAy.e. στο οποίο είχαν ενσωματωθεί οι κατάλληλες συγκεντρώσεις υγρού καπνού. Οι συγκεντρώσεις των συμπυκνωμάτων καπνού που ενσωματώθηκαν στο TSAy.e. κυμαίνονταν από 0.25 % έως 1.00 % (v/v) με 0.25 % προσαύξηση κάθε φορά, ενώ για τα δείγματα ελέγχου (control), έγινε επίστρωση των δειγμάτων σε τρυβλία TSAy.e. χωρίς προσθήκη συμπυκνωμάτων καπνού.

Πριν την επίστρωση, τα κύτταρα συλλέχθηκαν σταματώντας απότομα τη θερμική επεξεργασία στους 60 °C σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία. Αυτό πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας όλη την ποσότητα των 50 mL TSBBy.e. που περιείχε η κωνική φιάλη (βλέπε 4.2.1) μαζί με το ενοφθάλμισμα των κυττάρων, μέσα σε μία αποστειρωμένη σακούλα τύπου Stomacher (BagLight PolySilk, Interscience, Saint Nom, France) που περιείχε 100 mL σαλίνης. Η θερμοκρασία της σαλίνης ήταν στους 20 °C για την άμεση μείωση της θερμοκρασίας του δείγματος κάτω από τους 40 °C. Η συνολική ποσότητα μοιράστηκε σε 3 falcon των 50 mL και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα

6770 ×g για 10 λεπτά. Κατόπιν έγινε ξέπλυμα και επαναδιαλυτοποίηση του pellet σε αλατόνερο ίδιας συγκέντρωσης άλατος, με του υγρού στο οποίο γίνονταν η θερμική επεξεργασία των κυττάρων σε κάθε περίπτωση (π.χ. TSB<sub>y</sub>.e. με 10 % NaCl).

Τα χρονικά σημεία όπου κόβονταν κάθε φορά η θερμική επεξεργασία, επιλέχθηκαν λαμβάνοντας υπόψιν από τα αποτελέσματα, τον αριθμό των τραυματισμένων κυττάρων να είναι ίδιος και στα δύο επιλεκτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν (PALCAM και TSA<sub>y</sub>.e + NaCl 5.00 %). Στο επιθυμητό χρονικό σημείο έπρεπε να παρουσιάζεται μια διαφορά τουλάχιστον ενός 1.00 log CFU/mL μεταξύ του πληθυσμού των κυττάρων έπειτα από απαρίθμηση, σε υλικό γενικής χρήσης και επιλεκτικό, ώστε το 90.00 % των επιζώντων κυττάρων να είναι τραυματισμένα. Συγκεκριμένα, τόσο τα ωσμωτικά καταπονημένα κύτταρα σε 10.00 % (w/v) NaCl, όσο και αυτά χωρίς ωσμωτική καταπόνηση συλλέχθηκαν μετά από 2.5 λεπτά θερμικής επεξεργασίας.

#### **4.2.3. Απαρίθμηση και υπολογισμός τραυματισμένων κυττάρων**

Για τα δείγματα που υπέστησαν θερμική καταπόνηση, 1 mL λαμβάνονταν και τοποθετούνταν σε MRD κάθε 30 δευτ. για τα πρώτα 3 λεπτά, ενώ τα επόμενα δείγματα λαμβάνονταν έπειτα από 3, 6, 9, 12, 16 και 20 λεπτά αντίστοιχα. Στη συνέχεια ακολούθησε απαρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού και έλεγχος των τραυματισμένων κυττάρων, όπως περιγράφεται στο 2.2.2.

#### **4.2.4. Στατιστική Ανάλυση**

Όλα τα δείγματα λαμβάνονταν εις τριπλούν, με 2 επαναλήψεις το καθένα (n=3x2=6). Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί σε μέσου όρους, οι οποίοι υπολογίστηκαν με τη χρήση του Excel Microsoft® Office 365 (ver. 16.18). Οι τιμές D (ο χρόνος που απαιτείται

για να ελαττωθεί ο πληθυσμός ενός μικροοργανισμού κατά ένα λογαριθμικό κύκλο ή κατά 90 %) υπολογίστηκαν από την γραμμική συσχέτιση του πληθυσμού των επιζώντων κυττάρων (log) σε σχέση με τον χρόνο θέρμανσης. Για να εκτιμηθούν οι διαφορές των κυττάρων που υποβλήθηκαν στα διαφορετικά συμπυκνώματα υγρού καπνού (L9 & G6) και στις συγκεντρώσεις τους πραγματοποιήθηκε ανάλυση διασποράς ως προς έναν παράγοντα (one- way ANOVA) και ο έλεγχος Tukey (Tukey post hoc test) για τη σύγκριση των δεδομένων με τη χρήση του λογισμικού IBM SPSS® statistics 19 για Windows (SPSS Inc., U.S.). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 5.0 % και οι τιμές με  $P < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές.

### 4.3. Αποτελέσματα

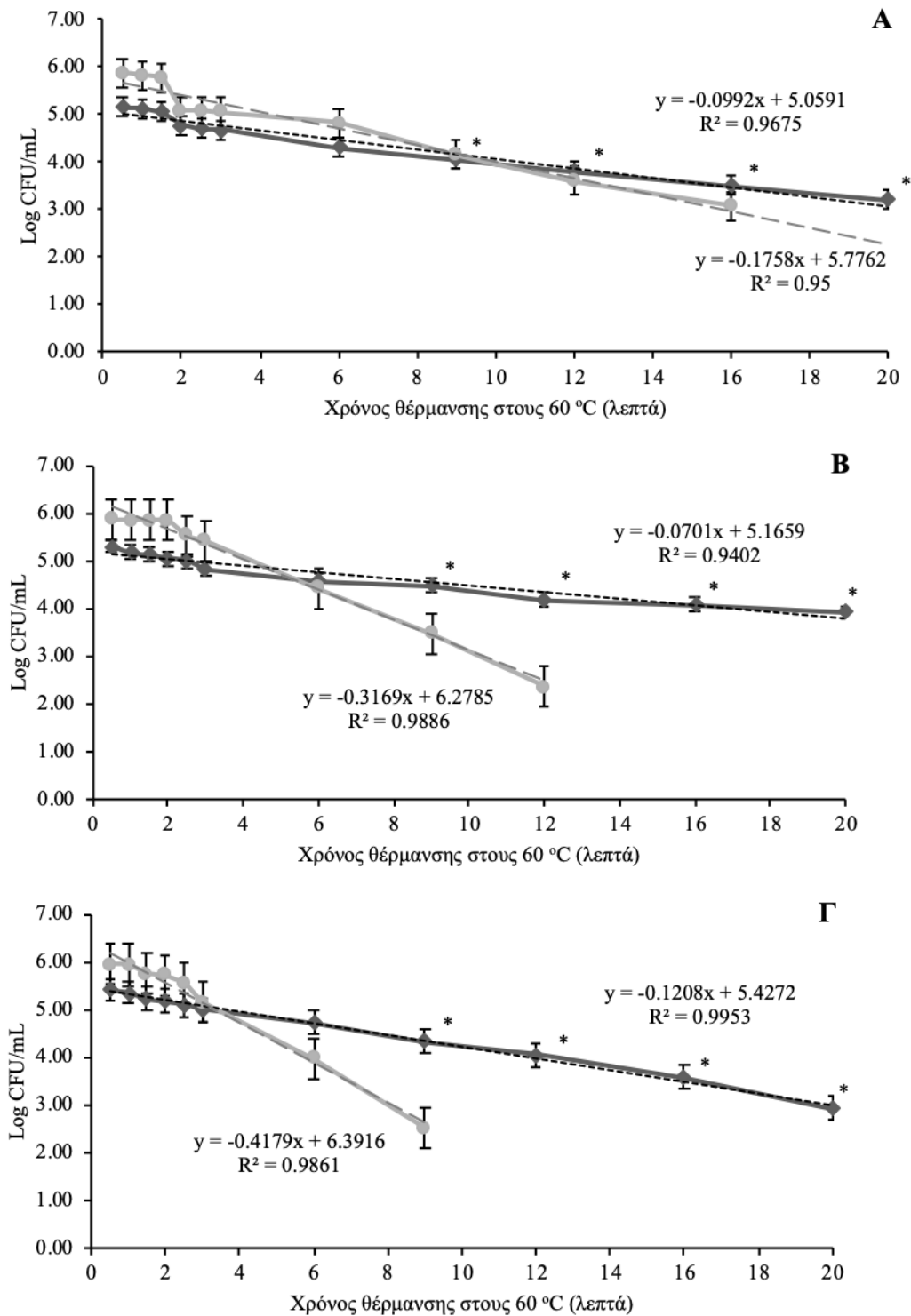
#### 4.3.1. Επίδραση της ωσμωτικής καταπόνησης στη θερμοανθεκτικότητα του *L. monocytogenes*

Στο Σχήμα 4.1, παρουσιάζεται η μείωση του πληθυσμού του *L. monocytogenes*, κατά τη θερμική καταπόνηση στους 60 °C. Ο αρχικός πληθυσμός των ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* ήταν 5.60 log CFU/mL και των κανονικών κυττάρων (ελέγχου) 6.00 log CFU/mL. Έπειτα από 3 λεπτά θερμικής καταπόνησης, τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα του *L. monocytogenes* παρουσίασαν μικρή μείωση στον πληθυσμό τους χωρίς να διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους και έφτασαν τους 4.68, 4.83 και 4.99 log CFU/mL, στο προ θερμοασμένο μέσο (TSBy.e.) που περιείχε 0.50 %, 5.00 % και 10.00 % αλάτι, αντίστοιχα (Σχ. 4.1 A, B & Γ). Τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα του παθογόνου μετά από 20 λεπτά θέρμανσης στους 60 °C παρέμειναν στους 3.19 log CFU/mL στο TSBy.e. 0.50 %, στους 3.91 log CFU/mL στο TSBy.e. 5.00 % και στους 2.93 log CFU/mL στο TSBy.e. 10.00 % (w/v) NaCl, παρουσιάζοντας υψηλή θερμοανθεκτικότητα (Σχ. 4.1 A, B & Γ). Όπως προκύπτει η ωσμωτική καταπόνηση των κυττάρων του *L. monocytogenes* είχε ένα προφανές προστατευτικό αποτέλεσμα έναντι της θέρμανσης στους 60 °C.

Όσον αφορά τη συμπεριφορά των κανονικών κυττάρων (ελέγχου), αυτή ήταν τελείως διαφορετική. Ο πληθυσμός των κανονικών κυττάρων (ελέγχου) έπειτα από 3 λεπτά στους 60 °C, σε TSBy.e. 0.50 %, 5.00 % και 10.00 % (w/v) NaCl, έφτασε σε log CFU/mL τα 5.04, 5.42 και 5.15, αντίστοιχα ( $P > 0.05$ ; Σχ. 4.1 A, B & Γ) χωρίς να φαίνεται να επηρεάζονται από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος στο TSBy.e. Αμέσως μετά παρατηρήθηκε ταχεία μείωση, όπου στο TSBy.e. με την υψηλότερη συγκέντρωση άλατος (10.00 %, w/v) έπειτα από 12 λεπτά ο πληθυσμός των

κανονικών κυττάρων του *L. monocytogenes* βρίσκονταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Στο TSB<sub>y.e.</sub> με 5.00 % και 0.50 % (w/v) NaCl ο πληθυσμός των κανονικών κυττάρων έφτασε κάτω από το όριο ανίχνευσης στο 16<sup>ο</sup> και 20<sup>ο</sup> λεπτό, αντίστοιχα (< 2.00 log CFU/mL; Σχ. 4.1 Α, Β & Γ). Όπως έγινε φανερό η ανθεκτικότητα των κυττάρων του παθογόνου μειώνονταν καθώς αυξάνονταν η συγκέντρωση άλατος στο υγρό μέσο θέρμανσης.

Ειδικότερα, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.1, τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα ακόμη και μετά από το επιπρόσθετο ωσμωτικό σοκ με την υποβολή τους σε προ θερμασμένο μέσο με χαμηλότερη αλατότητα παρουσίασαν πολύ υψηλότερη αντοχή έναντι της θερμικής καταπόνησης στους 60 °C, συγκριτικά με τα κανονικά κύτταρα ελέγχου. Ο χρόνος δεκαδικής μείωσης ( $D_{60\text{°C}}$ ) των κανονικών κυττάρων μειώνονταν καθώς αυξάνονταν η αλατότητα του προ θερμασμένου μέσου (Πίν. 4.1). Από την άλλη πλευρά, στα ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα του *L. monocytogenes* η μεγαλύτερη τιμή  $D_{60\text{°C}}$  ίση με  $14.27 \pm 1.66$  λεπτά ( $P < 0.005$ ), καταγράφηκε στο μέσο που περιείχε 5.00 % (w/v) NaCl, δείχνοντας πως η υψηλή συγκέντρωση άλατος (10.00 %) ακόμη και σε προσαρμοσμένα κύτταρα μπορεί να οδηγήσει στην ταχύτερη θανάτωση τους. Αυτό, επαληθεύεται και από το γεγονός ότι ακόμη και μετά από μεγάλο ωσμωτικό σοκ των προσαρμοσμένων ωσμωτικά κυττάρων που υποβλήθηκαν σε προ θερμασμένο μέσο με 0.50 % (w/v, NaCl) η τιμή  $D_{60\text{°C}}$  ήταν μικρότερη και ίση με  $10.08 \pm 1.41$  λεπτά ( $P < 0.02$ ; Πίν. 4.1).



**Σχήμα 4.1.** Θερμική αδρανοποίηση κυττάρων του *L. monocytogenes*, κανονικών (γκρι διακεκομμένη γραμμή) και ωσμωτικά προσαρμοσμένων (μαύρη διακεκομμένη γραμμή), στους 60 °C, σε TSB<sub>y</sub>.e. (A) με 0.50 %, (B) με 5.00 % και (Γ) με 10.00 % (w/v) NaCl. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6). Το επίπεδο σημαντικότητας των δειγμάτων σε σχέση με τα κανονικά κύτταρα (ελέγχου) επισημαίνεται με \* (P < 0.05).

**Πίνακας 4.1.** Δεκαδικοί χρόνοι μείωσης (τιμές D) των ωσμωτικά προσαρμοσμένων και κανονικών κυττάρων *L. monocytogenes*, έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 60 °C σε TSB<sub>y.e.</sub> με διάφορες συγκεντρώσεις NaCl.

NaCl (%)			
Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης	Προ θερμασμένο μέσο	D τιμές (min) <sup>a</sup>	Επίπεδο
			σημαντικότητας
0.5	0.5	5.69 ± 1.44	< 0.02
	5	3.16 ± 0.38	< 0.005
	10	2.43 ± 0.76	< 0.01
10	0.5	10.08 ± 1.41	< 0.02
	5	14.27 ± 1.66	< 0.005
	10	8.28 ± 1.89	< 0.01

<sup>a</sup> Οι τιμές D που παρουσιάζονται, είναι ο μέσος όρος ± τυπ. απόκλιση 3 επαναλήψεων, 2 ανεξάρτητων πειραμάτων (n = 6).

#### 4.3.2. Υπολογισμός τραυματισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* κατά τη θερμική καταπόνηση στους 60 °C

Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στη συνέχεια, στο Σχήμα 4.2 (Α, Β & Γ), εμφανίζουν τα κύτταρα του *L. monocytogenes* που απαριθμήθηκαν έπειτα από επίστρωση σε τρυβλία που περιείχαν PALCAM άγαρ ή TSA<sub>y.e.</sub> με 5.00 % NaCl, ως ένα άλλο επιλεκτικό θρεπτικό μέσο.

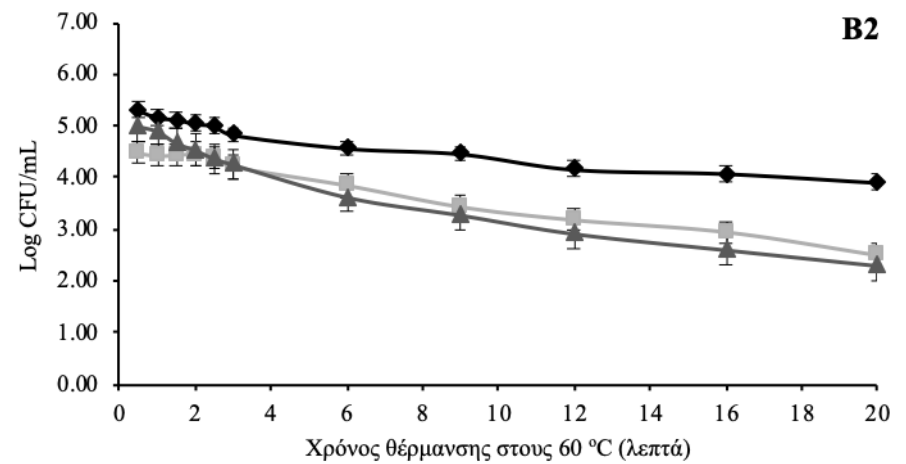
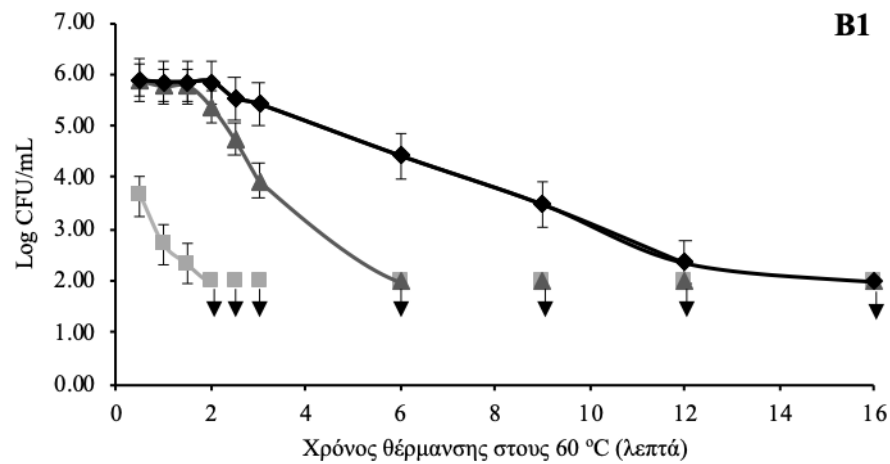
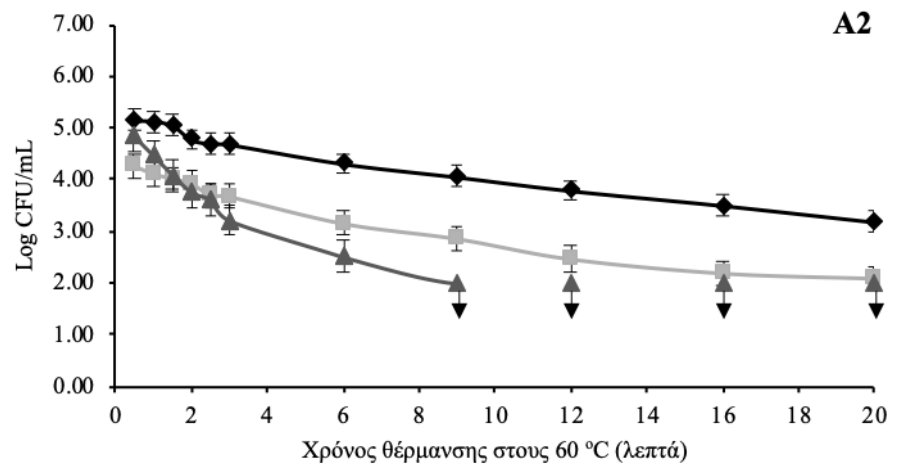
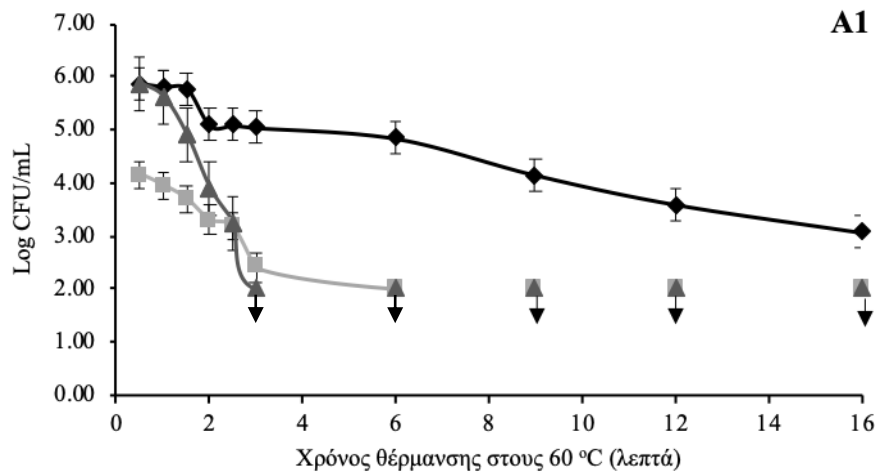
Ο πληθυσμός όλων των κυττάρων του *L. monocytogenes* που απαριθμήθηκαν σε TSA<sub>y.e.</sub> ήταν υψηλότερος από τον αντίστοιχο στα επιλεκτικά υλικά σε όλες τις περιπτώσεις και η διαφορά αυξάνονταν καθώς αυξάνονταν και ο χρόνος έκθεσης των κυττάρων στη θερμική καταπόνηση (60 °C), εμφανίζοντας πως όλο και μεγαλύτερο ποσοστό των επιζώντων είχαν υποστεί υποθανάτιο στρες. Τα αποτελέσματα από την επίδραση της θερμοκρασίας στον τραυματισμό των κανονικών κυττάρων ήταν άμεσα εμφανή στο PALCAM. Τα κανονικά κύτταρα (ελέγχου) που υποβλήθηκαν στο προ

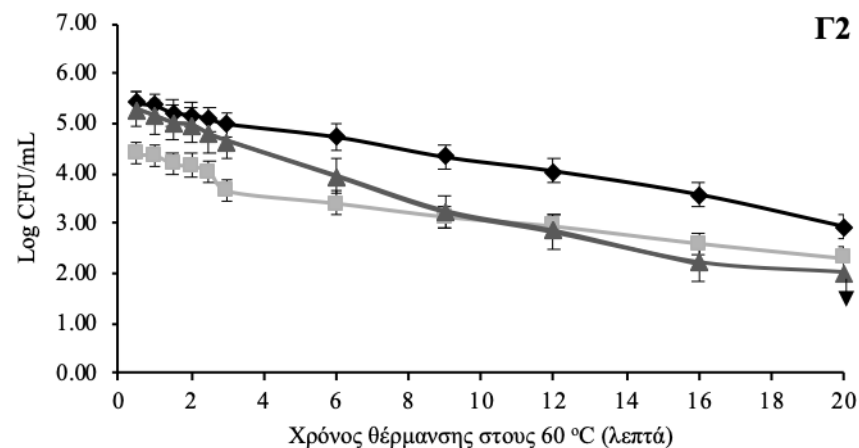
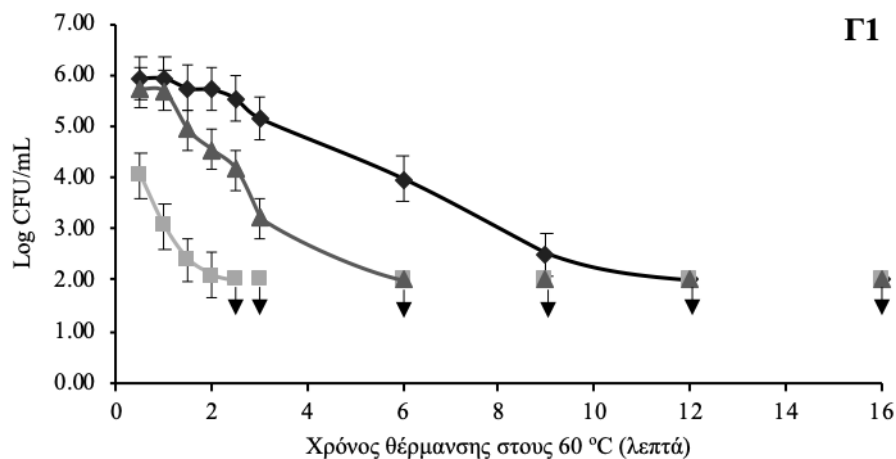
θερμασμένο μέσο με συγκεντρώσεις άλατος 0.50 %, 5.00 % και 10.00 % (w/v), έπειτα από 30 δευτ. και απαρίθμηση σε PALCAM άγαρ, μειώθηκαν και έφτασαν σε πληθυσμό τους 4.16, 3.66 και 4.04 log CFU/mL, ενώ στο TSAy.e. ήταν 5.88, 5.87 και 5.94 log CFU/mL, αντίστοιχα (Σχ. 4.2 A1, B1 & Γ1). Στα τρυβλία TSAy.e. με ή χωρίς 5.00 % NaCl, μετά από 2 λεπτά ο αριθμός των κανονικών κυττάρων του παθογόνου, παρέμεινε υψηλότερος σε σχέση με αυτά που απαριθμήθηκαν στο PALCAM, δείχνοντας μία πιθανή ευαισθησία των κυττάρων του *L. monocytogenes* στις ουσίες που περιέχονται στο PALCAM άγαρ. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για τα ωσμωτικά καταπονημένα κύτταρα. Τελικά, 6 λεπτά θερμικής επεξεργασίας ήταν αρκετά για να οδηγήσουν τον πληθυσμό των κανονικών κυττάρων του *L. monocytogenes* που απαριθμήθηκαν στα επιλεκτικά υλικά, σε ραγδαία μείωση και σε επίπεδα κάτω από το όριο ανίχνευσης (< 2.00 log CFU/mL; Σχ. 4.2 A1, B1 & Γ1). Ωστόσο, ο πληθυσμός τους στο TSAy.e. την ίδια χρονική στιγμή ήταν 4.84, 4.42 και 3.97, σε TSBY.e. με 0.50 %, 5.00 % και 10.00 % (w/v) NaCl, αντίστοιχα (Σχ. 4.2 A1, B1 & Γ1).

Για τα κύτταρα του *L. monocytogenes* που είχαν υποστεί ωσμωτικό στρες (10.00 % NaCl) πριν τη θερμική επεξεργασία (60 °C) διαπιστώθηκαν μικρότερα επίπεδα τραυματισμού. Ο πληθυσμός των ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων, έπειτα από 30 δευτ. παραμονής σε TSBY.e. 0.50 %, 5.00 % και 10.00 % (w/v) NaCl, και απαρίθμηση σε PALCAM άγαρ, έφτασε σε log CFU/mL τους 4.26, 4.47 και 4.39, συγκριτικά με τους 5.15, 5.31 και 5.41 σε log CFU/mL, αντίστοιχα σε TSAy.e. (Σχ. 4.2 A2, B2 & Γ2). Τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα έπειτα από έκθεση τους σε προ θερμασμένο μέσο (60 °C) με χαμηλή αλατότητα (0.50 %) και απαρίθμηση σε TSAy.e. + 5.00 % NaCl εμφάνισαν υψηλά επίπεδα τραυματισμένων κυττάρων και ο πληθυσμός τους μετά από 6 λεπτά ήταν 2.52 log CFU/mL και εν τέλει μετά τα 9



λεπτά < 2.00 log CFU/mL, ενώ στο TSAy.e. για τους ίδιους χρόνους ήταν 4.31 και 4.06 σε log CFU/mL, αντίστοιχα (Σχ. 4.2 A2). Ο πληθυσμός των ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* ακόμη και μετά από τα 20 λεπτά θερμικής καταπόνησης σε TSB<sub>y</sub>.e. με 0.50 %, 5.00 % και 10.00 % (w/v) NaCl, όταν απαριθμήθηκαν σε PALCAM άγαρ, ήταν 2.10, 2.50 και 2.30 log CFU/mL, αντίστοιχα (Σχ. 4.2 A2, B2 & Γ2). Σε όλες τις περιπτώσεις, ο αριθμός των τραυματισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* που είχαν υποστεί ωσμωτική καταπόνηση, στο τέλος της θερμικής επεξεργασίας ήταν υψηλότερος όταν απαριθμούνταν σε TSAy.e. και σε PALCAM άγαρ, συγκριτικά με το TSAy.e. + 5.00 % NaCl.



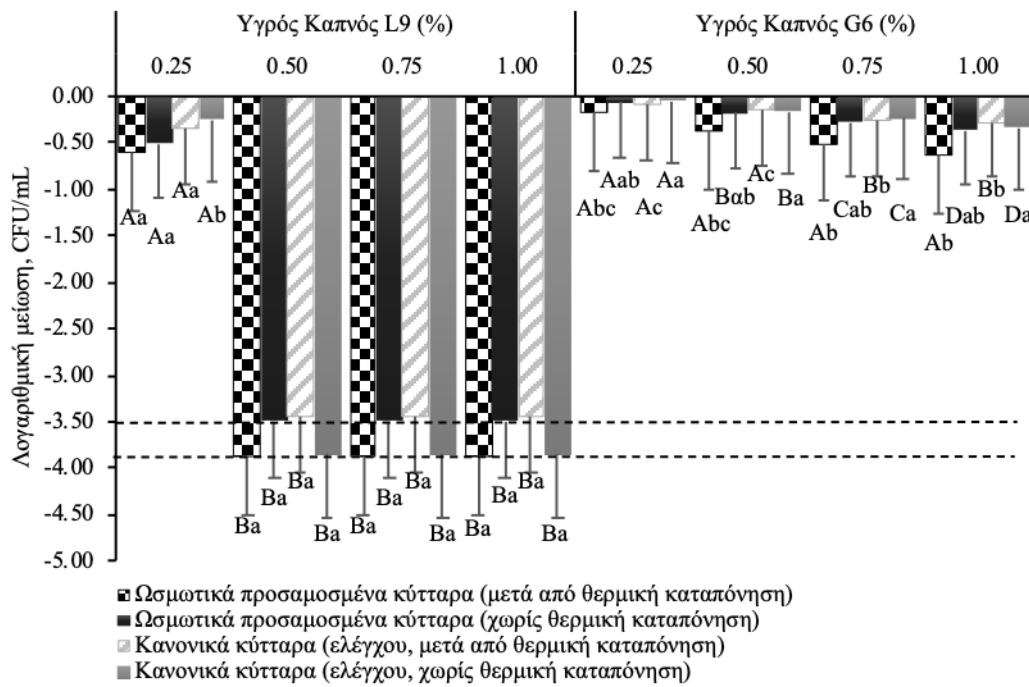


**Σχήμα 4.2.** Πληθυσμός του *L. monocytogenes* μετά από θερμική αδρανοποίηση στους 60 °C, σε TSBy.e. (A) με 0.50 % (B) με 5.00 % και (Γ) με 10.00 % (w/v) NaCl για (1) Κανονικά και (2) Ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα; απαρίθμηση σε (■) PALCAM, (▲) TSAy.e. + NaCl 5.00 % (◆) TSAy.e. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6). Τα κάθετα βέλη (↓) υποδεικνύουν τις τιμές που βρίσκονται κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης (<math>< 2.00 \text{ log CFU/mL}</math>).

#### **4.3.3. Ανθεκτικότητα του *L. monocytogenes*, μετά από θερμική καταπόνηση, στην αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών**

Ο στόχος των πειραμάτων, ήταν η διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης των υγρών καπνών (L9 & G6), έπειτα από διαδοχικές καταπονήσεις των κυττάρων στο ωσμωτικό σοκ και στη θερμική καταπόνηση.

Τη χρονική στιγμή που διακόπηκε η θερμική επεξεργασία (2.5 λεπτά), ο αρχικός πληθυσμός των ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων ήταν 5.15 log CFU/mL στο TSAy.e. και 3.69 και 3.61 log CFU/mL στο PALCAM και το TSAy.e. 5.00 %. Τα κανονικά κύτταρα (ελέγχου) του *L. monocytogenes* μετά από 2.5 λεπτά θερμικής καταπόνησης ήταν 5.88, 3.18 και 3.24 log CFU/mL στο TSAy.e., PALCAM και TSAy.e. 5.00 %, αντίστοιχα. Ο αρχικός πληθυσμός των ωσμωτικά προσαρμοσμένων και των κανονικών κυττάρων του *L. monocytogenes*, χωρίς θερμική καταπόνηση ήταν 5.50 και 5.86 log CFU/mL, αντίστοιχα.



**Σχήμα 4.3.** Λογαριθμική μείωση του *L. monocytogenes*, ωσμωτικά προσαρμοσμένα και μη κύτταρα, μετά από θερμική καταπόνηση στους 60 °C λόγω της έκθεσης στην επιφάνεια τρυβλίων TSAy.e. με συγκεντρώσεις υγρών καπνών (L9 & G6) 0.25 % έως 1.00 % (v/v), σε επαυξήσεις των 0.25 %. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6). Με την οριζόντια διακεκομμένη γραμμή, παρουσιάζεται το όριο ανίχνευσης (2.00 log CFU/mL) του *L. monocytogenes*. Οι τιμές, εντός της ίδιας συγκέντρωσης υγρού καπνού, που συμβολίζονται με ίδιο μικρό γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (P > 0.05). Οι τιμές, μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων για τον εκάστοτε υγρό καπνό (L9 ή G6), που συμβολίζονται με διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα είναι στατιστικώς σημαντικές (P < 0.05).

Όταν τα κύτταρα του *L. monocytogenes* (ωσμωτικά προσαρμοσμένα και κανονικά με ή χωρίς θερμική επεξεργασία) ενοφθαλμίστηκαν στην επιφάνεια των τρυβλίων TSAy.e. χωρίς προσθήκη καπνού δεν παρατηρήθηκε καμία μείωση του πληθυσμού τους. Παρουσία του L9 στη χαμηλότερη συγκέντρωση (0.25 %, v/v) τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα με ή χωρίς θερμική καταπόνηση (0.61 και 0.51 log CFU/mL, αντίστοιχα) και τα κανονικά κύτταρα (0.35 log CFU/mL) μετά από θερμική

καταπόνηση παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση συγκριτικά με τα κανονικά κύτταρα του *L. monocytogenes*, χωρίς θερμική επεξεργασία που ήταν μόλις 0.25 log CFU/mL ( $P < 0.05$ ; Σχ. 4.3). Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του L9 (0.50 %, 0.75 % και 1.00 %, v/v) ο πληθυσμός των κυττάρων του παθογόνου μειώθηκε φτάνοντας κάτω από το όριο ανίχνευσης ( $< 2.00 \log \text{ CFU/mL}$ ). Από την άλλη μεριά η αντιμικροβιακή δράση του δεύτερου μελετώμενου καπνού (G6), ήταν πολύ μικρή με στατιστικά σημαντικές διαφορές για τη μείωση των ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων μετά τη θερμική επεξεργασία σε σχέση με τα κανονικά κύτταρα χωρίς θερμική καταπόνηση σε όλες τις συγκεντρώσεις ( $P < 0.05$ ; Σχ. 4.3). Καθώς αυξάνονταν η συγκέντρωση του G6, στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε μόνο για τον πληθυσμό των κανονικών και ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων (χωρίς θερμική καταπόνηση) του παθογόνου ( $P < 0.05$ ; Σχ. 4.3). Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα για τον L9, παρουσία του G6, για τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα μετά από θερμική αδρανοποίηση, δεν διαπιστώθηκε ευαισθησία στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις του καπνού έως και 1.00 % (v/v).

#### 4.4. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα κατά την υποβολή τους σε θερμική καταπόνηση σε υγρό μέσο με διάφορες συγκεντρώσεις άλατος παρουσίασαν υψηλότερη θερμοανθεκτικότητα από τα κανονικά (μη προσαρμοσμένα). Ομοίως, οι Jorgensen et al. (1995), προσπαθώντας να εξηγήσουν το ίδιο φαινόμενο, συμπέραναν ότι τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα του *L. monocytogenes*, έπειτα από 48 ώρες σε TPB με 9.00 % (w/v) NaCl, εμφάνισαν την υψηλότερη θερμοανθεκτικότητα στους 60 °C. Τα κανονικά κύτταρα ελέγχου κατά τη θερμική καταπόνηση (60 °C) σε προθερμασμένο μέσο με αυξανόμενες τιμές άλατος εμφάνισαν αντιστρόφως μειούμενες τιμές D. Οι Li et al. (2017), παρατήρησαν επίσης, ότι οι χρόνοι δεκαδικής μείωσης του παθογόνου διαφέρουν ανάλογα με τη συγκέντρωση άλατος στο υλικό που βρίσκονται, αφού εμβολίασαν το βακτήριο στην επιφάνεια σολομού με συγκεντρώσεις άλατος από 0.0 % – 4.5 % και το υπέβαλαν σε θερμική επεξεργασία από 57.5 έως 65 °C. Οι τιμές D που αναφέρουν συμφωνούν με τις δικές μας και κυμάνθηκαν από 1.34 έως 5.55, για το στέλεχος F2365 του *L. monocytogenes*, από 1.39 έως 6.77 για το στέλεχος F4260 και από 1.37 έως 5.03 για το V7 στις συγκεντρώσεις NaCl από 0.0 % έως 4.5 % (w/w), αντίστοιχα. Η υψηλότερη θερμοανθεκτικότητα που διαπιστώθηκε από τα αποτελέσματά της παρούσας διδακτορικής διατριβής αλλά και των υπολοίπων ερευνών, μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα του *L. monocytogenes* να προσαρμόζεται, έπειτα από θερμικό ή ωσμωτικό στρες, μέσω τροποποίησης της σύνθεσης των λιπαρών οξέων στην κυτταρική του μεμβράνη αυξάνοντας τα *trans* έναντι των *cis* λιπαρών οξέων (Cronan, 2002). Αυτή η δομική αλλαγή πιστεύεται ότι μειώνει τη ρευστότητα της υγρής φάσης της μεμβράνης που προκαλείται από τη θερμική (Cronan, 2002) ή και

την ωσμωτική καταπόνηση (Russell et al., 1995), προσδίδοντας του αυξημένη ανθεκτικότητα.

Όπως προέκυψε, ο αριθμός των επιζώντων ωσμωτικά προσαρμοσμένων κυττάρων του *L. monocytogenes*, στο τέλος της θερμικής καταπόνησης ήταν υψηλότερος, συγκριτικά με τα κανονικά κύτταρα σε όλες τις μεταχειρίσεις. Ο υψηλός πληθυσμός των ωσμωτικά προσαρμοσμένων επιζώντων κυττάρων του *L. monocytogenes* αντικατοπτρίζει την υψηλή αντοχή του παθογόνου σε υψηλά επίπεδα αλατότητας (Bergholz et al., 2010).

Για να μπορέσουμε να εκτιμήσουμε καλύτερα την αποτελεσματικότητα των εμποδίων που εφαρμόστηκαν, ήταν απαραίτητη προϋπόθεση ο υπολογισμός των τραυματισμένων κυττάρων. Μετά από μία έντονη θερμική καταπόνηση το σύνολο του πληθυσμού του *L. monocytogenes* μπορεί γρήγορα να φτάσει σε μη μετρήσιμα επίπεδα και οι θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 55 °C έως 60 °C είναι ιδανικές για την εύρεση των τραυματισμένων κυττάρων του παθογόνου (El-Shenawy et al., 1989). Από την απαρίθμηση των κυττάρων στα επιλεκτικά υλικά (PALCAM άγαρ και TSAy.e. + 5.00 % NaCl), ο τελικός πληθυσμός των τραυματισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* μετά τη θερμική καταπόνηση (60 °C), φάνηκε να επηρεάζεται από τις απότομες αλλαγές αλατότητας του μέσου θέρμανσης σε σύγκριση με το αρχικό μέσο ανάπτυξης των κυττάρων, προκαλώντας υψηλά επίπεδα τραυματισμού λόγω της καταστροφής της κυτταροπλασματικής μεμβράνης μετά τη θερμική επεξεργασία. Αυτό συνεπάγεται τη διαρροή των ενδοκυτταρικών συστατικών σε ποσοστό ικανό να προξενήσει τη θανάτωση των κυττάρων του *L. monocytogenes* (Ells et al., 2009). Υψηλά επίπεδα τραυματισμένων κυττάρων έως και 100 % διαπίστωσαν και οι Sibanda & Buys (2017), μετά από οξειδωτικό, ωσμωτικό ή θερμικό σοκ σε διάφορα στελέχη του *L. monocytogenes*. Οι Kramer & Thielmann, (2016) διαπίστωσαν πως



εκτός από την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, το θερμικό στρες επηρεάζει αρκετούς άλλους κυτταρικούς στόχους όπως τα ένζυμα, το RNA και το DNA. Τα παραπάνω, υποδεικνύουν για ακόμη μια φορά τη δυσκολία και τα μειονεκτήματα στις μεθόδους ανίχνευσης υποθανάτια τραυματισμένων κυττάρων, καθώς συνεπάγεται πιθανότητα υπερεκτίμησης των τραυματισμένων (injured) και υποεκτίμησης των υγιών κυττάρων (Van Nevel et al., 2017).

Επίσης, η μεγάλη διαφορά στον πληθυσμό των τραυματισμένων κυττάρων που παρατηρήθηκε μετά την απαρίθμηση των κανονικών κυρίως κυττάρων του *L. monocytogenes* σε PALCAM άγαρ και TSAy.e. + NaCl 5.00 %, μετά τη θερμική καταπόνηση (60 °C) σε TSBBy.e (0.50 %, 5.00 % και 10.00 %, w/v, NaCl) μπορεί να εξηγείται από την ικανότητα του παθογόνου να μεταβολίζει διαφορετικές πηγές άνθρακα που περιέχονται στα υλικά ανάπτυξης, επηρεάζοντας την επιβίωσή του. Τα κύτταρα του *L. monocytogenes* αναπτύχθηκαν σε TSBBy.e. (παρούσα μελέτη) που περιέχει 2.5 g/L δεξτρόζη (dextrose) ως κύρια πηγή άνθρακα και μετά το θερμικό σοκ απαριθμήθηκαν σε PALCAM άγαρ που περιέχει 0.5 g/L γλυκόζη (glucose) και σε TSAy.e., ένα υλικό γενικής χρήσης πλούσιο σε μίγματα πρωτεϊνικών σύμπλοκων (πεπτόνη, τρυπτόνη) και ανόργανα άλατα. Μελέτες που διερευνούν την επίδραση του μεταβολισμού της γλυκόζης στη μεταγραφή γονιδίων έχουν δείξει ότι αναστέλλουν την δραστηριότητα του PrfA, κύριο ρυθμιστή της λοιμοξιογόνου δράσης του *L. monocytogenes* (Behari & Youngman, 1998) επηρεάζοντας την ικανότητα του παθογόνου να επιβιώνει των καταπονήσεων που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των τροφίμων (Tapia et al., 2020) λόγω εξασθένισης από την ανάπτυξη του στη γλυκόζη (Eylert et al., 2008).

Για την κατανόηση της συμπεριφοράς του *L. monocytogenes* στην επιφάνεια των καπνιστών αλιευτικών προϊόντων κατά το στάδιο της κάπνισης, είναι απαραίτητη

προϋπόθεση η διεξαγωγή τέτοιου είδους πειραμάτων πρόκλησης (challenge experiments) των κυττάρων του παθογόνου (Sabanadesan et al., 2000). Η αποτελεσματικότητα των συμπυκνωμάτων υγρών καπνών μπορεί να ενισχυθεί από τη συνδυαστική τους δράση με επιπρόσθετα εμπόδια (Suñen, 1998), καθώς η ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων του παθογόνου σε διαφορετικούς παράγοντες στρες απαιτεί αυξημένη κατανάλωση ενέργειας και οδηγεί το μικροοργανισμό στον κυτταρικό θάνατο μέσω της μεταβολικής εξάντλησης και της διαταραγμένης ομοιόστασης (Leistner, 2000). Στη δική μας περίπτωση προηγούμενη ωσμωτική προσαρμογή των κυττάρων του *L. monocytogenes* σε 10.00 % (w/v) NaCl, δεν φάνηκε να επηρεάζει την ευαισθησία τους έναντι των συμπυκνωμάτων L9 ή G6, που περιείχαν μικρή συγκέντρωση φαινολικών ουσιών (0 - 2 g/L), συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου (με ή χωρίς θερμική καταπόνηση) σε αντίθεση με τους Holley & Patel (2005), που διαπίστωσαν ότι η προσθήκη άλατος σε συνδυασμό με τις φαινολικές ενώσεις είχε αυξημένη αλλά όχι συνεργιστική βακτηριοστατική δράση έναντι του *L. monocytogenes*. Από την άλλη, οι Suñen et al. (2003), παρατήρησαν πως η προσθήκη υγρού καπνού στην επιφάνεια των ψαριών που περιείχαν ήδη αλάτι, οδήγησε σε συνεργιστική ανασταλτική δράση κατά του *L. monocytogenes* και *A. hydrophila*. Οι Sabanadesan et al. (2000), προσομοιάζοντας τις πραγματικές συνθήκες κάπνισης χρησιμοποιώντας υγρό καπνό, βρήκαν ότι ο πληθυσμός του *L. innocua*, με τον οποίο είχαν ενοφθαλμίσει τα φιλέτα σολομού, έπειτα από 4 ώρες ψυχρής κάπνισης (20 °C) μειώθηκε κατά 1.50 log CFU/g, ενώ μετά από 12 ώρες η μείωση ήταν 3.00 log CFU/g.

Συμπερασματικά, αποδείχθηκε ότι η ωσμωτική προσαρμογή των κυττάρων του *L. monocytogenes* σε συγκέντρωση άλατος 10.00 % (w/v) μπορεί να του προσδώσει ανθεκτικότητα έναντι των επακόλουθων καταπονήσεων που εμφανίζονται κατά την

παραγωγική διαδικασία των φιλέτων καπνιστής πέστροφας, όπως η θέρμανση αλλά όχι και η επίδραση των αντιμικροβιακών ουσιών των υγρών καπνών. Πράγματι, τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα του παθογόνου, εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη θερμοανθεκτικότητα συγκριτικά με τα κανονικά κύτταρα. Ακόμη, η εφαρμογή μικρής συγκέντρωσης συμπυκνωμάτων υγρών καπνών με καλή αντιμικροβιακή δράση, ήταν καθοριστική στην εξάλειψη του πληθυσμού του παθογόνου *L. monocytogenes*, χωρίς ωστόσο να διαπιστωθεί διαφορετική ευαισθησία στα καταπονημένα από ωσμωτικό ή/και θερμικό σοκ κύτταρα.

## Κεφάλαιο 5. Συμπεριφορά και απόκριση των κυττάρων του *L. monocytogenes* προερχόμενα από βιοϋμένια κατά τη θερμική καταπόνηση στους 60 °C

### 5.1. Εισαγωγή

Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα προσκολλημένα κύτταρα των βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* είναι ανθεκτικότερα (Aarnisalo et al., 2000; Chavant et al., 2004; Pan et al., 2006), συγκριτικά με τα πλαγκτονικά στα διάφορα καθαριστικά και απολυμαντικά και τις άλλες αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιούνται και για την επεξεργασία των τροφίμων, όπως είναι τα συμπυκνώματα υγρών καπνών (Norwood & Gilmour, 2000; Berrang et al., 2010; Simões et al., 2010; Zhao et al., 2013). Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται ο κίνδυνος διασταυρούμενης επιμόλυνσης των προϊόντων με συνέπεια την παρουσία κυττάρων βιοϋμενίων στα τρόφιμα μέσω της γραμμής παραγωγής και επεξεργασίας (Lunden et al., 2000; Møretro & Langsrud, 2004).

Η έκθεση του *L. monocytogenes* σε διάφορες φυσικές (θέρμανση) και χημικές (διάφορα οξέα, άλατα, αντιμικροβιακές ουσίες κ.ά.) καταπονήσεις (Yousef & Courtney, 2003), είναι συχνή σε βιομηχανικό περιβάλλον. Η θερμική αντοχή του *L. monocytogenes*, έχει μελετηθεί εκτενώς και τα αποτελέσματα των ερευνών δείχνουν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των τιμών δεκαδικής μείωσης (D-values) για διαφορετικές θερμικές καταπονήσεις και από στέλεχος σε στέλεχος (Mazzotta & Gombas, 2001; Borucki, 2003; Harvey et al., 2007). Επιπρόσθετα, για τη θερμική αδρανοποίηση του *L. monocytogenes*, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη πολλά κριτήρια, όπως το μέσο θέρμανσης, ο τρόπος ανάπτυξης των κυττάρων (πλαγκτονικά,

βιοϋμένια; Poimenidou et al., 2009) αλλά και οι ιδιότητες (φάση ανάπτυξης, ιστορικό, θερμική αντοχή κ.α.) του ίδιου του βακτηρίου (Doyle et al., 2001; Silk et al., 2002). Ωστόσο, υπάρχει λιγοστή πληροφόρηση για τις θερμοκρασίες που απαιτούνται για την εξάλειψη των βιοϋμενίων του παθογόνου (Chmielewski & Frank, 2004).

Σκοπός του κεφαλαίου ήταν η προσομοίωση των πραγματικών συνθηκών επιμόλυνσης των αλιευτικών προϊόντων (όπως φιλέτα καπνιστής πέστροφας), στους χώρους επεξεργασίας τους (επιφάνειες, εξοπλισμός κ.ά.), από κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*. Συγκεκριμένα, έγινε εκτίμηση της συμπεριφοράς και απόκρισης των κυττάρων (βιοϋμενίων) του παθογόνου (1) κατά τη θερμική καταπόνηση στους 60 °C, και (2) έλεγχος της ανθεκτικότητας των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, έπειτα από τη θερμική καταπόνηση, στην αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών.

## **5.2. Υλικά και μέθοδοι**

### **5.2.1. Προετοιμασία και σχηματισμός βιοϋμενίων του *L. monocytogenes***

Βλέπε 3.2.1.

### **5.2.2. Έλεγχος σχηματισμού βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* στις μεταλλικές επιφάνειες, παρουσία ή όχι συμπυκνωμάτων υγρού καπνού**

Μετά τον προσδιορισμό της MIC για όλους τους υγρούς καπνούς (βλέπε Κεφ. 3), για τη συνέχεια των πειραμάτων επιλέχθηκαν τα συμπυκνώματα L9 και G6 ως πιο αποτελεσματικά σε συγκεντρώσεις 0.50 % και 1.00 % (v/v). Ακολούθως, τα κουπόνια με τα προσκολλημένα κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* (βλέπε 3.2.1.2) λαμβάνονταν και επανατοποθετούνταν (κάθε 2 ημέρες) σε νέους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 6 mL TSB<sub>y.e.</sub> με ή χωρίς υγρό καπνό. Στη συνέχεια, ακολούθησε η ανάπτυξη των κυττάρων βιοϋμενίων, όπως περιγράφεται στο 3.2.1.3.

### **5.2.3. Θερμική αδρανοποίηση των κυττάρων του *L. monocytogenes* προερχόμενα από βιοϋμένια**

Τα κύτταρα που προέρχονταν από καλά σχηματισμένα βιοϋμένια μετά από 8 ημέρες (βλέπε 3.2.1), αποκολλήθηκαν και συλλέχθηκαν από 3 μεταλλικές επιφάνειες (βλέπε 3.2.1.3) για τη συγκέντρωση της απαιτούμενης ποσότητας κυττάρων. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν πλαγκτονικά κύτταρα ελέγχου από φρέσκες υγρές καλλιέργειες (μετά από 24 ώρες στους 37 °C). Κατόπιν, λαμβάνονταν 0.5 mL για κάθε δείγμα χωριστά και προθέτονταν σε 50 mL προ θερμασμένο μέσο TSB<sub>y.e.</sub>, παράλληλα με θέρμανση για 20 λεπτά. Ο έλεγχος της θερμικής αδρανοποίησης των κυττάρων έγινε όπως περιγράφεται στο 4.1.

#### **5.2.4. Απαρίθμηση επιζώντων θερμικώς καταπονημένων πλαγκτονικών και προερχόμενων από βιοϋμένια κυττάρων**

Ο έλεγχος των επιζώντων κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* που υποβλήθηκαν ή μη, σε θερμική καταπόνηση, πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο 4.2.2. Η θερμική επεξεργασία διακόπηκε απότομα και τα κύτταρα που προέρχονταν από βιοϋμένια και πλαγκτονικά κύτταρα (ελέγχου), λήφθηκαν μετά από 1.5 λεπτό θερμικής καταπόνησης.

#### **5.2.5. Απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών**

##### **5.2.5.1. Απαρίθμηση κυττάρων του *L. monocytogenes* προερχόμενα από βιοϋμένια**

Βλέπε 3.2.1.3.

##### **5.2.5.2. Απαρίθμηση και υπολογισμός τραυματισμένων κυττάρων**

Για τα δείγματα που υπέστησαν θερμική καταπόνηση, 1 mL λαμβάνονταν και τοποθετούνταν σε MRD κάθε 30 δευτ. για τα πρώτα 3 λεπτά, ενώ τα επόμενα δείγματα λαμβάνονταν έπειτα από 3, 6, 9, 12, 16 και 20 λεπτά αντίστοιχα. Στη συνέχεια ακολούθησε απαρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού και απαρίθμηση των τραυματισμένων κυττάρων, όπως περιγράφεται στο 2.2.2.

### 5.3. Αποτελέσματα

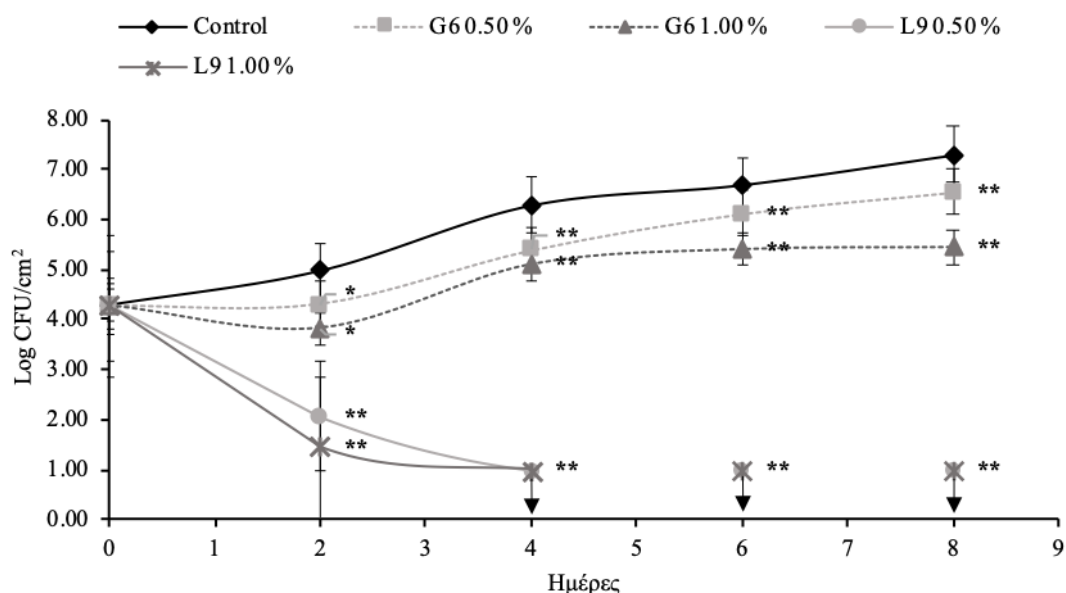
#### 5.3.1. Σχηματισμός κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* παρουσία συμπυκνωμάτων υγρού καπνού

Στο Σχήμα 5.1. παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* σε μεταλλικές πλάκες από ανοξείδωτο χάλυβα εντός θρεπτικού υλικού TSB<sub>y.e.</sub> με ή χωρίς υγρό καπνό L9 και G6, σε συγκεντρώσεις 0.50 % και 1.00 % (v/v).

Ο αρχικός πληθυσμός του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων) στο TSB<sub>y.e.</sub> την πρώτη ημέρα (0) με ή χωρίς υγρό καπνό (L9 & G6) ήταν 4.27 log CFU/cm<sup>2</sup> (Σχ. 5.1). Ο πληθυσμός των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, στο θρεπτικό χωρίς προσθήκη υγρού καπνού, παρουσίασε μια συνεχώς ανοδική τάση και έπειτα από 8 ημέρες επώασης στους 16 °C έφτασε τους 7.29 log CFU/cm<sup>2</sup> (n=6, P < 0.01), όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.1. Ο πληθυσμός των σχηματιζόμενων κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* στο TSB<sub>y.e.</sub> παρουσία 0.50 % (v/v) G6, έφτασε τους 6.55 log CFU/cm<sup>2</sup> μετά από 8 ημέρες, παρουσιάζοντας στατιστικώς σημαντικές διαφορές με τον τελικό πληθυσμό των κυττάρων ελέγχου (χωρίς προσθήκη υγρού καπνού) (P < 0.01; Σχ. 5.1). Ομοίως σε συγκέντρωση 1.00 % (v/v) G6, η ανάπτυξη του παθογόνου μετά από 8 ημέρες επώασης παρεμποδίστηκε από την παρουσία του υγρού καπνού φτάνοντας τελικά τους 5.44 log CFU/cm<sup>2</sup> (Σχ. 5.1). Αντιθέτως, η ανασταλτική δράση και των δύο συγκεντρώσεων του L9 ήταν ολοφάνερη, καθώς δύο ημέρες επώασης ήταν αρκετές για να μειωθεί ο πληθυσμός του *L. monocytogenes* από τους 4.27 log CFU/cm<sup>2</sup> (αρχικός πληθυσμός) σε 2.06 και 1.45 log CFU/cm<sup>2</sup> για τις συγκεντρώσεις 0.50 % και 1.00 %, αντίστοιχα παρουσιάζοντας στατιστικώς σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου για τις ίδιες ημέρες επώασης (P < 0.01; Σχ. 5.1). Τελικά, από την 4<sup>η</sup> ημέρα έως και



την τελευταία ημέρα επώασης (ημέρα 8), ο πληθυσμός για τα δείγματα με συγκεντρώσεις (0.50 % και 1.00 %, v/v) του L9, μειώθηκε και παρέμεινε κάτω από το όριο ανίχνευσης ( $< 1.00 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ ; Σχ. 5.1).



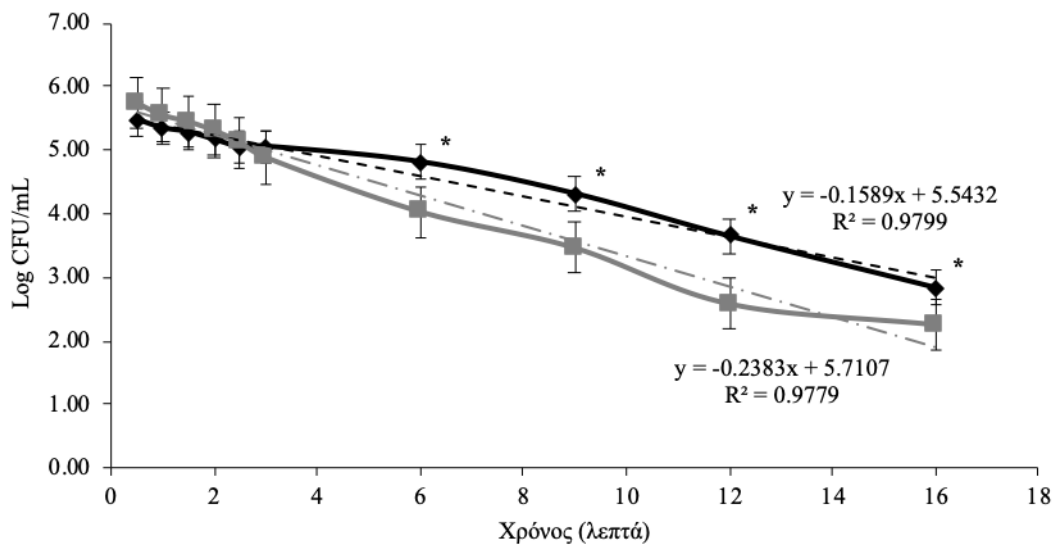
**Σχήμα. 5.1.** Καμπύλες ανάπτυξης του *L. monocytogenes* με ή χωρίς υγρό καπνό L9 και G6, σε συγκεντρώσεις 0.50 % και 1.00 %, έπειτα από επώαση 8 ημερών στους 16 °C σε TSB<sub>y.e</sub> με 0.60 % yeast extract. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν τα κύτταρα βιοϋμενίων που αναπτύχθηκαν παρουσία 0.50 % (v/v) G6 (φωτεινό γκρι) και 1.00 % (v/v) G6 (σκούρο γκρι). Οι συνεχείς γραμμές αντιπροσωπεύουν τα κύτταρα βιοϋμενίων που αναπτύχθηκαν παρουσία 0.50 % (v/v) L9 (φωτεινό γκρι) και 1.00 % (v/v) L9 (σκούρο γκρι). Η συνεχής μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει τα κύτταρα βιοϋμενίων που αναπτύχθηκαν χωρίς παρουσία καπνού. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου (n = 6). Τα κάθετα βέλη (↓) υποδεικνύουν τις τιμές που βρίσκονται κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης ( $< 1.00 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ ). Το επίπεδο σημαντικότητας των δειγμάτων σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου (control) επισημαίνεται με \* (P < 0.05) και \*\* (P < 0.01).

### 5.3.2. Θερμική αδρανοποίηση κυττάρων προερχόμενων από βιοϋμένια του *L. monocytogenes*

Μετά τη μελέτη σχηματισμού τους, κύτταρα βιοϋμενίων (8 ημερών) του *L. monocytogenes* λήφθηκαν για να διερευνήσουμε την συμπεριφορά τους στη θερμική αδρανοποίηση, συγκριτικά με πλαγκτονικά κύτταρα του παθογόνου.

Ο αρχικός πληθυσμός των πλαγκτονικών κυττάρων και των κυττάρων βιοϋμενίων ήταν 5.47 και 5.74 log CFU/mL, αντίστοιχα (Σχ. 5.2). Ειδικότερα, τα πρώτα 2 λεπτά της θερμικής επεξεργασίας τα κύτταρα προερχόμενα από βιοϋμένια και τα πλαγκτονικά, παρουσίασαν σταθερή μικρή μείωση και ο πληθυσμός τους έφτασε σε log CFU/mL τα 5.16 και 5.31, αντίστοιχα (n = 6; Σχ. 5.2). Ωστόσο, μετά από 6 λεπτά θερμικής καταπόνησης στους 60 °C ο πληθυσμός των πλαγκτονικών κυττάρων έφτασε τους 4.03 log CFU/mL και των κυττάρων από βιοϋμένια παρέμεινε αρκετά υψηλός και ίσος με 4.81 log CFU/mL (n = 6; P < 0.01; Σχ. 5.2). Τέλος, μετά τα 9 λεπτά θερμικής επεξεργασίας η θερμοανθεκτικότητα των κυττάρων βιοϋμενίων έγινε ακόμη πιο εμφανής καθώς μετά την απαρίθμηση τους σε τρυβλία με TSAy.e. ο πληθυσμός τους ήταν 4.31 log CFU/mL έναντι 3.46 log CFU/mL των πλαγκτονικών κυττάρων (n = 6; P < 0.01; Σχ. 5.2).

Αυτό δείχνει μια προφανή θερμοανθεκτικότητα των κυττάρων του παθογόνου που προέρχονται από βιοϋμένια, αφού ακόμη και έπειτα από 20 λεπτά θερμικής καταπόνησης ο πληθυσμός τους παρέμεινε πάνω από το επίπεδο ανίχνευσης 2.00 log CFU/mL. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι ο χρόνος δεκαδικής μείωσης ( $D_{60°C}$ ), των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* ήταν 6.29 λεπτά, ενώ για τα πλαγκτονικά κύτταρα ελέγχου ήταν 4.19 λεπτά. Φαίνεται λοιπόν ότι το διαφορετικό ιστορικό ανάπτυξης των κυττάρων (πλαγκτονικά ή βιοϋμενίων) σχετίζεται με την εμφάνιση θερμοανθεκτικότητας.



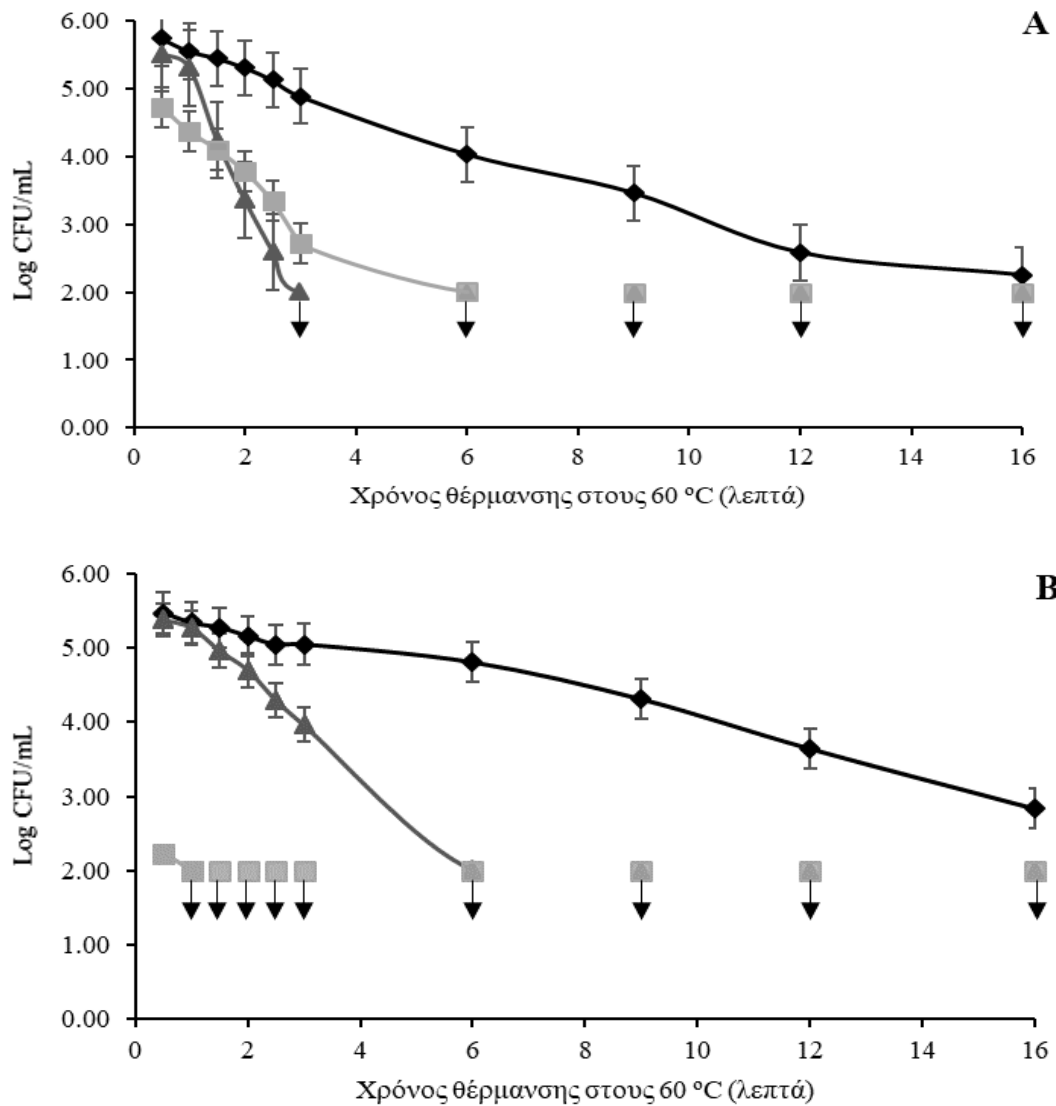
**Σχήμα 5.2.** Θερμική αδρανοποίηση κυττάρων του *L. monocytogenes*, πλαγκτονικά κύτταρα (γκρι διακεκομμένη γραμμή) και κύτταρα βιοϋμενίων (μαύρη διακεκομμένη γραμμή), στους 60 °C, σε TSB<sub>y</sub>.e. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6). Το επίπεδο σημαντικότητας των δειγμάτων σε σχέση με τα πλαγκτονικά κύτταρα (ελέγχου) επισημαίνεται με \* (P < 0.01).

### 5.3.3. Υπολογισμός τραυματισμένων κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* κατά τη θερμική καταπόνηση στους 60 °C

Όπως περιεγράφηκε και για τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα (Κεφ. 4) έτσι και για τα κύτταρα που προήλθαν από βιοϋμένια του *L. monocytogenes*, έγινε απαρίθμηση και υπολογισμός των υποθανάτια τραυματισμένων, έπειτα από επίστρωση σε επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (PALCAM άγαρ & TSA<sub>y</sub>.e. + NaCl 5.00 %) και παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.3.

Τόσο τα πλαγκτονικά κύτταρα όσο και τα κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* παρουσίασαν μία απότομη μείωση στον πληθυσμό που μπορεί να αναπτυχθεί τόσο στο TSA<sub>y</sub>.e. + NaCl 5.00 %, όσο και στο PALCAM άγαρ, καθώς αυξάνονταν ο χρόνος έκθεσης στη θερμική καταπόνηση, με τα πρώτα (πλάγκτονικά) να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα τραυματισμένων κυττάρων. Με εξαίρεση τα κύτταρα βιοϋμενίων, που έδειξαν σταθερή έλλειψη ικανότητας ανάπτυξης στο PALCAM άγαρ μετά τη

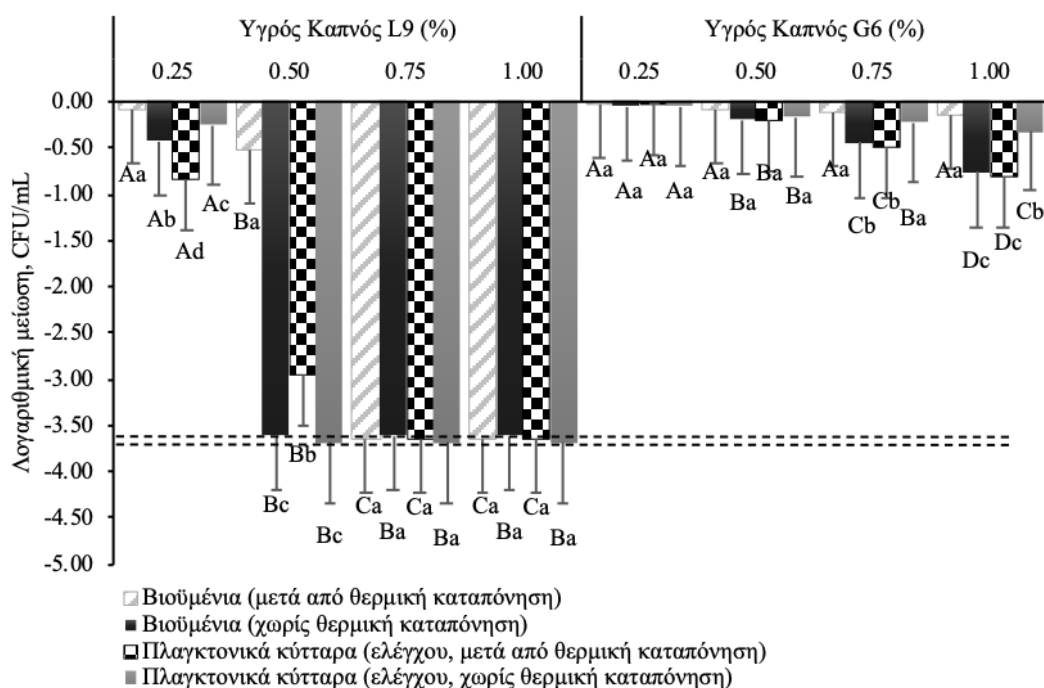
θερμική καταπόνηση. Ωστόσο, τα κύτταρα βιοϋμενών κατά την απαρίθμησή τους στο TSAy.e. + NaCl 5.00 %, εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα τραυματισμένων κυττάρων του πληθυσμού τους από τα πλαγκτονικά. Χρειάστηκαν 3 και 6 λεπτά θερμικής επεξεργασίας, για να φτάσει ο πληθυσμός των πλαγκτονικών κυττάρων και των κυττάρων βιοϋμενίων, αντίστοιχα κάτω από το όριο ανίχνευσης ( $< 2.00 \log \text{CFU/mL}$ ) στο TSAy.e. + NaCl 5.00 %, φανερώνοντας υψηλά επίπεδα τραυματισμού, καθώς στο TSAy.e. ο αντίστοιχος πληθυσμός των επιζώντων κυττάρων ήταν περίπου  $5.00 \log \text{CFU/mL}$  (Σχ. 5.3). Τελικά, μετά από 6 λεπτά ο πληθυσμός όλων των κυττάρων του *L. monocytogenes*, που απαριθμήθηκαν και στα 2 επιλεκτικά θρεπτικά υλικά έφτασε σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, ενώ στο TSAy.e. ήταν 4.81 (βιοϋμένια) και 4.03 (πλαγκτονικά) (Σχ. 5.3).



**Σχήμα 5.3.** Πληθυσμός του *L. monocytogenes* μετά από θερμική αδρανοποίηση στους 60 °C, σε TSB<sub>y</sub>.e. (A) πλαγκτονικά και (B) κύτταρα βιοϋμενίων; απαρίθμηση σε (■) PALCAM, (▲) TSA<sub>y</sub>.e. + NaCl 5.00 % και (◆) TSA<sub>y</sub>.e (επιζώντες). Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6). Τα κάθετα βέλη (↓) υποδεικνύουν τις τιμές που βρίσκονται κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης (< 2.00 log CFU/mL).

#### **5.3.4. Ανθεκτικότητα των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, μετά από θερμική καταπόνηση, στην αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών**

Η θερμική επεξεργασία διακόπηκε στο χρονικό σημείο, όπου τουλάχιστον το 90.00 % των επιζώντων κυττάρων ήταν τραυματισμένα. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα βιοϋμενίων και τα πλαγκτονικά κύτταρα, λήφθηκαν μετά από 1.5 λεπτό θερμικής καταπόνησης. Για τα κύτταρα που προέρχονταν από βιοϋμένια, ο αρχικός πληθυσμός σε TSAy.e ήταν 5.47 log CFU/mL και μετά από 1.5 λεπτό θερμικής καταπόνησης ήταν 4.96 log CFU/mL στο TSAy.e. + 5.00 % NaCl και < 2.00 log CFU/mL στο PALCAM. Τα πλαγκτονικά κύτταρα, είχαν αρχικό πληθυσμό 5.74 log CFU/mL (TSAy.e.) και έπειτα από 1.5 λεπτό θερμικής επεξεργασίας ο πληθυσμός τους έφτασε 4.24 log CFU/mL στο TSAy.e. 5.00 % και < 2.00 log CFU/mL στο PALCAM. Ο αρχικός πληθυσμός των πλαγκτονικών κυττάρων και των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, χωρίς θερμική καταπόνηση ήταν 5.69 και 5.61 log CFU/mL, αντίστοιχα.



**Σχήμα 5.4.** Λογαριθμική μείωση του *L. monocytogenes*, πλαγκτονικά κύτταρα και κύτταρα βιοϋμενίων, μετά από θερμική καταπόνηση στους 60 °C λόγω της έκθεσης στην επιφάνεια τρυβλίων TSAy.e. με συγκεντρώσεις υγρών καπνών (L9 & G6) 0.25 % έως 1.00 % (v/v), σε επαυξησίσεις των 0.25 %. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6). Με την οριζόντια διακεκομμένη γραμμή, παρουσιάζεται το όριο ανίχνευσης (2.00 log CFU/mL) του *L. monocytogenes*. Οι τιμές, εντός της ίδιας συγκέντρωσης υγρού καπνού, που συμβολίζονται με ίδιο μικρό γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (P > 0.05). Οι τιμές, μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων για τον εκάστοτε υγρό καπνό (L9 ή G6), που συμβολίζονται με διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα είναι στατιστικώς σημαντικές (P < 0.05).

Όταν τα κύτταρα του *L. monocytogenes* όλων των μεταχειρίσεων ενοφθαλμίστηκαν στην επιφάνεια των τρυβλίων TSAy.e. χωρίς προσθήκη καπνού δεν παρατηρήθηκε καμία μείωση του πληθυσμού τους. Στη συγκέντρωση 0.25 % (v/v) L9, τα κύτταρα βιοϋμενίων (μετά από θερμική καταπόνηση) παρουσίασαν τη μικρότερη μείωση, μόλις 0.09 log CFU/mL, ενώ τα πλαγκτονικά κύτταρα (ελέγχου) μετά τη θερμική επεξεργασία έδειξαν την μεγαλύτερη ευαισθησία στον καπνό και μειώθηκαν κατά

0.84 log CFU/mL ( $P < 0.05$ ; Σχ. 5.4). Αξιοσημείωτο είναι, ότι τα κύτταρα που προέρχονταν από βιοϋμένια του *L. monocytogenes* μετά από θερμική καταπόνηση, παρουσία 0.50 % (v/v) L9, μειώθηκαν μόλις 0.51 log CFU/mL, δείχνοντας μία φανερή αντοχή στην αντιμικροβιακή δράση του υγρού καπνού ( $P < 0.05$ ; Σχ. 5.4). Ωστόσο, στην ίδια συγκέντρωση (0.50 %) και τα πλαγκτονικά κύτταρα, μετά από θερμική αδρανοποίηση, εμφάνισαν ανθεκτικότητα στον L9 καθώς μειώθηκαν κατά 2.94 log CFU/mL, συγκριτικά με τα υπόλοιπα κύτταρα του παθογόνου, ο πληθυσμός των οποίων εξαλείφθηκε ( $P < 0.05$ ; Σχ. 5.4). Φαίνεται λοιπόν ότι η υποβολή των κυττάρων του *L. monocytogenes* προερχόμενα από βιοϋμένια σε θερμική καταπόνηση, έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι της αντιμικροβιακής δράσης του L9. Για τις συγκεντρώσεις 0.75 % και 1.00 % (v/v) παρατηρήθηκε εξάλειψη του πληθυσμού των υποβληθέντων κυττάρων του *L. monocytogenes* (Σχ. 5.4).

Η αποτελεσματικότητα του υγρού καπνού G6 ήταν πολύ μικρότερη συγκριτικά με τον L9. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν για τη μείωση των πλαγκτονικών κυττάρων μετά από θερμική επεξεργασία και των κυττάρων βιοϋμενίων χωρίς θερμική αδρανοποίηση μεταξύ όλων των συγκεντρώσεων (0.25 % έως 1.00 %) ( $P < 0.05$ ; Σχ. 5.4). Παρουσία του G6 (0.50 % – 1.00 %), τα θερμικώς καταπονημένα κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* παρουσίασαν μικρότερη στατιστικά σημαντική μείωση από τα κύτταρα βιοϋμενίων χωρίς θερμική αδρανοποίηση, επιβεβαιώνοντας την αυξημένη ανθεκτικότητά τους μετά από τη θερμική καταπόνηση (Σχ. 5.4). Χαρακτηριστικά, τα κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* μετά από τη θερμική καταπόνηση, στην υψηλότερη συγκέντρωση (1.00 % v/v, G6) εμφάνισε τη μικρότερη μείωση, 0.14 log CFU/mL ( $P < 0.05$ ; Σχ. 5.4).



#### 5.4. Συζήτηση

Ο σχηματισμός των βιοϋμενίων φάνηκε να επηρεάζεται από την παρουσία των υγρών καπνών. Οι κυριότερες ουσίες που περιέχονται στα συμπυκνώματα καπνού είναι οι φαινόλες και τα καρβονύλια τα οποία, απαντώνται σε όλες τις βιομηχανίες κάπνισης τροφίμων. Είναι γνωστή η αποτελεσματικότητα διαφόρων συμπυκνωμάτων υγρών καπνών έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, όπως το *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* και *Salmonella* σε έτοιμα προς κατανάλωση (RTE) και άλλα τρόφιμα. Παρουσία 0.50 % και 1.00 % (v/v) L9, ο πληθυσμός των σχηματιζόμενων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* μειώθηκε και παρέμεινε κάτω από το όριο ανίχνευσης (< 1.00 log CFU/cm<sup>2</sup>). Παρόμοια μείωση έως 100 % (5.64 log CFU/cm<sup>2</sup>) των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα, έχει αναφερθεί, έπειτα από τη συνδυαστική εφαρμογή αιθέριων ελαίων λεμονόχορτου (*Cymbopogon citratus*) και σιτρονέλας (*Cymbopogon nardus*) (de Oliveira et al., 2010) αλλά και 2.54 log CFU/cm<sup>2</sup> μετά την προσθήκη αιθέριου ελαίου κανέλας (de Oliveira et al., 2012). Τα αιθέρια έλαια όπως και τα συμπυκνώματα καπνών που χρησιμοποιήσαμε θεωρούνται ως γενικά ασφαλή (Generally Regarded as Safe – GRAS) και εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση *in vitro* και *in vivo* (Viuda-Martos et al., 2010), ενώ μπορεί να έχουν συνεργιστική δράση για τον έλεγχο των παθογόνων στα αλιευτικά προϊόντα (Mizan et al., 2015). Τα σχηματιζόμενα βιοϋμένια του *L. monocytogenes* είναι ανθεκτικά στα κοινά απολυμαντικά (Mizan et al., 2015) και λίγες μελέτες έχουν διερευνήσει πως μπορεί να κατασταλεί η ανάπτυξή τους με τη χρήση νέων, εναλλακτικών τεχνικών (Tinh et al., 2008; Guenther et al., 2009; Friedman & Juneja, 2010). Η χρήση εμπορικών συμπυκνωμάτων υγρών καπνών (όπως φάνηκε και από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής) ή και αιθέριων ελαίων ως φυσικά αντιμικροβιακά (de Oliveira et al., 2012), θα μπορούσε να

αποτελέσει μία νέα προσέγγιση για την εξάλειψη ή τον περιορισμό των βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* για τη βιομηχανία αλευτικών προϊόντων.

Οι Chmielewski & Frank (2004), αναφέρουν ότι, τα κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* σε μίγμα 5 στελεχών (ορότυποι 1/2a και 4b) που αναπτύχθηκαν σε μεταλλικές πλάκες ανοξείδωτου χάλυβα, χρειάστηκαν 5 λεπτά για τη θανάτωση τους έναντι 3 λεπτών για τα βιοϋμένια από το στέλεχος Scott A. Στη δική μας περίπτωση, ο χρόνος δεκαδικής μείωσης ( $D_{60\text{°C}}$ ), των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* ήταν 6.29 λεπτά, ενώ για τα πλαγκτονικά κύτταρα ήταν 4.19 λεπτά. Σε συμφωνία με το συμπέρασμα των Frank & Koffi (1990), φαίνεται ότι η κατάσταση των κυττάρων, όπως είναι το διαφορετικό ιστορικό ανάπτυξής τους σχετίζεται με την εμφάνιση θερμοανθεκτικότητας. Η υψηλότερη θερμοανθεκτικότητα των κυττάρων βιοϋμενίων σε σχέση με τα πλαγκτονικά έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (Frank & Koffi 1990), ωστόσο οι ρυθμοί θανάτου διαφέρουν από περίπτωση σε περίπτωση καθώς οι Taormina & Dorsa (2007), αναφέρουν ότι έπειτα από 20 λεπτά θερμικής επεξεργασίας με θερμό νερό στους 60 °C, τα προσκολλημένα κύτταρα του παθογόνου (σε πλάκες από ανοξείδωτο χάλυβα), μειώθηκαν λιγότερο από 1.00 log CFU/cm<sup>2</sup>. Αντιθέτως στη δική μας περίπτωση, έπειτα από 20 λεπτά θερμικής καταπόνησης ο πληθυσμός των κυττάρων βιοϋμενίων μειώθηκε περίπου 3.00 log CFU/mL. Τέτοιου είδους διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων, αντανakλούν τις διακυμάνσεις στη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου, ανάλογα με το στέλεχος που χρησιμοποιούμε αλλά και το διαφορετικό ιστορικό ανάπτυξης (βιοϋμένια ή πλαγκτονικά) των κυττάρων του μικροοργανισμού (Poimenidou, 2009; Belessi et al., 2011a). Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ένα προφανές προστατευτικό αποτέλεσμα των κυττάρων του παθογόνου που προέρχονται από σύνθετες κοινωνίες βιοϋμενίων.

Τα κύτταρα βιοϋμενίων παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία κατά την απαρίθμηση τους στο PALCAM άγαρ σε σχέση με το TSAy.e. + 5.00 % NaCl. Πιθανοί λόγοι για το φαινόμενο αυτό, είναι η ευαισθησία τόσο των υγίων όσο και των τραυματισμένων κυττάρων ορισμένων στελεχών στην παρουσία συγκεκριμένων ουσιών, στα επιλεκτικά θρεπτικά υλικά (Jay, 1986; Golden et al., 1988; Sibanda & Buys, 2017). Η παρουσία της ακριφλαβίνης, του ναλιδιξικού οξέος και του χλωριούχου λιθίου στο PALCAM άγαρ έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να δράσουν ανασταλτικά έναντι των στρεσαρισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* (Liamkaew et al., 2014). Ένας ακόμη λόγος, όπως παρατηρήθηκε και στο Κεφάλαιο 4, για τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα και κανονικά κύτταρα του *L. monocytogenes*, μπορεί να είναι η ικανότητα του παθογόνου να μεταβολίζει διαφορετικές πηγές άνθρακα που περιέχονται στα υλικά ανάπτυξης (PALCAM και TSAy.e. + NaCl), επηρεάζοντας την ανάπτυξη των κυττάρων βιοϋμενίων στην επιφάνεια των τρυβλίων.

Η ανίχνευση και τελικά η εξάλειψη των κυττάρων βιοϋμενίων που σχηματίζονται στις επιφάνειες των τροφίμων παραμένει δύσκολη, λόγω της ανθεκτικότητας τους στις καταπονήσεις αλλά και στις αντιμικροβιακές ουσίες σε σχέση με τα πλαγκτονικά κύτταρα (Pan, et al., 2006; Rajkovic et al., 2009; Capita et al., 2014). Η εφαρμογή καπνού κατά τη διαδικασία της θερμής κάπνισης αποτελεί ένα σημαντικό στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας των φιλέτων καπνιστής πέστροφας. Για τον λόγο αυτό σε συνέχεια της θερμικής επεξεργασίας (60 °C), μελετήσαμε την απόκριση του παθογόνου, σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα παρουσία των αντιμικροβιακών ουσιών των συμπυκνωμάτων υγρών καπνών που διαθέτουμε. Η έκθεση των κυττάρων του παθογόνου στις διάφορες αντιμικροβιακές ουσίες, σε μια βιομηχανία τροφίμων, μπορεί να διαφέρει, ανάλογα με το σημείο (Poimenidou et al., 2016; Rodríguez-Melcón et al., 2019). Τα κύτταρα βιοϋμενίων, έπειτα από θερμική

καταπόνηση, παρουσίασαν την υψηλότερη ανθεκτικότητα, στην αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών (L9 ή G6), συγκριτικά με τα πλαγκτονικά και τα κύτταρα βιοϋμενίων χωρίς θερμική καταπόνηση, αντίστοιχα. Αυξημένη ανθεκτικότητα του *L. monocytogenes* έπειτα από ήπια θέρμανση (60 °C, 45 λεπτά), έχει αναφερθεί για θανατηφόρες δόσεις απολυμαντικών (Lou & Yousef, 1997). Άλλες μελέτες αναφέρουν την ανθεκτικότητα των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν από RTE αλιευτικά προϊόντα (Takahashi et al., 2009), στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV light), στη ξήρανση αλλά και στη χρήση κοινά χρησιμοποιούμενων απολυμαντικών (Keskinen et al., 2008; Thompson et al., 2008). Η έκθεση των βακτηρίων, όπως είναι γνωστό σ' ένα ήπιο στρες μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αντοχής έναντι άλλων εμποδίων της ίδιας ή και μεγαλύτερης έντασης (Yousef & Courtney, 2003), γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα αυτού του Κεφαλαίου.

Καταλήγοντας, το διαφορετικό ιστορικό ανάπτυξης των κυττάρων του *L. monocytogenes*, επηρέασε την ανθεκτικότητά του στη θερμική επεξεργασία, καθώς τα κύτταρα βιοϋμενίων εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη θερμοανθεκτικότητα από τα πλαγκτονικά κύτταρα του παθογόνου. Επιπλέον, η αντοχή των κυττάρων βιοϋμενίων στην επακόλουθη αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών, ενισχύθηκε για τα κύτταρα βιοϋμενίων που είχαν προηγουμένως υποστεί θερμική καταπόνηση. Πράγματι, τα κύτταρα βιοϋμενίων μετά τη θερμική καταπόνηση, παρουσία συγκεντρώσεων καπνών, έδειξαν αυξημένη αντοχή σε σχέση με τα πλαγκτονικά κύτταρα αλλά και τα κύτταρα βιοϋμενίων του παθογόνου χωρίς θερμική καταπόνηση.

## Κεφάλαιο 6. Επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης στη μικροβιακή σύνθεση και στις φυσικοχημικές ιδιότητες των φιλέτων καπνιστής πέστροφας

### 6.1. Εισαγωγή

Τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας συνήθως τοποθετούνται και διανέμονται σε συσκευασία υπό κενό αέρα και διατηρούνται σε θερμοκρασία ψύξης 2.0 – 4.0 °C, δεδομένου ότι ο συνδυασμός της χαμηλής θερμοκρασίας αποθήκευσης με τις αναερόβιες συνθήκες είναι δυνατό να παρατείνει σημαντικά τη διάρκεια ζωής του προϊόντος (Ashie et al. 1996; Lyhs et al., 2001b). Ωστόσο, είναι γνωστό ότι ακόμα και υπό αυτές τις συνθήκες συντήρησης, η φρεσκότητα των προϊόντων αυτών υποβαθμίζεται (αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, εκδήλωση δυσάρεστων οσμών) κυρίως λόγω της μεταβολικής δραστηριότητας των Ειδικών Αλλοιωγόνων Μικροοργανισμών – EAM (Boziaris & Parlapani, 2017), αλλά και λόγω άλλων αντιδράσεων υποβάθμισης μη – μικροβιακής φύσεως (Ashie et al. 1996).

Το μικροβίωμα των ψαριών που συντηρούνται υπό ψύξη σε αναερόβιες συνθήκες, αποτελείται κυρίως από οξυγαλακτικά βακτήρια, αλλά κι από άλλους μικροοργανισμούς όπως τα *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae κ.ά. (Comi, 2017; Ficicilar & Genccelep, 2017). Οι EAM μπορεί να αποτελούνται από ένα μόνο βακτηριακό στέλεχος ή από ομάδα βακτηρίων (Dalgaard, 1995, Gram & Dalgaard, 2002). Η απομόνωση αυτών των μικροοργανισμών μέσω της χρήσης θρεπτικών υποστρωμάτων (γενικής χρήσης ή επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα) είναι απαραίτητη έτσι ώστε να μπορούμε να μελετήσουμε περαιτέρω τον ρυθμό αύξησης αυτών έναντι άλλων μικροοργανισμών, το δυναμικό αλλοίωσής τους κ.ά.

Εξαιτίας του γεγονότος ότι οι κλασικές τεχνικές ταυτοποίησης (φαινοτυπικές και βιοχημικές μέθοδοι) δίνουν συνήθως ελλιπή αποτελέσματα για την ταυτότητα των μικροοργανισμών (Christensen et al. 1994; Nisiotou et al. 2014), η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα πραγματοποιείται πλέον με μοριακές τεχνικές, όπως με ανάλυση και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA (Parlapani et al. 2015a; 2015b; 2020; Parlapani & Boziaris, 2016). Ωστόσο, η ταυτοποίηση με μοριακή ανάλυση απαιτεί αλληλούχιση η οποία είναι χρονοβόρα και οικονομικά ασύμφορη για πολλά δείγματα. Μια εναλλακτική μέθοδος είναι η ταυτοποίηση μικροοργανισμών με Ιοντισμό με Εκρόφιση από Μήτρα μέσω Λείζερ – MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) με φασματομετρία μάζας – Mass Spectrometry (MS). Πρόκειται για μία τεχνική με εξαιρετικά αποτελέσματα στην ταυτοποίηση μικροοργανισμών, με χαμηλά κόστη και σε αντίθεση με τις μοριακές τεχνικές ελάχιστη επεξεργασία των δειγμάτων (Freiwald & Sauer, 2009; Böhme et al. 2010; Giebel et al., 2010). Τα φάσματα που λαμβάνονται για κάθε μικροοργανισμό συγκρίνονται επιτόπου με τα φάσματα από τις βάσεις δεδομένων (Dare, 2006) δίνοντας εξαιρετικά αποτελέσματα για κάθε βακτηριακό στέλεχος, σε επίπεδο είδους και γένους (Bright et al., 2002; Fernández-No et al., 2010).

Είναι αξιοσημείωτο ότι υπάρχει λιγοστή πληροφόρηση σχετικά με τη μικροβιολογία των φιλέτων καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης) σε σύγκριση με την εκτενέστερη γνώση γύρω από άλλα προϊόντα υψηλής θρεπτικής και προστιθέμενης αξίας, τόσο σε ελληνικό όσο και ευρωπαϊκό επίπεδο.

Στο παρόν κεφάλαιο μελετήθηκαν οι μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αλλαγές (pH,  $a_w$ , κτλ.) σε συνδυασμό με την επίδρασή τους στις οργανοληπτικές αλλαγές και στον εμπορικό χρόνο ζωής φιλέτων καπνιστής πέστροφας σε συσκευασία κενού στους 2.0 °C και 7.9 °C. Στη συνέχεια οι πιθανοί ειδικοί αλλοιωγόνοι

μικροοργανισμοί απομονώθηκαν από το επιλεκτικό τους θρεπτικό μέσο και ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση πρωτεωμικής ανάλυσης με Ιοντισμό με Εκρόφηση από Μήτρα μέσω Λείζερ – MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) με φασματομετρία μάζας – Mass Spectrometry (MS).

## **6.2. Υλικά και Μέθοδοι**

### **6.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός**

Στο παρόν κεφάλαιο πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση των πληθυσμιακών μεταβολών διαφόρων μικροοργανισμών που πιθανόν προκαλούν αλλοίωση σε φιλέτα καπνιστής πέστροφας, συσκευασμένων υπό κενό αέρος σε 2 θερμοκρασίες (2.0 °C και 7.9 °C) συντήρησης. Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν δείγματα σάρκας για μικροβιολογική ανάλυση (βλέπε περιγραφή στο Κεφάλαιο 2), για τον υπολογισμό των φυσικοχημικών παραμέτρων (pH,  $a_w$ , NaCl) και πραγματοποιούνταν οργανοληπτικός έλεγχος για τον προσδιορισμό του χρόνου απόρριψης των φιλέτων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των απομονωμένων αποικιών από το MRS άγαρ (pH 5.4, 6.4 και 7.4) με τη χρήση πρωτεωμικής ανάλυσης.

### **6.2.2. Προέλευση δειγμάτων**

Στο παρόν κεφάλαιο ελήφθησαν φιλέτα καπνιστής πέστροφας σε συσκευασία κενού, βάρους περίπου 70 γρ το καθένα και 140 γρ ανά συσκευασία 2 φιλέτων, από δύο ελληνικές εταιρίες παραγωγής και εμπορίας αλιευμάτων της κεντρικής Μακεδονίας (A) και της Πελοποννήσου (B). Τα φιλέτα τοποθετήθηκαν μέσα σε πολυεστερικά κιβώτια με πάγο και μεταφέρθηκαν εντός της ίδιας ημέρας στο εργαστήριο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών προϊόντων και τροφίμων, του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο Βόλο. Από τα κιβώτια αφαιρέθηκε ο πάγος και τα φιλέτα τοποθετήθηκαν σε επωαστικούς θαλάμους στους 2.0 και στους 7.9 °C.



### 6.2.3. Οργανοληπτική αξιολόγηση

Η οργανοληπτική μελέτη των φιλέτων καπνιστής πέστροφας έγινε σύμφωνα με τα Codex Standards (1969 & 1999) για προ-συσκευασμένα αλιευτικά προϊόντα. Το πάνελ των κριτών (panel) αποτελούνταν από πέντε (5) άτομα. Η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιούνταν σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας σύμφωνα με την κλίμακα αξιολόγησης 10 σημείων του Torry, η οποία σχεδιάστηκε από τους Shewan et al., (1953) και αποτελεί έως και σήμερα την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη κλίμακα αξιολόγησης από τη βιομηχανία για μεταποιημένα ιχθυηρά. Οι κριτές καλούνταν να συμπληρώσουν το έντυπο οργανοληπτικής αξιολόγησης που τους δίνονταν (Πίν. 6.1). Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που αξιολογήθηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό του εμπορικού χρόνου ζωής των φιλέτων ήταν η οσμή, η γεύση και η υφή της σάρκας (Πίν. 6.1, Huss 1995). Όταν ένα από τα χαρακτηριστικά, αξιολογούνταν κάτω από το όριο απόρριψης (κάτω από 4), το προϊόν χαρακτηριζόταν ως ακατάλληλο για κατανάλωση (αλλοιωμένο).

**Πίνακας 6.1.** Έντυπο οργανοληπτικής αξιολόγησης των φιλέτων καπνιστής πέστροφας. Τροποποιήθηκε από Huss, (1995).

Αξιολόγηση μεταποιημένων ιχθυηρών							
Όνομα:		Ημερομηνία:			Προϊόν:		
Βαθμολογία							
	10 / 9	8 / 7	6 / 5	Όριο Απόρριψης 4 / 3	2 / 1	0	Τελική
<b>Όσμή</b>	Ευχάριστη	Λιπαρή-ελαιώδες, ήπια τάγγιση	Ήπια τάγγιση, αίσθηση μικροβιακής αλλοίωσης (ξινίλα)	Έντονη τάγγιση, αλλοίωση (ξινίλα), χαλασμένο κρέας	Πολύ έντονη τάγγιση, αλλοίωση (ξινίλα)	Αλλοιωμένη	
<b>Γεύση</b>	Ευχάριστη, αίσθηση σάρκας	Λιπαρή, γλυκιά, μαλακή, ουδέτερη	Ήπια λιπαρή, γλυκιά, μαλακή, αλλοίωση (ξινίλα)	Αλλοιωμένη, μαλακή, γλοιώδες, πικρή, ξινή	Έντονα αλλοιωμένη, πικρή	Αλλοιωμένη	
<b>Υφή</b>	Σφιχτή, ζουμερή, ελαστική	Σφιχτή, ζουμερή, ελαφρώς στεγνή, ελαφρώς ελαστική	Λιγότερο ζουμερή, λιγότερο στεγνή και ζουμερή, ελαφρώς ελαστική	Έντονα στεγνή και ινώδες	Στεγνή και σκληρή	Γλοιώδες, αλλοιωμένη	

#### **6.2.4. Μέτρηση pH**

Για τη μέτρηση του pH των φιλέτων, σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν τριπλά δείγματα 5 γρ το καθένα και τοποθετούνταν σε σακούλες τύπου Stomacher (BagLight PolySilk, Interscience, Saint Nom, France) με 45 mL απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια ομογενοποιούνταν για 2 λεπτά σε ομογενοποιητή τύπου Stomacher (Bag Mixer, Interscience, London, UK). Η μέτρηση του pH γίνονταν με τη χρήση οργάνου μέτρησης pH (inoLAB, WTW series, Xylem Analytics, Germany).

#### **6.2.5. Μέτρηση ενεργότητας νερού ( $a_w$ )**

Η μέτρηση της ενεργότητας νερού ( $a_w$ ) των δειγμάτων τις ημέρες δειγματοληψίας πραγματοποιούνταν εις τριπλούν με τη χρήση της συσκευής μέτρησης  $a_w$  HygroPalm HP23-A / HP23-AW-A Hand-Held Indicator (Rotronic AG, Switzerland). Το δείγμα τοποθετούνταν στους ειδικούς περιέκτες με τέτοιο τρόπο, ώστε να καλύψουν ολόκληρη την επιφάνεια του πυθμένα τους. Στη συνέχεια οι περιέκτες τοποθετούνταν στον υποδοχέα δείγματος και η μέτρηση της  $a_w$  σταθεροποιούνταν μετά από περίπου 5 λεπτά.

#### **6.2.6. Προσδιορισμός υγρασίας**

Για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υγρασίας στη σάρκα (%), λαμβάνονταν γνωστή ποσότητα δείγματος, ζυγίζονταν και ξηραίνονταν για 24 ώρες στους 105 °C. Κατόπιν, υπολογίζονταν εκ νέου το βάρος του δείγματος μετά την ξήρανση. Το ποσοστό της υγρασίας των δειγμάτων δίνονταν από τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ Moisture} = \text{Weight Loss After Drying} \times 100 / \text{Wet Weight of Sample} \quad (1)$$

### 6.2.7. Μέτρηση περιεκτικότητας άλατος

Ο υπολογισμός του αλατιού (προσδιορισμός ιόντων Χλωρίου) στη σάρκα των φιλέτων, έγινε με ογκομετρική ανάλυση σύμφωνα με τη μέθοδο Volhard κατά AOAC για τα αλιευτικά προϊόντα (AOAC Official Method, 937.09, 1995).

Αρχικά, λαμβάνονταν δείγμα 5 γρ από το φιλέτο, θρυμματίζονταν με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και τοποθετούνταν εντός μία κωνικής φιάλης (100 mL). Κατόπιν, προσθέτονταν γνωστός όγκος διαλύματος (περίπου 30 mL) 0,1 N AgNO<sub>3</sub>, ώστε να καθιζάνουν όλα τα ιόντα Χλωρίου (Cl<sup>-</sup>) και 20 mL νιτρικού οξέος, HNO<sub>3</sub>. Ακολουθούσε ελαφρύς βρασμός για περίπου 15 λεπτά, έως ότου όλα τα στερεά πλην του AgCl να διαλυθούν και αφήνονταν να κρυώσει. Όταν το διάλυμα έφτανε σε θερμοκρασία δωματίου προσθέτονταν 30 mL απεσταγμένο νερό και 3 mL δείκτη (ferric indicator). Τέλος, έγινε η ογκομέτρηση με διάλυμα Θειοκυανικού Αμμωνίου – 0,1 N (NH<sub>4</sub>SCN), μέχρι το διάλυμα να χρωματιστεί σταθερά φωτεινό καφέ. Τα χημικά αντιδραστήρια προέρχονταν από τη Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Η τελική συγκέντρωση άλατος στην υδάτινη φάση για τη σάρκα των φιλέτων υπολογίστηκε με την παρακάτω σχέση:

$$\text{NaCl (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 58.45}{S \times 1000} \times 100 \quad (2)$$

όπου:

V1: τα ml AgNO<sub>3</sub> που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά

V2: τα mL του διαλύματος NH<sub>4</sub>SCN που καταναλώθηκαν για την ογκομέτρηση του δείγματος

N, η κανονικότητα του διαλύματος AgNO<sub>3</sub> (=0,1 M)

S, τα γρ δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά.

Το ποσοστό του άλατος στην υδάτινη φάση δίνονταν από τη σχέση:

$$\% \text{ NaCl} \times 100 / \% \text{ Moisture} \quad (3)$$

### **6.2.8. Μικροβιολογική ανάλυση φιλέτων**

Η μικροβιολογική ανάλυση των φιλέτων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.

### **6.2.9. Απομόνωση μικροοργανισμών**

Αμέσως μετά την απαρίθμηση των τρυβλίων κατά τη διάρκεια της συντήρησης των φιλέτων στους 2.0 και 7.9 °C υπό συνθήκες κενού, οι αποικίες από τα τρυβλία MRS με τιμές pH 5.4, 6.4 και 7.4, διαχωρίστηκαν με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Κατόπιν, αντιπροσωπευτικός αριθμός αποικιών (τουλάχιστον το 50 %) μεταφέρθηκε σε τρυβλία TSA με τη μέθοδο της γραμμικής μετασποράς (streaking) και αφήνονταν για επώαση στους 25 °C για 48 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση της κάθε αποικίας με πρωτεωμική ανάλυση.

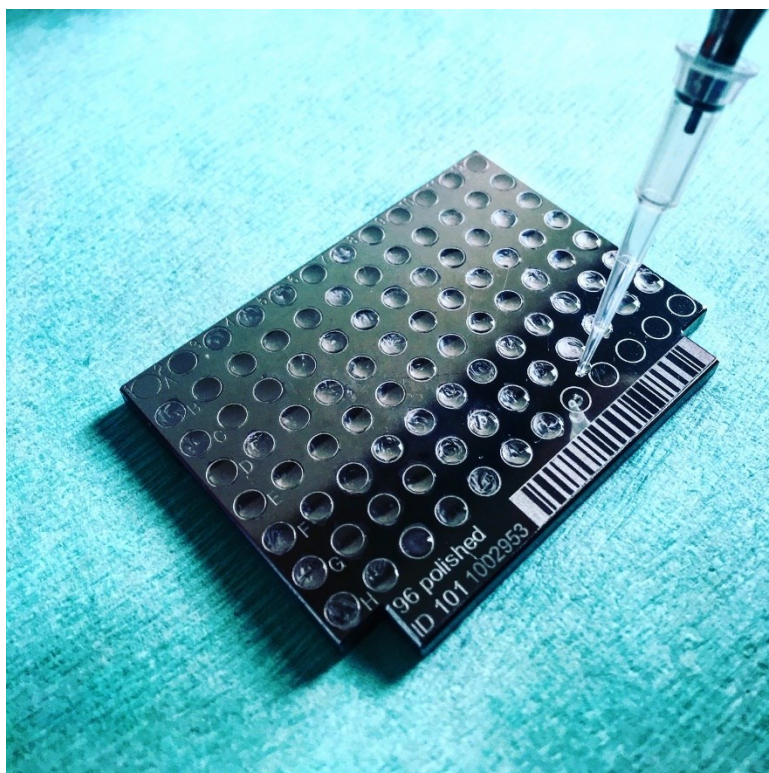
### **6.2.10. Ταυτοποίηση με MALDI-TOF MS**

#### **6.2.10.1. Επεξεργασία δειγμάτων και προετοιμασία της πλάκας για τις αναλύσεις MALDI-TOF MS**

Οι απομονωμένες αποικίες ταυτοποιήθηκαν με Ιοντισμό με Εκρόφηση από Μήτρα μέσω Λείζερ – MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) με φασματομετρία μάζας – Mass Spectrometry (MS) στο εργαστήριο Υγιεινής & Επιδημιολογίας στο Τμήμα Ιατρικής στη Λάρισα.

Συγκεκριμένα, για κάθε μικροοργανισμό λαμβάνονταν μια μικρή ποσότητα (περίπου 1-2  $\mu$ L) από μία καλά διαχωρισμένη αποικία και εναποτίθονταν ομοιόμορφα με εξάπλωση σε μία μεταλλική (ατσάλινη) επιφάνεια 96 θέσεων, που καλείται πλακίδιο ανάλυσης MALDI. Αφού καλύπτονταν όλες οι θέσεις του πλακιδίου, λαμβάνονταν 1  $\mu$ L διαλύματος μυρμηκικού οξέος 70 % (v/v; Formic Acid 85% AG, Penta, Praha),

τοποθετούνταν προσεκτικά πάνω από κάθε θέση του πλακιδίου και αφήνονταν να ξηραθεί σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10 λεπτά. Κατόπιν με τον ίδιο τρόπο τοποθετούνταν πάνω στο δείγμα το χημικό υπόστρωμα της μήτρας και αφήνονταν για άλλα 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου να κρυσταλλωθεί κατά την ξήρανση του. Το χημικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ως μητρική ουσία ήταν το  $\alpha$ -CHCA ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic; Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Το υλικό της μήτρας είναι ένα μικρό οργανικό μόριο το οποίο απορροφά ακτινοβολία στο μήκος κύματος του λέιζερ (Roboz, 2002; Mano & Goto, 2003). Το μίγμα αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν εισήχθη στο φασματογράφο μάζας για την πραγματοποίηση των αναλύσεων. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν η MALDI Microflex LT mass spectrometer (Bruker Daltonic GmbH, Bremen, Germany).



**Εικόνα 6.1.** Εναπόθεση χημικού υποστρώματος μήτρας πάνω από τα δείγματα σε πλακίδιο ανάλυσης MALDI (φωτογραφία του συγγραφέα).

### 6.2.10.2. Ανάλυση με MALDI-TOF MS

Για τη λήψη των φασμάτων ο φασματογράφος μάζας ρυθμίστηκε σε θετική γραμμική ανάλυση ιόντων και σε συχνότητα λέιζερ στα 60 Hz.. Η λήψη φάσματος γίνονταν αυτόματα με το λογισμικό Flex control 3.4 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Το εύρος μαζών εντός του οποίου καταγράφηκαν και αξιολογήθηκαν οι πρωτεϊνικές κορυφές ήταν από  $m/z$  2000 έως 20.000. Οι υπόλοιπες ρυθμίσεις Microflex LT με τις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις ήταν: πηγή ιόντων 1: 20kV, πηγή ιόντων 2: 18,5kV, φακοί: 6kV, παλμική εξαγωγή ιόντων: 100 ns. Η ταυτοποίηση των απομονωμένων αποικιών έγινε μέσω του λογισμικού MALDI Biotyper Software (version 4.0) και η σύγκριση των φασμάτων μάζας που λαμβάνονταν συγκρίνονταν στη βιβλιοθήκη φασμάτων μάζας (6.093 MSPs). Η αξιοπιστία της μεθόδου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την σωστή βαθμονόμηση τόσο των δειγμάτων (εσωτερική) όσο και του φασματογράφου (εξωτερική). Η εσωτερική βαθμονόμηση δεν διενεργήθηκε καθώς τα σήματα θα παρέμβαιναν στα φάσματα μάζας των άγνωστων δειγμάτων. Για την εξωτερική βαθμονόμηση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το Bruker Bacterial Test Standard (BTS), που είναι ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα στελέχους αναφοράς. Συγκεκριμένα, πρόκειται για ένα τεχνητό πρωτεϊνικό εκχύλισμα του στελέχους *E. coli* (*E. coli* DH5- $\alpha$ lpha, Brucker Company) που χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση βακτηρίων με τη μέθοδο του Maldi-TOF MS, ώστε να επεκταθούν τα ανώτερα όρια των μαζών που καλύπτονται από το BTS και περιέχει τις δύο επιπλέον πρωτεΐνες (RNAase A και μυογλοβίνη). Τα εξαγόμενα αποτελέσματα δίνονταν με βάση τις προτεινόμενες οδηγίες του κατασκευαστή. Η βαθμολογία που δίνονταν από τον MALDI Biotyper RTC, πρόβαλλε την πιθανότητα για έναν άγνωστο μικροοργανισμό να βρίσκεται ως είδος στην βάση δεδομένων του MALDI Biotyper. Το πρωτογενές φάσμα κάθε δείγματος αποτελούταν από το άθροισμα 240 μετρήσεων

σε διάφορα σημεία της MALDI πλάκας. Η βαθμολογία που δίνονταν χωρίζεται σε τέσσερις κλίμακες, όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.2.

**Πίνακας 6.2.** Εύρος βαθμολογίας που δίνει την πιθανότητα για έναν άγνωστο μικροοργανισμό να βρίσκεται ως είδος στην βάση δεδομένων του MALDI Biotyper.

<b>Εύρος</b>	<b>Περιγραφή αποτελέσματος</b>	<b>Σύμβολα</b>	<b>Χρώμα</b>
2.300 – 3.000	πολύ υψηλή πιθανότητα ταυτοποίησης είδους	(+++)	Πράσινο
2.000 – 2.299	σίγουρη ταυτοποίηση γένους και πιθανή ταυτοποίηση είδους	(++)	Πράσινο
1.700 – 1.999	πιθανή ταυτοποίηση γένους	(+)	Κίτρινο
0.000 – 1.699	μη δυνατή ταυτοποίηση	(-)	Κόκκινο

Για τη φυλογενετική ταξινόμηση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης συστάδων (Cluster analysis). Τα απομονωμένα βακτηριακά στελέχη ταξινομήθηκαν σε δένδρογραμμα με βάση το πρωτεϊνικό τους προφίλ. Για όλες τις αναλύσεις η δημιουργία συστάδων (clusters) έγινε, μετά την ομαλοποίηση των φασμάτων και την επεξεργασία τους με το λογισμικό MALDI Biotyper Offline Classification, 4.0. Το δένδρογραμμα κατασκευάστηκε με τη χρήση του λογισμικού MALDI Biotyper Offline Classification 4.0, στις εργοστασιακές του ρυθμίσεις για τη δημιουργία δένδρογραμμάτων MSP creation (main spectra library).



### 6.3. Αποτελέσματα

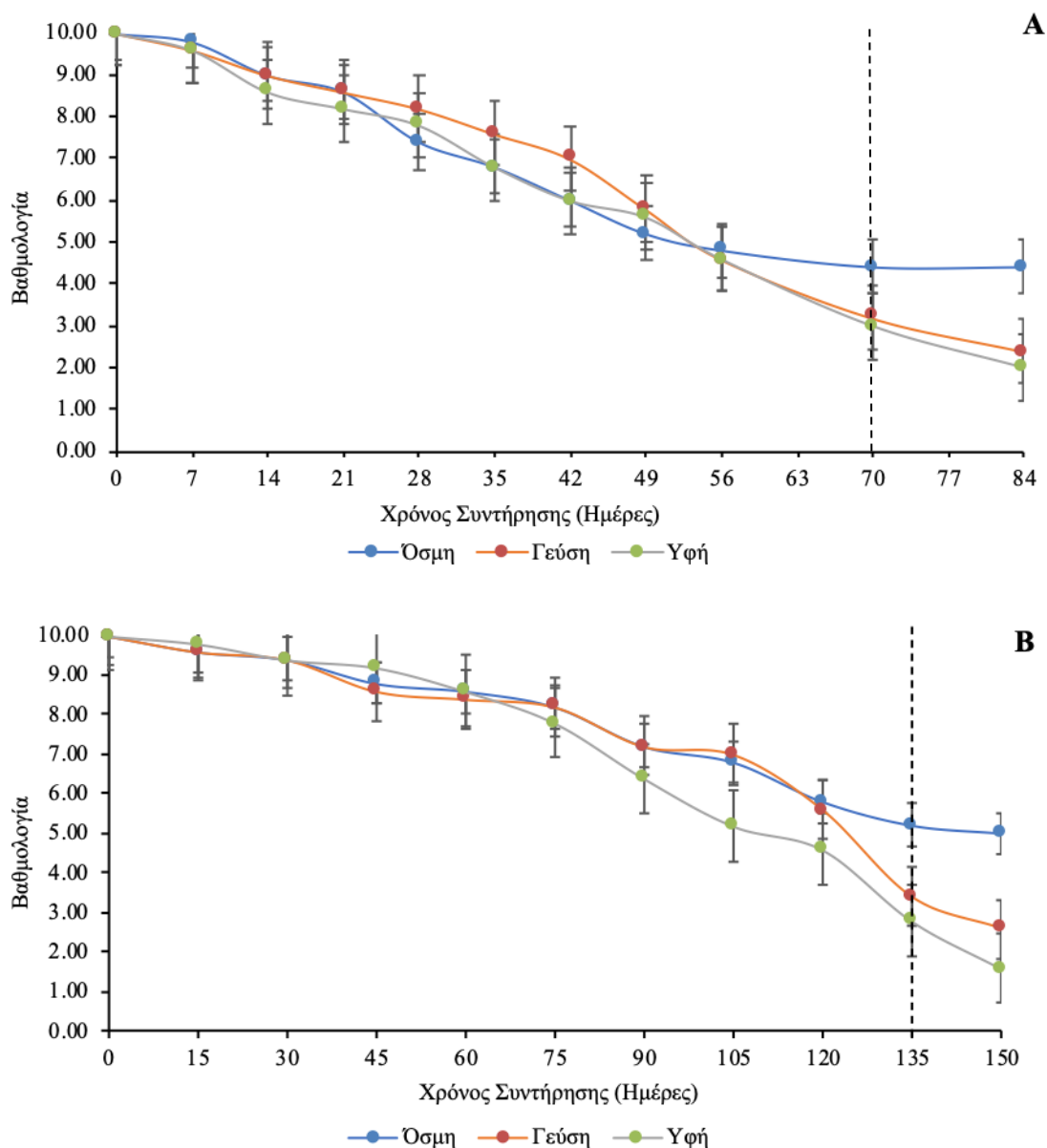
#### 6.3.1. Προσδιορισμός χρόνου απόρριψης φιλέτων καπνιστής πέστροφας

Στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής (ημέρα 0), τα φιλέτα αξιολογήθηκαν με άριστα (βαθμολογία 10). Βάσει της οργανοληπτικής αξιολόγησης, ο χρόνος απόρριψης των φιλέτων που είχαν αποθηκευτεί στους 7.9 °C και 2.0 °C, ήταν 70 και 135 ημέρες για τα φιλέτα που προέρχονταν από την κεντρική Μακεδονία (Α), και 63 και 135 ημέρες για τα φιλέτα της Πελοποννήσου (Β), αντίστοιχα.

Οι μεταβολές των χαρακτηριστικών της οσμής, της γεύσης και της υφής της σάρκας των προϊόντων φαίνονται στα Σχήματα 6.1 και 6.2. Η συνολική εικόνα των φιλέτων και από τις δύο περιοχές στους 7.9 °C, παρέμεινε ικανοποιητική έως και την 35<sup>η</sup> ημέρα. Η οσμή έως και την τελευταία ημέρα συντήρησης ήταν ουδέτερη με ήπια φρουτώδη χαρακτηριστικά και βρίσκονταν σε αποδεκτά επίπεδα για τα φιλέτα στους 7.9 °C (Σχ. 6.1 Α & 6.2 Α). Την ημέρα απόρριψης (70) στους 7.9 °C, η γεύση των φιλέτων ήταν αλλοιωμένη και κάπως ξινή ενώ η υφή ήταν στεγνή και ινώδης.

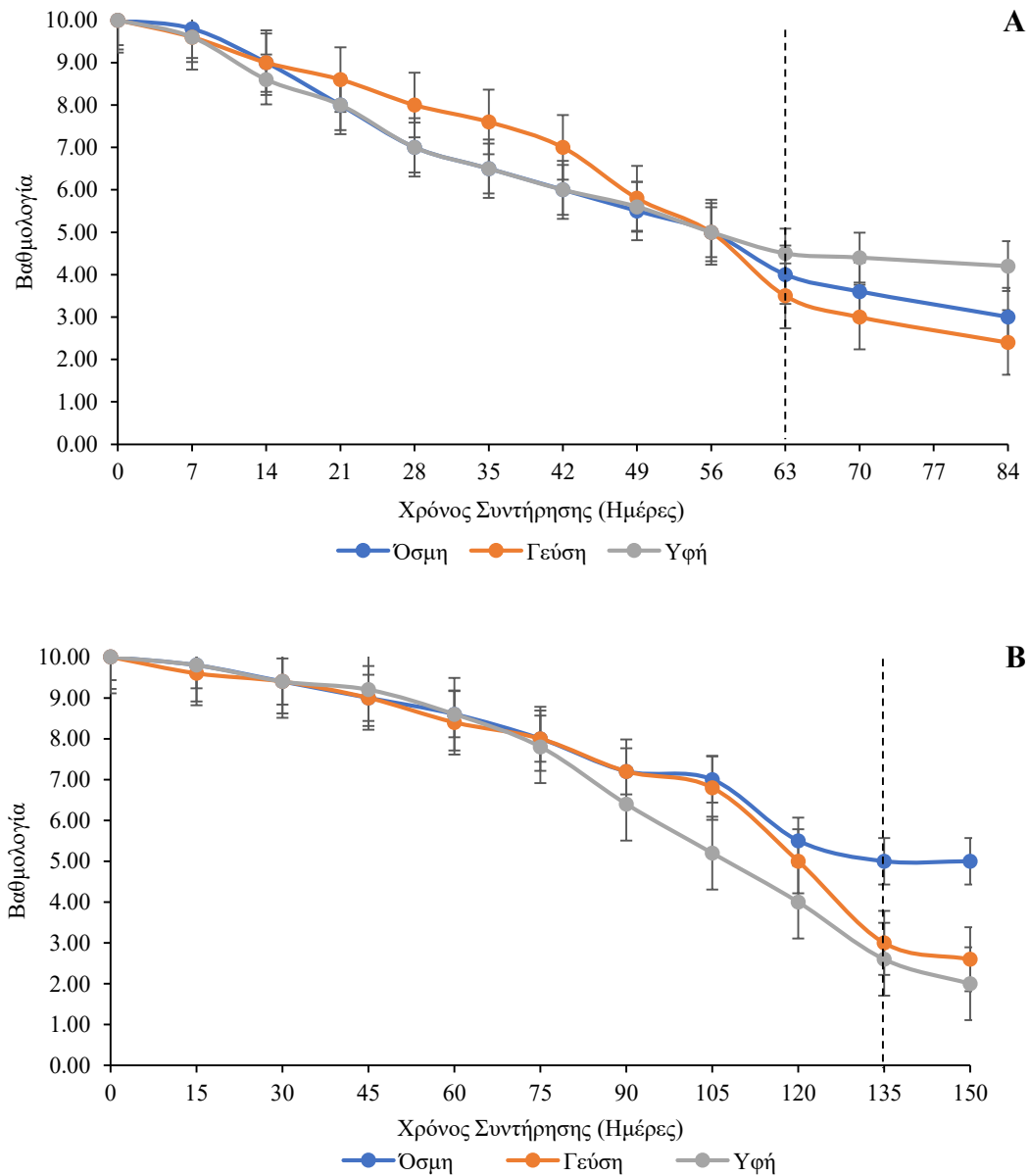
Τα φιλέτα που βρίσκονταν αποθηκευμένα για συνολικά 150 ημέρες στους 2.0 °C, παρουσίασαν μία εντελώς διαφορετική εικόνα από τα αντίστοιχα φιλέτα στους 7.9 °C. Οι μεταβολές των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών για τα φιλέτα από τις περιοχές Α και Β, όπως αναμένονταν για ένα καπνιστό προϊόν με μακρά διάρκεια συντήρησης από τον παραγωγό (5 μήνες) στην ιδανική θερμοκρασία συντήρησης δεν έδειξαν ιδιαίτερες διαφορές. Η συνολική τους βαθμολογία και για τα 3 χαρακτηριστικά που αξιολογήθηκαν έως και την 75<sup>η</sup> ημέρα ήταν ιδιαίτερα υψηλή και έφτανε την κλίμακα του 8 για τα φιλέτα και των δύο περιοχών με ευχάριστη οσμή και γεύση. Τις επόμενες ημέρες, η οσμή και η γεύση των φιλέτων δεν είχαν μεγάλη αλλαγή, όμως παρατηρήθηκε αισθητή μείωση στη γεύση των φιλέτων (ήπια λιπαρή και γλυκιά) μετά και τις 90 ημέρες (Σχ. 6.1 Β & 6.2 Β). Έπειτα από 135 ημέρες

αποθήκευσης, η υφή και η γεύση των φιλέτων από την περιοχή Α, που βρίσκονταν στους 2.0 °C είχαν ξεπεράσει το όριο οργανοληπτικής απόρριψης, ομοίως με τα φιλέτα από την περιοχή Β, που απορρίφθηκαν την ίδια ημέρα (135) με μαλακή και γλοιώδη υφή (Σχ. 6.1 Β & 6.2 Β).



**Σχήμα 6.1.** Μεταβολές των χαρακτηριστικών οσμής, γεύσης και υφής των φιλέτων καπνιστής πέστροφας από την Περιοχή Α, σε συσκευασία κενού αέρα Α) στους 7.9 °C και Β) στους 2.0 °C. Με την κάθετη διακεκομμένη γραμμή, παρουσιάζεται ο χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης των φιλέτων. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

Την ημέρα της οργανοληπτικής απόρριψης των φιλέτων από την περιοχή A και B, η OMX βρίσκονταν στους 8.04 και 7.19 log CFU/g για τη θερμοκρασία των 7.9 °C και στους 6.43 και 5.69 log CFU/g για τα φιλέτα που βρίσκονταν αποθηκευμένα στους 2.0 °C, αντίστοιχα.



**Σχήμα 6.2.** Μεταβολές των χαρακτηριστικών οσμής, γεύσης και υφής των φιλέτων καπνιστής πέστροφας από την Περιοχή B, σε συσκευασία κενού αέρα A) στους 7.9 °C και B) στους 2.0 °C. Με την κάθετη διακεκομμένη γραμμή, παρουσιάζεται ο χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης των φιλέτων. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

### 6.3.2. Υπολογισμός φυσικοχημικών παραμέτρων

Στον πίνακα 6.3, παρουσιάζονται οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στις τιμές του pH και της ενεργότητας ύδατος ( $a_w$ ) των φιλέτων καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης), κατά την συντήρηση στους 2.0 και 7.9 °C.

Η αρχική τιμή του pH για τα φιλέτα από τις περιοχές A και B, ήταν 6.43 και 6.45, αντίστοιχα (Πίν. 6.3). Γενικά οι τιμές του pH στη θερμοκρασία των 2.0 °C και για τις δύο περιοχές παρουσίασαν μικρές αυξομειώσεις. Την τελευταία ημέρα συντήρησης στους 2.0 °C, το pH των φιλέτων από την περιοχή A και αυτών από την B, μειώθηκε και αυξήθηκε, αντιστοίχως, συγκριτικά με την πρώτη ημέρα χωρίς ωστόσο, στατιστικά σημαντικές διαφορές. Μόνο την ημέρα 120 παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, καθώς η τιμή του pH μειώθηκε σε 6.17 και συμπίπτει με την αύξηση της OMX των φιλέτων από την περιοχή A (Πίν. 6.3,  $P < 0.05$ ). Στη θερμοκρασία των 7.9 °C, παρατηρήθηκαν πιο έντονες διακυμάνσεις στο pH των φιλέτων συγκριτικά με τους 2.0 °C. Τις ημέρες 35 και 42, παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της τιμής του pH των φιλέτων που συμπίπτει και πάλι με την μέγιστη αύξηση της OMX στα φιλέτα της περιοχής A (Πίν. 6.3,  $P < 0.05$ ).

Δεν παρατηρήθηκαν ουσιαστικές διακυμάνσεις για την ενεργότητα ύδατος των φιλέτων. Ωστόσο, αυτό που μπορεί να αναφερθεί είναι ότι η τιμή της  $a_w$  για τα φιλέτα από την περιοχή A ήταν υψηλότερη (0.965), συγκριτικά με αυτή των φιλέτων από την B (0.955).

Η αρχική περιεκτικότητα σε NaCl (%) των φιλέτων καπνιστής πέστροφας από την περιοχή A, ήταν 2.33 % και 2.61 % για τα φιλέτα από την περιοχή B (μέσος όρος, 3 επαναλήψεων). Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας άλατος των φιλέτων στην υδάτινη φάση, έγινε ξήρανση τους, στους 105 °C για 24 ώρες και υπολογίστηκε το ποσοστό της υγρασίας τους. Τα φιλέτα από την περιοχή A και B, περιείχαν 66.40 και

65.63 % υγρασία (μέσος όρος, 3 επαναλήψεων), αντίστοιχα. Έτσι λοιπόν, το αρχικό ποσοστό αλατιού στην υδάτινη φάση, διαμορφώθηκε σε 3.51 % και 3.98 % για τα φιλέτα από τις περιοχές A και B, αντίστοιχα. Σε όλη τη διάρκεια συντήρησης των φιλέτων, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στην περιεκτικότητα των φιλέτων σε αλάτι και μόνο μία μικρή αύξηση της περιεκτικότητας NaCl, καταγράφηκε την τελευταία ημέρα συντήρησης τους (αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

### **6.3.3. Μεταβολές μικροβιακού πληθυσμού φιλέτων καπνιστής πέστροφας**

Οι μεταβολές του πληθυσμού και οι καμπύλες προσαρμογής της αύξησης του μικροβιακού πληθυσμού (με την εξίσωση Baranyi) κατά τη διάρκεια της συντήρησης φιλέτων καπνιστής πέστροφας από τις περιοχές A και B, σε συνθήκες κενού αέρα στους 2.0 °C και 7.9 °C, παρουσιάζονται στα Σχήματα 6.3 και 6.4.

Την ημέρα παραλαβής των δειγμάτων (ημέρα 0), το επίπεδο της OMX των φιλέτων ήταν 2.51 log CFU/g, τα *Pseudomonas* spp. βρέθηκαν πάνω από το όριο ανίχνευσης και ήταν 2.30 log CFU/g, ενώ ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων, για το MRS με τιμές pH 5.4, 6.4 και 7.4, βρέθηκε να είναι 3.88, 3.74 και 3.63 log CFU/g, αντίστοιχα (Σχ. 6.3 A & B).

Έπειτα από 21 ημέρες αποθήκευσης των φιλέτων στους 7.9 °C, παρατηρήθηκε μία απότομη αύξηση της OMX που έφτασε τους 6.11 log CFU/g ενώ ο πληθυσμός για τα υδροθειοπαραγωγά και τα οξυγαλακτικά βακτήρια που αναπτύχθηκαν σε MRS με pH 6.4 και 7.4 ήταν πάνω από τους 5.00 log CFU/g (Σχ. 6.3 B). Η OMX των φιλέτων στους 7.9 °C ξεπέρασε τους 7.00 log CFU/g την 35<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης και έφτασε τους 7.93 log CFU/g κατά την τελευταία ημέρα συντήρησης (Day 84) (Σχ. 6.3 B).

**Πίνακας 6.3.** Αποτελέσματα μετρήσεων των φυσικοχημικών παραμέτρων pH και  $a_w$ , των φιλέτων καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης), από 2 περιοχές (A: Κεντρική Μακεδονία & B: Πελοπόννησος) στους 2.0 και 7.9 °C. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπ. απόκλιση, 3 επαναλήψεων.

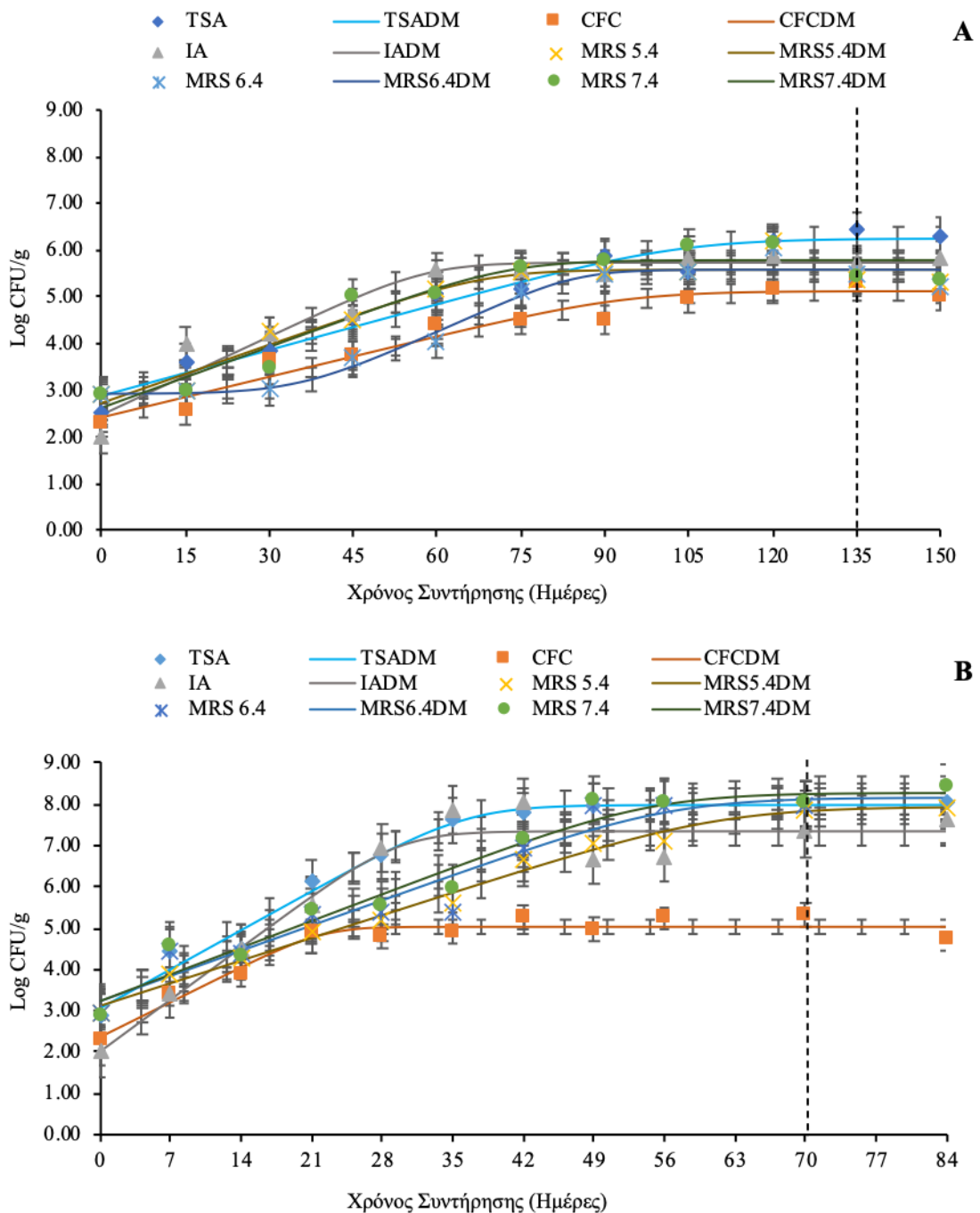
T °C	Ημέρες	Περιοχή			
		A	B	A	B
		pH		$a_w$	
2.0	0	6.43 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	6.45 $\pm$ 0.01 <sup>abc</sup>	0.965 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>	0.955 $\pm$ 0.005 <sup>ab</sup>
	15	6.37 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	6.39 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.980 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	0.949 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>
	30	6.35 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	6.44 $\pm$ 0.04 <sup>abc</sup>	0.977 $\pm$ 0.005 <sup>ab</sup>	0.960 $\pm$ 0.005 <sup>ab</sup>
	45	6.37 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	6.43 $\pm$ 0.02 <sup>abc</sup>	0.986 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	0.965 $\pm$ 0.004 <sup>ab</sup>
	60	6.45 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	6.50 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.981 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	0.972 $\pm$ 0.005 <sup>b</sup>
	75	6.46 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	6.50 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.983 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	0.972 $\pm$ 0.007 <sup>b</sup>
	90	6.36 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	6.44 $\pm$ 0.04 <sup>abc</sup>	0.977 $\pm$ 0.005 <sup>ab</sup>	0.961 $\pm$ 0.008 <sup>ab</sup>
	105	6.36 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	6.41 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.982 $\pm$ 0.005 <sup>b</sup>	0.960 $\pm$ 0.006 <sup>ab</sup>
	120	6.17 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>	6.44 $\pm$ 0.03 <sup>abc</sup>	0.982 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	0.965 $\pm$ 0.013 <sup>ab</sup>
	135	6.51 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	6.44 $\pm$ 0.03 <sup>abc</sup>	0.979 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	0.965 $\pm$ 0.006 <sup>ab</sup>
	150	6.38 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	6.49 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup>	0.979 $\pm$ 0.008 <sup>a</sup>	0.956 $\pm$ 0.006 <sup>ab</sup>
7.9	0	6.43 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	6.45 $\pm$ 0.01 <sup>cde</sup>	0.965 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>	0.955 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>
	7	6.38 $\pm$ 0.07 <sup>abc</sup>	6.41 $\pm$ 0.05 <sup>cd</sup>	0.971 $\pm$ 0.004 <sup>ab</sup>	0.970 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>
	14	6.35 $\pm$ 0.06 <sup>abc</sup>	6.23 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	0.984 $\pm$ 0.005 <sup>bc</sup>	0.959 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>
	21	6.49 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	6.19 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.973 $\pm$ 0.006 <sup>abc</sup>	0.965 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>
	28	6.41 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	6.39 $\pm$ 0.04 <sup>bcd</sup>	0.973 $\pm$ 0.002 <sup>abc</sup>	0.957 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>
	35	6.14 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	6.52 $\pm$ 0.02 <sup>de</sup>	0.965 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	0.968 $\pm$ 0.007 <sup>a</sup>
	42	6.19 $\pm$ 0.09 <sup>cd</sup>	6.41 $\pm$ 0.04 <sup>cd</sup>	0.985 $\pm$ 0.004 <sup>c</sup>	0.963 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>
	49	6.34 $\pm$ 0.12 <sup>abcd</sup>	6.59 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>	0.966 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>	0.956 $\pm$ 0.009 <sup>a</sup>
	56	6.38 $\pm$ 0.01 <sup>abc</sup>	6.34 $\pm$ 0.08 <sup>abc</sup>	0.975 $\pm$ 0.005 <sup>abc</sup>	0.965 $\pm$ 0.008 <sup>a</sup>
	63	6.36 $\pm$ 0.10 <sup>abc</sup>	6.41 $\pm$ 0.06 <sup>cd</sup>	0.975 $\pm$ 0.003 <sup>abc</sup>	0.970 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>
	70	6.31 $\pm$ 0.07 <sup>abcd</sup>	6.45 $\pm$ 0.04 <sup>cde</sup>	0.976 $\pm$ 0.003 <sup>abc</sup>	0.960 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>
	84	6.28 $\pm$ 0.05 <sup>bcd</sup>	6.42 $\pm$ 0.01 <sup>cd</sup>	0.976 $\pm$ 0.002 <sup>abc</sup>	0.963 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>

Στους 7.9 °C, η κυρίαρχη ομάδα αλλοιωγόνων μικροοργανισμών βρέθηκε να είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι την ημέρα απόρριψης των φιλέτων, τα οξυγαλακτικά βακτήρια, έφτασαν και ξεπέρασαν σε πληθυσμό την OMX και ως το τέλος της συντήρησης των προϊόντων παρέμειναν σταθερά σε πιο υψηλούς πληθυσμούς συγκριτικά με τα υπόλοιπα βακτήρια. Τέλος, ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. παρέμεινε περίπου στους 5.00 log CFU/g, ενώ την τελευταία

ημέρα συντήρησης η OMX ήταν 8.01 log CFU/g και τα υδροθειοπαραγωγά βακτήρια παρέμειναν υψηλά σε πληθυσμό ίσο με 7.32 log CFU/g (Σχ. 6.3 B).

Η OMX των φιλέτων μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης στους 2.0 °C ήταν 3.87 log CFU/g και έφτασε τους 5.06 log CFU/g την 60<sup>η</sup> ημέρα (Σχ. 6.3 A). Την ημέρα 60, τα *Pseudomonas* spp. ήταν 4.50 log CFU/g, τα υδροθειοπαραγωγά βακτήρια 5.59 log CFU/g και ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βρισκονταν πάνω από τους 5.00 log CFU/g, με εξαίρεση αυτά που αναπτύχθηκαν σε MRS με τιμή pH 6.4 (4.04 log CFU/g) (Σχ. 6.3 A). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, φάνηκε να επικρατούν και στα φιλέτα καπνιστής πέστροφας στους 2.0 °C μέχρι και τους 4 μήνες συντήρησης, όπου στη συνέχεια παρουσίασαν μικρή μείωση τις ημέρες 135 και 150 (τέλος συντήρησης), και καταγράφηκαν να είναι την τελευταία ημέρα 5.32, 5.22 και 5.38 log CFU/g στο θρεπτικό υπόστρωμα (MRS) με τιμή pH 5.4, 6.4 και 7.4, αντίστοιχα (Σχ. 6.3 A). Τελικά, η OMX έπειτα από 150 ημέρες αποθήκευσης των φιλέτων (2.0 °C) δεν ξεπέρασε τους 6.30 log CFU/g ενώ τα υδροθειοπαραγωγά βακτήρια, παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα και ο πληθυσμός τους ήταν 5.82 log CFU/g (Σχ. 6.3 A).

Ο πληθυσμός της OMX, των *Pseudomonas* spp. και των υδροθειοπαραγωγών βακτηρίων βρέθηκε κάτω του ορίου ανίχνευσης των 2 logs την ημέρα 0, για την περιοχή B, και μόνο ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων που απαριθμήθηκε στο MRS με τιμές pH 5.4, 6.4 και 7.4 ήταν 2.26, 2.46 και 2.04, αντίστοιχα (Σχ. 6.4 A & B).



**Σχήμα 6.3.** Μικροβιολογική ανάλυση φιλέτων καπνιστής πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*), από την Περιοχή Α, κατά τη συντήρηση σε συσκευασία κενού αέρα Α) στους 2.0 °C και Β) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Με την κάθετη διακεκομμένη γραμμή, παρουσιάζεται ο χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης των φιλέτων. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

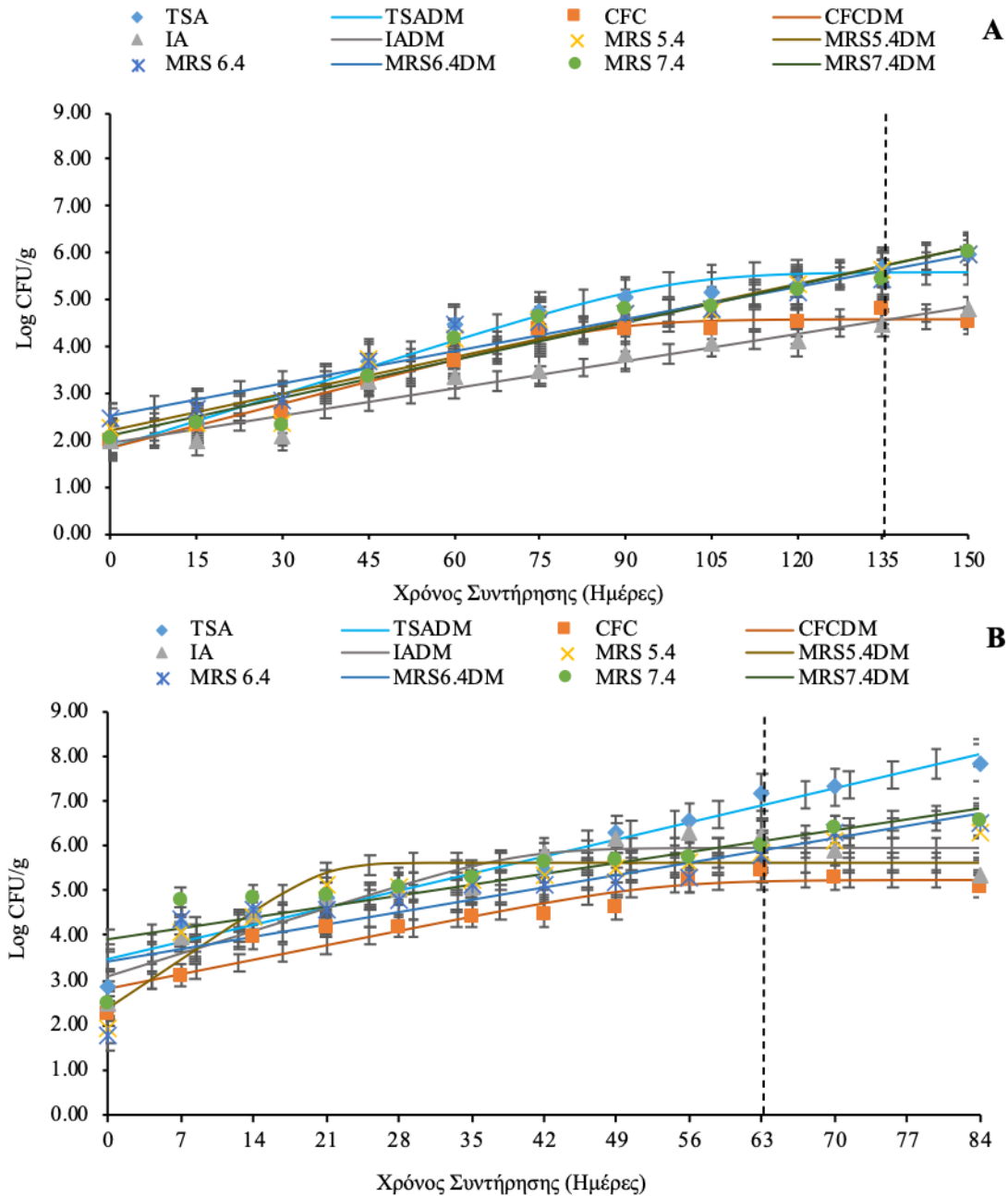


Στους 7.9 °C, την 21<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης η OMX των φιλέτων (περιοχή B) έφτασε τους 4.86 log CFU/g, τα Gram αρνητικά *Pseudomonas* spp. είχαν τον χαμηλότερο πληθυσμό (4.21 log CFU/g), τα υδροθειοπαραγωγά βακτήρια ήταν 4.85 log CFU/g και ο πληθυσμός των ψυχρότροφων οξυγαλακτικών βακτηρίων στο MRS με pH 5.4, έφτασε τους 5.14 log CFU/g έναντι 4.60 και 4.89 για το MRS με pH 6.4 και 7.4, αντίστοιχα (Σχ. 6.4 B). Την ημέρα οργανοληπτικής απόρριψης των φιλέτων στους 7.9 °C (63<sup>η</sup> ημέρα), ο πληθυσμός της OMX έφτασε τους 7.19 log CFU/g, των *Pseudomonas* spp. τους 5.47 log CFU/g των υδροθειοπαραγωγών βακτηρίων 6.23 log CFU/g και για τα οξυγαλακτικά βακτήρια τα 5.684, 5.79 και 5.99 log CFU/g στο MRS με τιμή pH 5.4, 6.4 και 7.4, αντίστοιχα (Σχ. 6.4 B). Η συντήρηση των φιλέτων στους 7.9 °C, συνεχίστηκε έως και την 84<sup>η</sup> ημέρα (Σχ. 6.4 B).

Για τα φιλέτα στους 2.0 °C από την περιοχή B, ο πληθυσμός των βακτηρίων κυμάνθηκε σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα < 4.00 log CFU/g έως και την 60<sup>η</sup> ημέρα, όπου η OMX έφτασε 4.51 log CFU/g (Σχ. 6.4 A). Στους 2.0 °C, η οργανοληπτική απόρριψη, ορίστηκε στην ημέρα 135 με τα οξυγαλακτικά βακτήρια να φτάνουν τους 5.66, 5.41 και 5.44 log CFU/g στο MRS με pH 5.4, 6.4 και 7.4, αντίστοιχα (Σχ. 6.4 A). Την ημέρα απόρριψης (135) στους 2.0 °C, τα *Pseudomonas* spp. και τα υδροθειοπαραγωγά βακτήρια ήταν 4.80 και 4.49 log CFU/g, ενώ η OMX ήταν 5.69 log CFU/g (Σχ. 6.4 A). Όπως και στους 7.9 °C, η συντήρηση των φιλέτων συνεχίστηκε μέχρι και το τέλος του πραγματικού εμπορικού χρόνου ζωής των καπνιστών φιλέτων που δίνεται από τον προμηθευτή, δηλαδή 150 ημέρες. Τελικά, την ημέρα 150, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση σε όλες τις κατηγορίες των μικροοργανισμών.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι τόσο για τα φιλέτα που είχαν αποθηκευτεί στους 2.0 °C όσο και για αυτά που βρίσκονταν στους 7.9 °C τα Enterobacteriaceae παρέμειναν

κάτω από το όριο ανίχνευσης (1.00 log CFU/g) μέχρι το τέλος της διάρκειας αποθήκευσης. Ακόμη, σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκαν μαύρες αποικίες στα τρυβλία με θρεπτικό υλικό ΙΑ.



**Σχήμα 6.4.** Μικροβιολογική ανάλυση φιλέτων καπνιστής πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*), από την Περιοχή Β, κατά τη συντήρηση σε συσκευασία κενού αέρα Α) στους 2.0 °C και Β) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Με την κάθετη διακεκομμένη γραμμή, παρουσιάζεται ο χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης των φιλέτων. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

Οι μεταβολές του πληθυσμού των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών καθώς και οι κινητικές παράμετροι κατά τη διάρκεια συντήρησης των φιλέτων καπνιστής πέστροφας στους 2.0 και 7.9 °C σε συσκευασία υπό κενό αέρα παρουσιάζονται στους Πίνακες 6.4 και 6.5, αντίστοιχα.

Ο ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ), όπως υπολογίστηκε με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi, ήταν μεγαλύτερος για όλες τις μελετώμενες ομάδες μικροοργανισμών στην υψηλότερη θερμοκρασία των 7.9 °C. Δεν παρατηρήθηκε φάση προσαρμογής των βακτηρίων σε καμία θερμοκρασία για τα φιλέτα και των δύο περιοχών. Εξαιρέση αποτέλεσαν τα οξυγαλακτικά βακτήρια που αναπτύχθηκαν σε MRS με pH 6.4, από τη περιοχή Α, στους 2.0 °C, με 35.47 ημέρες φάση προσαρμογής (Πίν. 6.4). Για τα φιλέτα της ίδιας θερμοκρασίας και περιοχής προέλευσης, ο μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης καταγράφηκε για τα υδροθειοπαραγωγά βακτήρια ακολουθούμενα από τα οξυγαλακτικά που αναπτύχθηκαν σε MRS με pH 6.4. Για τα φιλέτα από την περιοχή Β που αποθηκεύτηκαν στους 7.9 °C, τα οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS με τιμή pH 7.4 είχαν με διαφορά τον μεγαλύτερο ειδικό ρυθμό αύξησης ( $\mu_{max} = 0.156$ ; Πίν. 6.5).

Εν κατακλείδι, τόσο από τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης, όσο και από αυτά της μικροβιολογικής εξέτασης των φιλέτων, προέκυψε ότι η θερμοκρασία αποθήκευσης φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην επιβράδυνση της αλλοίωσης των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών και έτσι να παρατείνεται ραγδαία ο εμπορικός χρόνος ζωής. Η κυρίαρχη ομάδα μικροοργανισμών που διαφάνηκε να είναι υπεύθυνη για την αλλοίωση των φιλέτων (περιοχές Α και Β) και στις 2 θερμοκρασίες ήταν τα οξυγαλακτικά βακτήρια.

**Πίνακας 6.4.** Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα καπνιστής πέστροφας από την περιοχή Α, κατά τη συντήρηση σε συνθήκες κενού αέρα στους 2.0 και 7.9 °C. Οι τιμές (μέσοι όροι ± τυπ. απόκλιση, 6 επαναλήψεων) εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi (Baranyi & Roberts 1994).

T °C	Μικροοργανισμοί	Αρχικός πληθυσμός (log CFU/g±τυπ.απ.)	Τελικός πληθυσμός Nmax (log CFU/g±τυπ.απ.)	Πληθυσμός στην απόρριψη (log CFU/g±τυπ.απ.)	lag±τυπ.απ. (d)	μmax (d <sup>-1</sup> )
2	Ολικός μικροβιακός πληθυσμός	2.51 ± 0.73 (2.88)	6.30 ± 0.60 (6.25 ± 0.29)	6.43 ± 0.67 (6.24)	0.00	0.033
	<i>Pseudomonas</i> spp.	2.30 ± 0.43 (2.40)	5.04 ± 0.15 (5.12 ± 0.27)	5.33 ± 0.24 (5.12)	0.00	0.029
	Βακτήρια που παράγουν H <sub>2</sub> S	2.00 ± 0.00 (2.48)	5.82 ± 0.58 (5.73 ± 0.37)	5.71 ± 0.09 (5.73)	0.00	0.056
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (pH 5.4)	2.93 ± 0.67 (2.75)	5.32 ± 0.12 (5.59 ± 0.34)	5.37 ± 0.07 (5.59)	0.00	0.041
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (pH 6.4)	2.94 ± 0.72 (2.95)	5.22 ± 0.24 (5.57 ± 0.26)	5.46 ± 0.21 (5.56)	35.47	0.053
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (pH 7.4)	2.92 ± 0.62 (2.60)	5.38 ± 0.13 (5.78 ± 0.40)	5.44 ± 0.15 (5.78)	0.00	0.044
7.9	Ολικός μικροβιακός πληθυσμός	2.88 ± 0.55 (3.04)	8.01 ± 0.10 (8.01 ± 0.24)	8.04 ± 0.22 (8.01)	0.00	0.137
	<i>Pseudomonas</i> spp.	2.30 ± 0.43 (2.37)	4.76 ± 0.24 (5.05 ± 0.24)	5.33 ± 0.04 (5.05)	0.00	0.122
	Βακτήρια που παράγουν H <sub>2</sub> S	2.00 ± 0.00 (2.03)	7.65 ± 0.08 (7.37 ± 0.52)	7.32 ± 0.26 (7.37)	0.00	0.181
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (pH 5.4)	2.93 ± 1.31 (3.14)	7.93 ± 0.25 (7.92 ± 0.21)	7.84 ± 0.05 (7.84)	0.00	0.078
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (pH 6.4)	2.94 ± 0.69 (3.23)	8.10 ± 0.43 (8.16 ± 0.50)	7.99 ± 0.21 (8.12)	0.00	0.088
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (pH 7.4)	2.92 ± 0.86 (3.24)	8.42 ± 0.38 (8.30 ± 0.43)	8.02 ± 0.07 (8.28)	0.00	0.093

**Πίνακας 6.5.** Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα καπνιστής πέστροφας από την περιοχή Β, κατά τη συντήρηση σε συνθήκες κενού αέρα στους 2.0 και 7.9 °C. Οι τιμές (μέσοι όροι ± τυπ. απόκλιση, 6 επαναλήψεων) εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi (Baranyi & Roberts 1994).

T °C	Μικροοργανισμοί	Αρχικός πληθυσμός (log CFU/g±τυπ.απ.)	Τελικός πληθυσμός Nmax (log CFU/g±τυπ.απ.)	Πληθυσμός στην απόρριψη (log CFU/g±τυπ.απ.)	lag±τυπ.απ. (d)	μmax (d-1)
2	Ολικός μικροβιακός πληθυσμός	2.00 ± 0.00 (1.85)	5.94 ± 0.07 (5.61 ± 0.29)	5.69 ± 0.40 (5.60)	0.00	0.038
	<i>Pseudomonas</i> spp.	2.00 ± 0.00 (1.86)	4.55 ± 0.10 (4.58 ± 0.17)	4.80 ± 0.22 (4.58)	0.00	0.031
	Βακτήρια που παράγουν H <sub>2</sub> S	2.00 ± 0.00 (1.95)	4.78 ± 0.40 (4.76 ± 0.27)	4.49 ± 0.39 (4.57)	0.00	0.019
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (pH 5.4)	2.26 ± 0.37 (2.22)	5.98 ± 0.03 (6.13 ± 0.35)	5.66 ± 0.63 (5.74)	0.00	0.026
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (pH 6.4)	2.46 ± 0.19 (2.53)	5.95 ± 0.14 (5.96 ± 0.30)	5.41 ± 0.31 (5.62)	0.00	0.023
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (pH 7.4)	2.04 ± 0.06 (2.09)	6.01 ± 0.02 (6.14 ± 0.37)	5.44 ± 0.68 (5.74)	0.00	0.027
7.9	Ολικός μικροβιακός πληθυσμός	2.85 ± 0.82 (3.50)	7.85 ± 0.27 (8.06 ± 0.31)	7.19 ± 0.22 (6.93)	0.00	0.054
	<i>Pseudomonas</i> spp.	2.26 ± 0.37 (2.81)	5.10 ± 0.16 (5.26 ± 0.39)	5.47 ± 0.15 (5.23)	0.00	0.046
	Βακτήρια που παράγουν H <sub>2</sub> S	2.45 ± 0.64 (3.06)	5.37 ± 0.04 (5.97 ± 0.48)	6.23 ± 0.14 (5.97)	0.00	0.073
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (pH 5.4)	1.95 ± 0.30 (2.34)	6.28 ± 0.30 (5.62 ± 0.55)	5.84 ± 0.74 (5.62)	0.00	0.156
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (pH 6.4)	1.76 ± 0.40 (3.40)	6.54 ± 0.30 (6.74 ± 0.89)	5.79 ± 0.16 (5.91)	0.00	0.040
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (pH 7.4)	2.50 ± 0.45 (3.91)	6.57 ± 0.29 (6.59 ± 0.72)	5.99 ± 0.70 (6.12)	0.00	0.035

#### 6.3.4. Ταυτοποίηση με τη χρήση πρωτεωμικής ανάλυσης – MALDI Tof MS

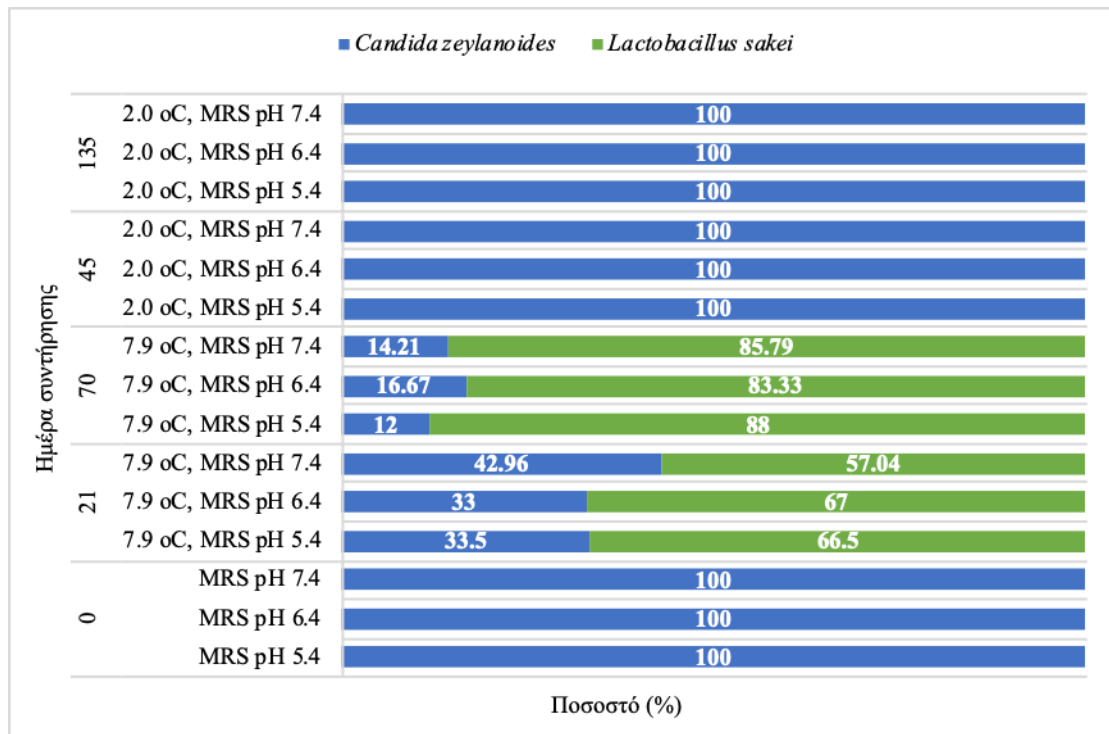
Συνολικά 567 αποικίες απομονώθηκαν από τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης), από 2 περιοχές και 2 θερμοκρασίες (2.0 και 7.9 °C) και αναλύθηκαν με MALDI Tof MS. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 231 και 135 αποικίες από τα φιλέτα της περιοχής A, στους 2.0 °C και 7.9 °C, αντίστοιχα. Ακόμη, 108 αποικίες απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από τα φιλέτα της περιοχής B, που συντηρούνταν στους 2.0 °C και 93 αποικίες από τα φιλέτα που βρίσκονταν στους 7.9 °C.

Από την ταυτοποίηση προέκυψε ότι 71 αποικίες ανήκαν στα *Enterococcus* spp., 383 στα *Candida* spp. και 113 στα *Lactobacillus* spp. εκ των οποίων κάποιες ήταν κοινές στα δείγματα των φιλέτων από τις διαφορετικές περιοχές. Στα φιλέτα από την περιοχή A, εντοπίστηκαν οι μικροοργανισμοί *Candida zeylanoides* και *Lactobacillus sakei*. Μεγαλύτερη ποικιλομορφία εμφανίστηκε στα φιλέτα από την περιοχή B, όπου εντοπίστηκαν οι μικροοργανισμοί, *Enterococcus faecalis*, *Candida zeylanoides*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Lactobacillus sakei* και *Lactobacillus curvatus* (Σχ. 6.5 και 6.6).

Αναλυτικά, στα φιλέτα από την περιοχή A, την ημέρα 0 (κοινή και για τις 2 θερμοκρασίες), το *C. zeylanoides* βρέθηκε να αποτελεί το 100% των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν στο MRS με pH 5.4, 6.4 και 7.4 (Σχ. 6.5). Στα φιλέτα που συντηρήθηκαν στους 7.9 °C, ο *L. sakei*, ήταν ο επικρατέστερος μικροοργανισμός έναντι του *C. zeylanoides* στα μέσα της συντήρησης (ημέρα 21) και την ημέρα οργανοληπτικής απόρριψης (ημέρα 70) (Σχ. 6.5). Στα φιλέτα στους 2.0 °C, το *C. zeylanoides* βρέθηκε να είναι ο κυριότερος μικροοργανισμός έναντι του *L. sakei* τις ημέρες 45 και 135 (Σχ. 6.5). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα

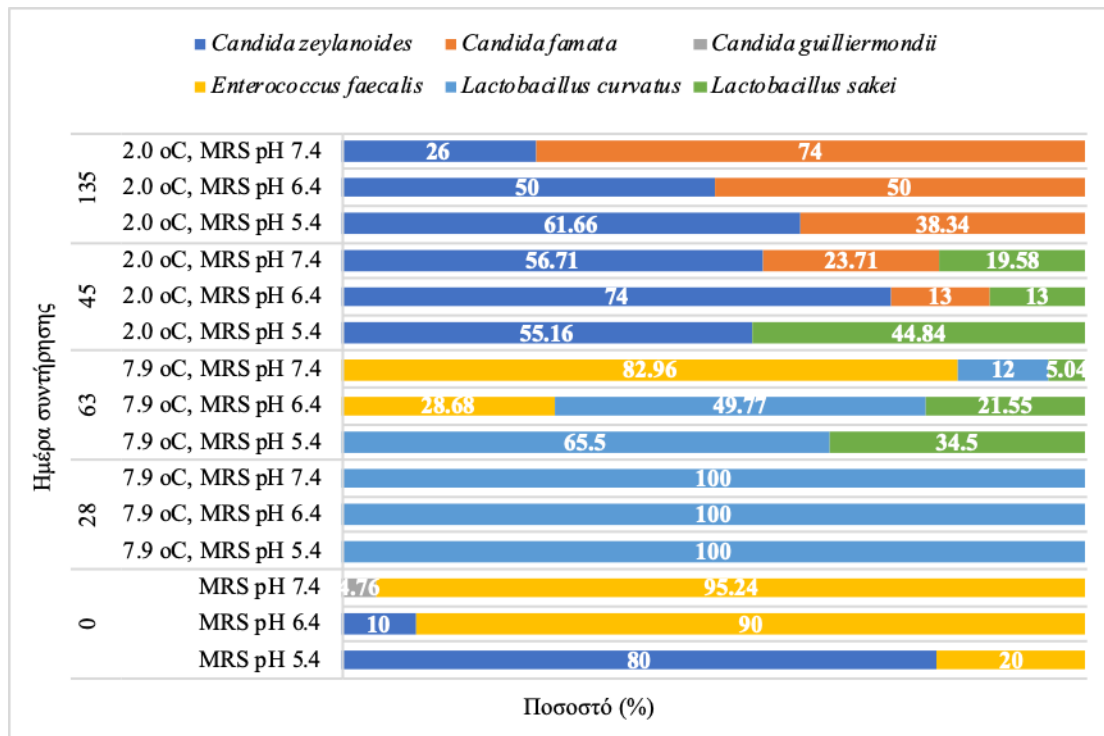
ποσοστά των αποικιών που ταυτοποιήθηκαν για κάθε μικροοργανισμό λόγω των διαφορετικών pH στο MRS από το οποίο απομονώθηκαν.

Για τα φιλέτα από την περιοχή B, για την κοινή ημέρα 0, βρέθηκαν πολύ υψηλά ποσοστά του *E. faecalis*, για τις αποικίες που απομονώθηκαν από το MRS με pH 6.4 και 7.4, καθώς στο τελευταίο ήταν η μοναδική περίπτωση όπου βρέθηκε το *C. guilliermondii* σε ποσοστό 4.76 % (Σχ. 6.6). Την 28<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης, ο *L. curvatus*, επικράτησε απόλυτα (100 %) στα φιλέτα που συντηρούνταν στους 7.9 °C. Ωστόσο, την ημέρα απόρριψης (63) των φιλέτων στους 7.9 °C, ο *L. curvatus* αποτέλεσε το 65.50 %, 49.77 % και 12.00 % των αποικιών που ταυτοποιήθηκαν από το MRS με pH 5.4, 6.4 και 7.4, αντίστοιχα (Σχ. 6.6). Οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί που αποτέλεσαν τους πιθανούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς την ημέρα 63 των φιλέτων από την περιοχή B στους 7.9 °C, ήταν ο *L. sakei* και ο *E. faecalis*. Την ημέρα 45, οι αποικίες των φιλέτων ταυτοποιήθηκαν ως *L. sakei*, *C. zeylanoides* και για πρώτη φορά ως *C. famata* (Σχ. 6.6). Τελικά, ο *C. famata*, την ημέρα αλλοίωσης (135), φάνηκε να επικρατεί, έναντι του *C. zeylanoides*, παρουσιάζοντας αναλογικά υψηλότερο ποσοστό ταυτοποίησης καθώς αυξάνονταν η τιμή του pH στο MRS (Σχ. 6.6).



**Σχήμα 6.5.** Ποσοστιαία κατανομή των μικροοργανισμών που ταυτοποιήθηκαν από τα φιλέτα προερχόμενα από την Βιομηχανία Α, κατά τη διάρκεια συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό αέρα στους 2.0 και 7.9 °C. Όλες οι αποικίες απαριθμήθηκαν και απομονώθηκαν από επιλεκτικό υλικό MRS με τιμές pH 5.4, 6.4 και 7.4. Η ημέρα 0 ήταν κοινή για τα φιλέτα, πριν την αποθήκευσή τους.



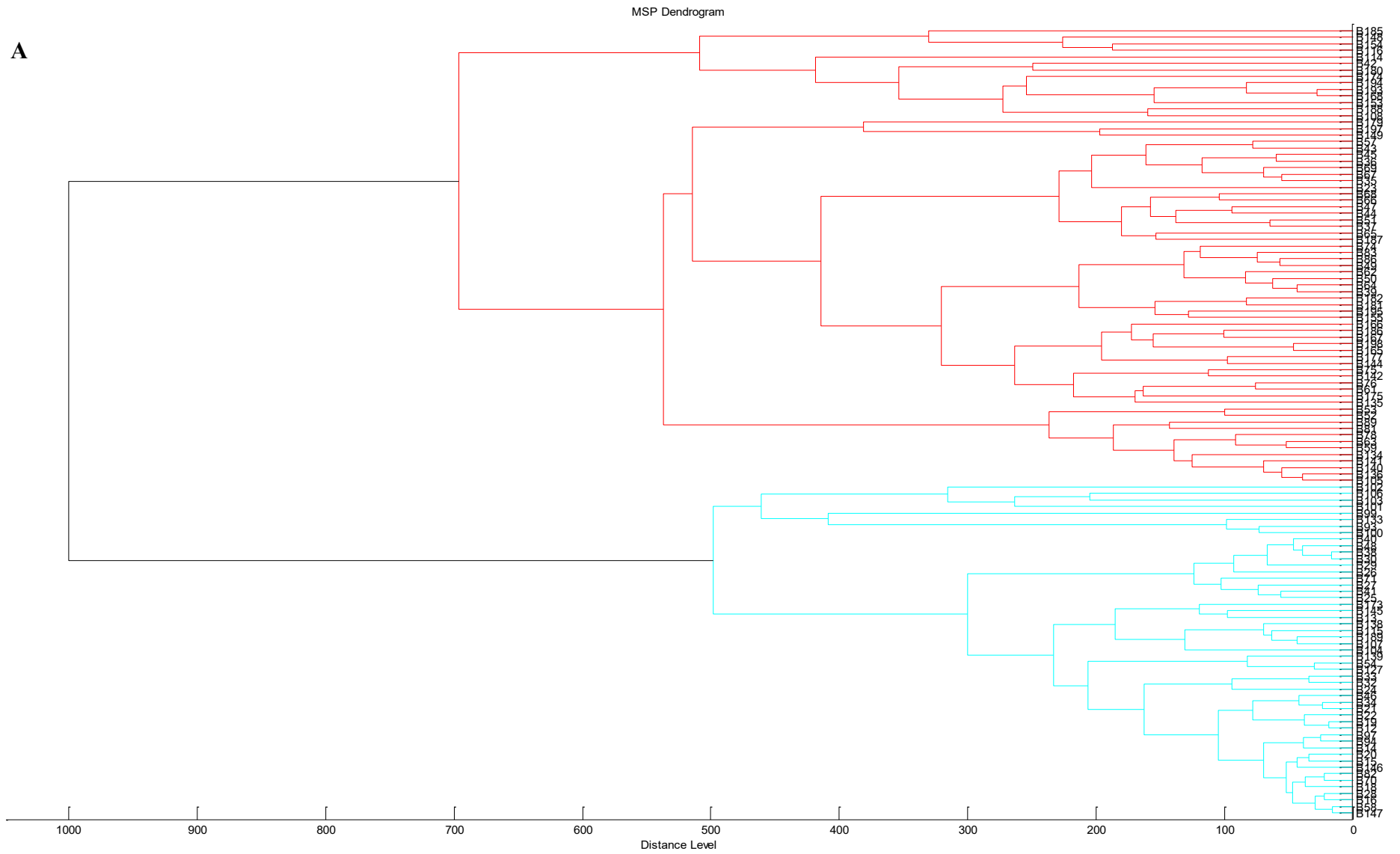


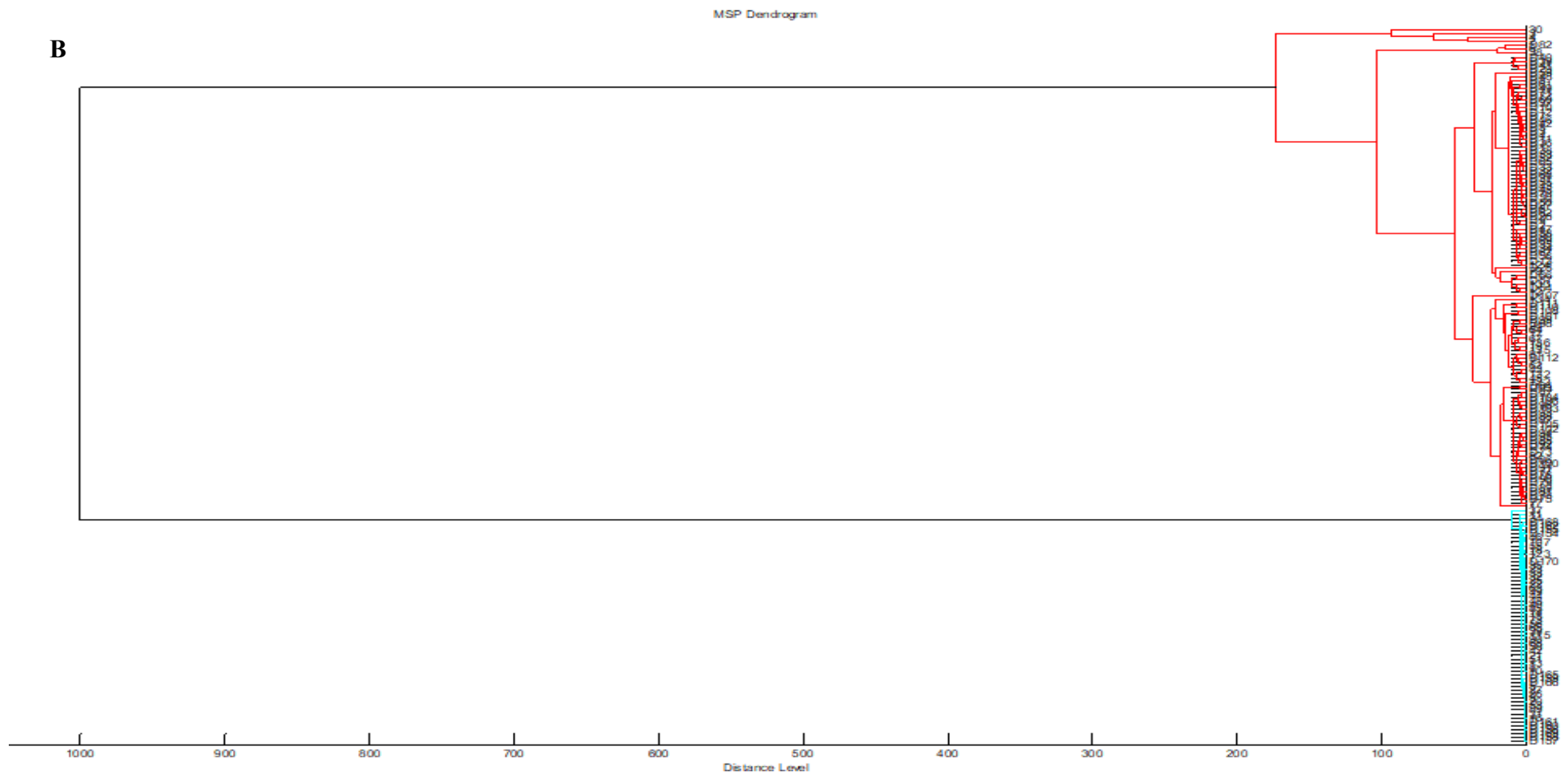
**Σχήμα 6.6.** Ποσοστιαία κατανομή των μικροοργανισμών που ταυτοποιήθηκαν από τα φιλέτα προερχόμενα από την Βιομηχανία Β, κατά τη διάρκεια συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό αέρα στους 2.0 και 7.9 °C. Όλες οι αποικίες απαριθμήθηκαν και απομονώθηκαν από επιλεκτικό υλικό MRS με τιμές pH 5.4, 6.4 και 7.4. Η ημέρα 0 ήταν κοινή για τα φιλέτα, πριν την αποθήκευσή τους.

Τα MSP δενδρόγραμμα φασμάτων αναφοράς που παρουσιάζονται στα σχήματα 6.7 και 6.8, σχηματίστηκαν για τις αποικίες που ταυτοποιήθηκαν παραπάνω. Όπως φαίνεται στο σχήμα 6.7 (A), οι μικροοργανισμοί διαχωρίστηκαν σε δύο κύριες συστάδες. Στην πρώτη (κόκκινη) κυριάρχησαν εξ ολοκλήρου τα *C. zeylanoides* ενώ στη δεύτερη συστάδα (ανοιχτό μπλε χρώμα) τα *L. sakei* (Σχ. 6.7 A). Στο σχήμα 6.7 (B), οι δύο συστάδες που σχηματίστηκαν και είχαν πολύ μικρή απόσταση μεταξύ τους, αποτελούνταν μόνο από το είδος *C. zeylanoides*. Αυτός ο διαχωρισμός μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη διαφορετικών στελεγχών του είδους *C. zeylanoides*.

Στο σχήμα 6.8 (A), έγινε ξεκάθαρη ομαδοποίηση των μικροοργανισμών που ταυτοποιήθηκαν σε τρεις βασικές συστάδες. Στην πρώτη (ανοιχτό πράσινο χρώμα), επικράτησε το είδος *C. famata*, στη δεύτερη (μπλε χρώμα) το *C. zeylanoides* και στην

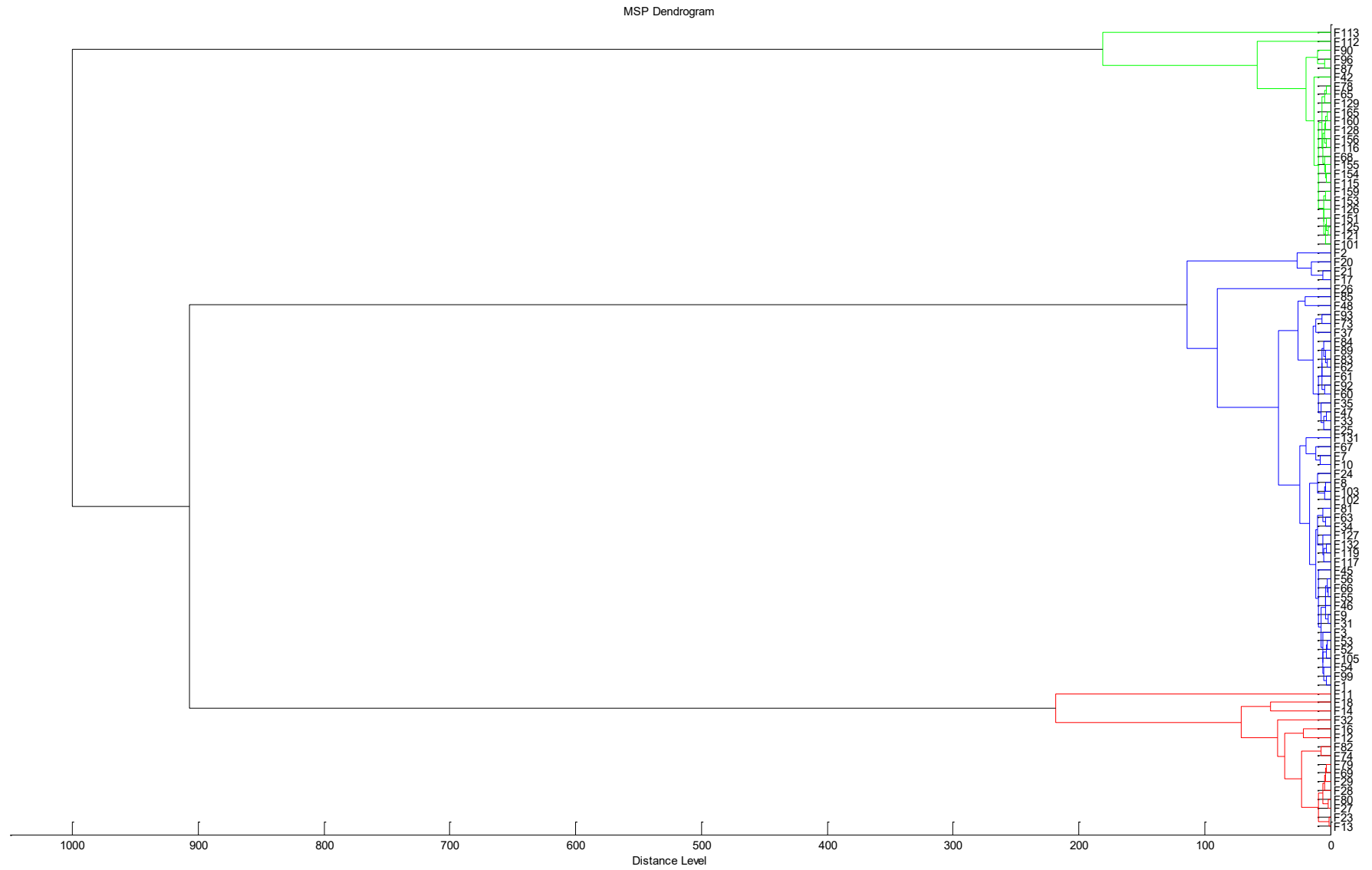
τρίτη (κόκκινο χρώμα) το *L. sakei* (Σχ. 6.8 Α). Τέλος, στο σχήμα 6.8 (Β), οι μικροοργανισμοί που ταυτοποιήθηκαν από τα φιλέτα, ταξινομήθηκαν σε δύο συστάδες με κυρίαρχο είδος το *L. curvatus* στη συστάδα με το κόκκινο χρώμα και το *E. faecalis* στη συστάδα με ανοιχτό μπλε χρώμα. Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις οι καταγραφόμενες αποστάσεις μεταξύ των πρωτεϊνικών προφίλ των μικροοργανισμών ήταν πολύ μικρές και ιδιαίτερα στην περίπτωση του *E. faecalis*.

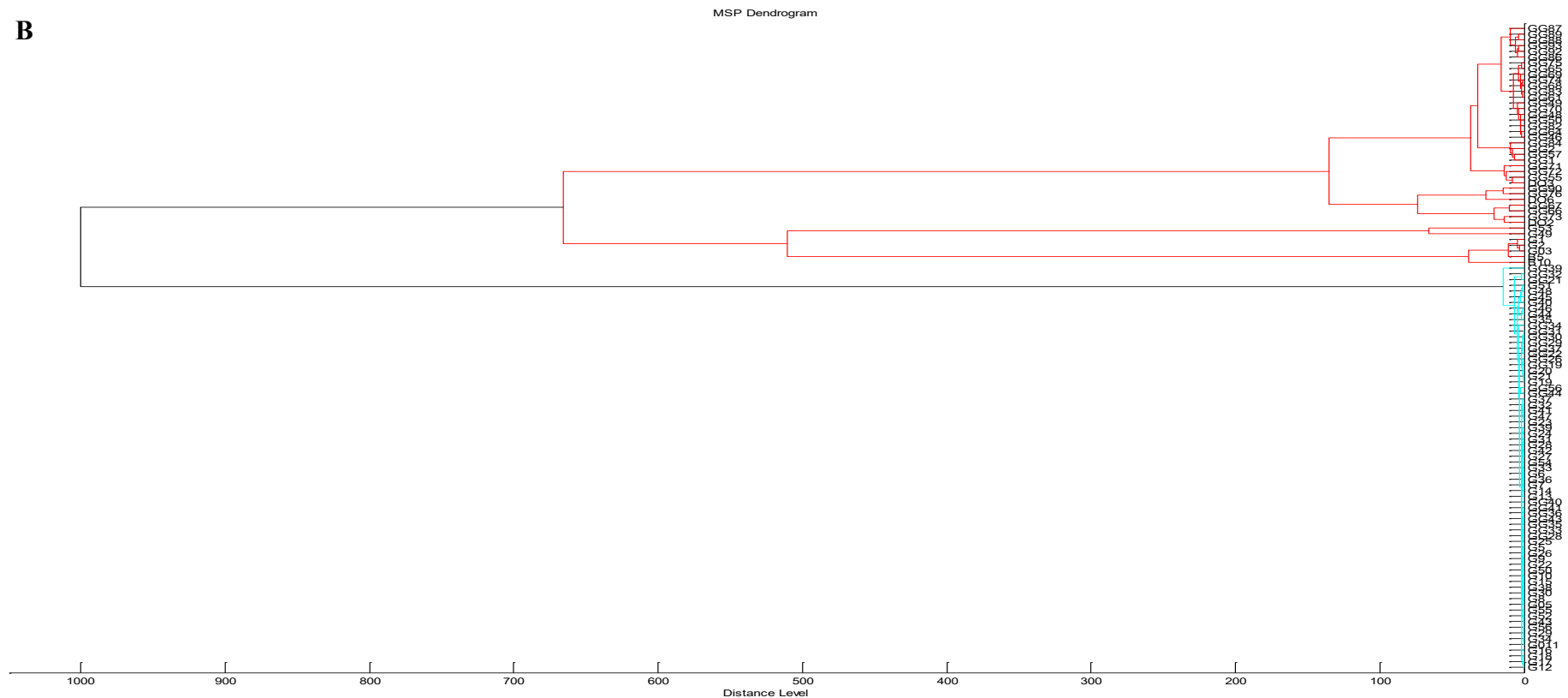




**Σχήμα 6.7.** MSP δενδρόγραμμα φασμάτων αναφοράς για τις αποικίες που ταυτοποιήθηκαν από τα φιλέτα προερχόμενα από την περιοχή της κεντρικής Μακεδονίας A) στους 2.0 °C και B) στους 7.9 °C. Η κωδικοποίηση των μικροοργανισμών έχει ως εξής: *Candida zeylanoides* (1-4, 6, 12, 17, 19, 24, 30, 38, 43, 45, 62, 64, 67, 71, 77, 79, 81-82, 122, 124, 132-136, D2-D115, B12-B208), *Lactobacillus sakei* (5, 7-11, 13-16, 18, 20-23, 25-27, 31-37, 39-42, 44, 46, 48-56, 63, 65, 68, 73, 85, 89-90, 107, 115, 123, D154-D170). Οι αποστάσεις εμφανίζονται σε σχετικές μονάδες.

A



**B**

**Σχήμα 6.8.** MSP δενδρόγραμμα φασμάτων αναφοράς για τις αποικίες που ταυτοποιήθηκαν από τα φιλέτα προερχόμενα από την περιοχή της Πελοποννήσου A) στους 2.0 °C και B) στους 7.9 °C. Η κωδικοποίηση των μικροοργανισμών έχει ως εξής: *Lactobacillus curvatus* (GG1-GG2, GG46, GG48-GG50, GG57, GG61-GG93), *Lactobacillus sakei* (F11-F14, F16, F18, F23, F27-F29, F32, F69, F74, F79-F80, F82), *Candida zeylanoides* (F1-F3, F7-F10, F17, F20-F21, F24-F26, F31, F33-F38, F45-F48, F52-F56, F60-F63, F66-F67, F73, F81, F83-F85, F89, F92-F93, F99-F105, F117, F119, F120, F123, F127, F131-F132, F168), *Candida famata* (F42, F65, F68, F78, F87, F90, F96, F101, F112-F113, F115-F116, F121, F125-F126, F128-F129, F151, F153-F156, F159-F160), *Enterococcus faecalis* (G5-G56, GG19, GG21-GG22, GG26-GG44, GG56, G05, G011). Οι αποστάσεις εμφανίζονται σε σχετικές μονάδες.

#### 6.4. Συζήτηση

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και ο ρυθμός αύξησης, επηρεάστηκε από τη θερμοκρασία, το pH, το NaCl και την ενεργότητα ύδατος ( $a_w$ ) των φιλέτων καθώς όπως αναφέρουν και άλλες μελέτες είναι σημαντικοί παράγοντες που συντελούν στην τελική διάρκεια ζωής των τροφίμων (Nychas et al., 2007; Comi, 2017). Πράγματι στη μελέτη που πραγματοποίησαν οι Boziaris et al. (2013) αναφέρεται ότι οι διαφορές σε αυτούς τους παράγοντες (pH, NaCl,  $a_w$  κ.ά.) επηρέασαν σημαντικά την τελική διάρκεια ζωής διάφορων επεξεργασμένων αλιευτικών προϊόντων, όπως μαριναρισμένες σαρδέλες (Gökoğlu et al., 2004), παστές αντζούγιες (Karaçam et al., 2002), παραδοσιακά παστά ψάρια, γνωστά ως λακέρδα (Erkan et al., 2009) αλλά και καπνιστά αλιευτικά προϊόντα (ψυχρής ή θερμής κάπνισης) (Hansen et al., 1995; Leroi et al., 2000; Kilinc & Cakli, 2005).

Ο εμπορικός χρόνος ζωής (shelf life) των φιλέτων καπνιστής πέστροφας και από τις δύο περιοχές, από τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής εξέτασης των φιλέτων, προέκυψε ότι επηρεάστηκε σημαντικά από τη θερμοκρασία αποθήκευσης που φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην επιβράδυνση της αλλοίωσης. Ο εμπορικός χρόνος ζωής των αλιευτικών προϊόντων που συντηρούνται υπό ψύξη, μπορεί να είναι από μερικές ημέρες έως και μερικούς μήνες (Gill & Molin, 1991; Blickstad & Molin, 1983; Boziaris et al., 2013). Στην έρευνα των Shin et al. (2008), η OMX στα φιλέτα καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης) σε συσκευασία κενού, που συντηρήθηκαν στους 3.0 °C έφτασε τους 3.31 log CFU/g στις 30 ημέρες (τελευταία ημέρα καταγραφής) και τους 7.40 log CFU/g στους 7.0 °C. Στην παρούσα διατριβή, η OMX των φιλέτων καπνιστής πέστροφας στους 2.0 °C ακόμη και μετά από 150 ημέρες και για τις δύο περιοχές δεν ξεπέρασε το μικροβιολογικό όριο απόρριψης των καπνιστών αλιευτικών προϊόντων (7.00 log CFU/g; Ficicilar & Genccelep, 2017) σε αντίθεση με

τα αποτελέσματα των Tosun & Özden (2014) που βρήκαν ότι έπειτα από 42 ημέρες στους 2.0 °C, η OMX των φιλέτων καπνιστής πέστροφας (σε κενό) έφτασε τους  $7.95 \pm 0.46 \log \text{ CFU/g}$ . Η υψηλότερη θερμοκρασία συντήρησης (7.9 °C) των φιλέτων, οδήγησε στην απόρριψη τους έπειτα από 70 και 63 ημέρες (φιλέτα από την περιοχή Α και Β, αντίστοιχα), ενώ στη μελέτη των Cakli et al. (2006), ο εμπορικός χρόνος ζωής των φιλέτων καπνιστής πέστροφας βρέθηκε να είναι 40 ημέρες. Ο εμπορικός χρόνος ζωής αυτών των προϊόντων που δίνεται από τον παραγωγό είναι 5 μήνες σε θερμοκρασίες 0.0 έως 2.0 °C, αποδεικνύοντας ότι η απόρριψη των φιλέτων μας στους 2.0 °C έπειτα από 135 ημέρες, είναι εντός των αποδεκτών ορίων. Οι διαφορές που διαπιστώθηκαν στον εμπορικό χρόνο ζωής των φιλέτων από μελέτη σε μελέτη συγκριτικά με την παρούσα διατριβή, μπορεί να οφείλονται στη χαμηλή φρεσκότητα των υπό εξέταση φιλέτων, καθώς είχαν υψηλό αρχικό πληθυσμό. Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώνεται από τα ευρήματα των Boziaris et al. (2013), που αναφέρουν ότι η διάρκεια ζωής των φιλέτων καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης) στους 4.0 °C με χαμηλό αρχικό μικροβιακό φορτίο ( $< 1.00 \log \text{ CFU/g}$ ) ήταν 73 ημέρες.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όπου το χαρακτηριστικό της οσμής (καπνιστού προϊόντος) παρέμεινε σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα ακόμη και μετά το πέρας της απόρριψης των φιλέτων, οι Shin et al. (2008), αναφέρουν ότι, το χαρακτηριστικό άρωμα του καπνού, στα φιλέτα καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης), επικάλυπτε τις οσμές που μπορεί να εμφανίζονταν από τους ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς κατά τη συντήρησή τους στους 3.0 και 7.0 °C. Επίσης, το χρώμα των φιλέτων καπνιστής πέστροφας, παρέμεινε εντός αποδεκτών ορίων ακόμη και μετά από 30 ημέρες συντήρησης, στους 3.0 και 7.0 °C, όπως συνέβη και στα φιλέτα της παρούσας μελέτης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στους 2.0 και 7.9 °C.



Όσον αφορά τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, όμοιες τιμές pH και ενεργότητας ύδατος ( $a_w$ ), αναφέρουν και άλλες μελέτες σε φιλέτα καπνιστής πέστροφας κατά τη συντήρησή τους σε θερμοκρασίες ψύξης (Jemni & Keusch, 1992; Cakli et al., 2006; Ficicilar & Genccelep, 2017). Η μείωση της τιμής του pH, όπου παρατηρήθηκε κατά την αποθήκευση των φιλέτων καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης) μπορεί να οφείλεται στην αποσύνθεση του γλυκογόνου, της φωσφορικής κρεατίνης και την διάσπαση του CO<sub>2</sub> στον μυϊκό ιστό των φιλέτων, ενώ η ακολουθούμενη αύξηση οφείλεται στην παραγωγή πτητικών ουσιών ως αποτέλεσμα της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών κατά την αύξηση των μικροοργανισμών και των ενδογενών ενζύμων (Ruiz-Capillas & Moral, 2001; Ficicilar & Genccelep, 2017). Ακόμη η μείωση του pH των φιλέτων, που παρατηρήθηκε παράλληλα με την αύξηση της OMX, μπορεί να οφείλεται στην παραγωγή οξέων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια που κυριάρχησαν στη σάρκα των δειγμάτων κατά τη συντήρησή τους και στις 2 θερμοκρασίες. Οι τιμές της υγρασίας της σάρκας των καπνιστών φιλέτων πέστροφας με τη μέθοδο της θερμής κάπνισης, συμφωνούν με τα ευρήματα άλλων ερευνών που αναφέρουν, ποσοστό υγρασίας 66.70 % (Tosun, & Özden, 2014) και 67.00 % (Tokur, 2007). Οι παρατηρούμενες διακυμάνσεις στις τιμές των φυσικοχημικών παραμέτρων των φιλέτων εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η μέθοδος και ο χρόνος καπνισμού των φιλέτων, η μέθοδος αλάτισης, το πάχος των φιλέτων κ.α. (Ficicilar & Genccelep, 2017). Η μικρή αύξηση που παρατηρήθηκε στην τιμή του άλατος στο τέλος συντήρησης των φιλέτων μπορεί να οφείλεται στο εύρος της καταγραφόμενης  $a_w$  τέτοιου είδους καπνιστών προϊόντων που συνήθως κυμαίνεται από 0.93 – 0.98 (Cakli et al., 2006; Rizo et al., 2013; Ficicilar & Genccelep, 2017) και μπορεί να επηρεάζει την αλατότητα των φιλέτων.

Η απαρίθμηση των βακτηρίων διερευνήθηκε σε MRS με διαφορετικές τιμές pH, καθώς όπως είναι γνωστό η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων επηρεάζεται σημαντικά από το pH του θρεπτικού υποστρώματος (Todorov et al. 2012; Zhang et al. 2012; Zhou et al. 2015). Πράγματι, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο MRS με pH 7.4, ήταν υψηλότερος σε σχέση με τους πληθυσμούς που αναπτύχθηκαν σε MRS με pH 5.4 και 6.4. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών στο MRS με υψηλό pH, ξεπέρασε τον πληθυσμό της OMX, διαπιστώνοντας πως τα οξυγαλακτικά βακτηρία πιθανόν να αργούν να αναπτυχθούν σε γενικής χρήσης υλικά όπως το TSA (Parlapani et al. 2014). Στα ήπια επεξεργασμένα αλιευτικά προϊόντα, όπως είναι τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης), που συντηρούνται σε συσκευασία υπό κενό αέρα, επωφελείται η ανάπτυξη των Gram θετικών βακτηρίων όπως είναι τα οξυγαλακτικά, έναντι των Gram αρνητικών ψυχρότροφων βακτηρίων (Gram & Huss, 1996; Paludan-Müller et al., 1998). Όπως είναι γνωστό, εμπόδια όπως το χαμηλό pH και η ενεργότητα νερού ( $a_w$ ) των επεξεργασμένων αλιευτικών προϊόντων, παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των Gram αρνητικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, όπως είναι τα *Pseudomonas* spp. τα οποία επικρατούν στα νωπά ψάρια, ενώ ευνοούν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) καθώς και διάφορα είδη ζυμών (in't Veld, 1996; Jay et al., 2005; Gram, 2005, Boziaris et al 2013). Πράγματι, το *L. sakei* βρέθηκε να επικρατεί στους 7.9 °C, για τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας της περιοχής Α τις ημέρες 21 και 70 και το *L. curvatus* για τα φιλέτα της περιοχής Β την 28<sup>η</sup> ημέρα. Τα *Lactobacillus* spp., έχουν βρεθεί να είναι η κυρίαρχη ομάδα αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε διάφορα καπνιστά αλιεύματα, όπως καπνιστό σολομό και πέστροφα (ψυχρής κάπνισης; Hansen et al., 1995; Hansen & Huss, 1999; Lyhs, 1999) αλλά και σε άλλα επεξεργασμένα αλιευτικά προϊόντα, όπως είναι οι μαριναρισμένες

αντσούγιες, σαρδέλες και ρέγκες (Fuselli et al., 1998; Lyhs et al., 2001a; Kilinc & Cakli, 2005; Sallam, 2008). Τα Gram θετικά βακτήρια της οικογένειας των Εντερόκοκκων, απομονώνονται συχνά από τις ιχθυοκαλλιέργειες και αποτελούν μία από τις πιο κοινές αιτίες πρόκλησης ασθενειών στην υδατοκαλλιέργεια παγκοσμίως (Martins et al., 2008; Savaşan et al., 2016). Το *E. faecalis*, απαντάται συχνότερα στα ψάρια και είναι υπεύθυνο για τον μεγαλύτερο αριθμό των προκαλούμενων ασθενειών (Rahman et al., 2017). Τα *Enterococcus* spp. εκτός από τους ζωντανούς οργανισμούς μπορεί συχνά να απομονώνονται από το περιβάλλον αλλά και από διάφορα τρόφιμα (Pinto et al., 1999; Harwood et al., 2001; Savaşan et al., 2016). Σε συμφωνία με αυτό, η απομόνωση του *E. faecalis*, από τα φιλέτα που μελετήσαμε θεωρήθηκε ως περιβαλλοντική επιμόλυνση.

Τα στελέχη ζυμών που ταυτοποιήθηκαν στο παρόν κεφάλαιο ανήκουν όλα στα *Candida* spp., που αποτελούν το ¼ όλων των γνωστών ζυμών και λόγω της υψηλής τους ποικιλομορφίας συχνά οφείλονται για την αλλοίωση μίας ευρείας γκάμας τροφίμων (Blackburn, 2006). Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι, τα *Lactobacillus* spp. και κάποιες ζύμες έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί ως αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί από καπνιστό σολομό (ψυχρής κάπνισης; Hansen & Huss, 1999; Leroi et al., 2001; Boziaris et al., 2013). Ορισμένα είδη του γένους *Candida* είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (έως 11 %; Campos et al., 2015) και μπορούν να αναπτύσσονται προκαλώντας αλλοίωση των τροφίμων σε θερμοκρασίες μικρότερες από 0.0 °C (Howell, 2016) τόσο σε αερόβιες όσο και αναερόβιες συνθήκες (Modi, 2009). Οι πληροφορίες αυτές δικαιολογούν τη συχνή απομόνωση των *Candida* spp. (67.50 % του συνόλου) από τα φιλέτα μας όπου τα επίπεδα αλατότητας αλλά και η θερμοκρασία αποθήκευσης ήταν ευνοϊκά. Όντως τα πιο κοινά απομονωμένα είδη ζυμών από τα τρόφιμα είναι τα *Candida* και *Pichia*

(Fleet, 2006). Επίσης, έχει βρεθεί ότι τα *Candida* spp., εμπλέκονται και συνεισφέρουν στην ανάπτυξη του χαρακτηριστικού αρώματος και χρώματος κατά την ωρίμανση λουκάνικων και σαλαμιού (Lücke 1987; Samelis et al., 1993). Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι κατά το στάδιο ωρίμανσης του τυριού, και κατά την παραγωγή του γάλακτος με κεφίρ και ξινόγαλου τύπου "koumiss", το *C. zeylanoides*, είναι μεταξύ των κυρίαρχων και πιο σημαντικών μικροοργανισμών αυτών των προϊόντων (Fleet 1990; Frohlich-Wyder 2003). Τέλος, το *C. famata* που βρέθηκε και ταυτοποιήθηκε από τα φιλέτα μας χρησιμοποιείται ως καλλιέργεια εκκινητής (starter culture) μαζί με άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια όπως το *L. sakei* και το *L. curvatus* (επίσης απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν) για την ζύμωση λουκάνικων (Adams & Moss, 2008).

Στην μελέτη που πραγματοποίησαν οι Hansen & Huss (1998) συγκρίνοντας προϊόντα καπνιστού σολομού (ψυχρής κάπνισης) από διάφορες χώρες βρήκαν ότι στα φιλέτα καπνιστού σολομού από τη Νορβηγία, τα Νησιά Φερόε και τη Χιλή, το *L. curvatus* κυριάρχησε των άλλων οξυγαλακτικών βακτηρίων που βρέθηκαν, τα οποία ήταν το *L. sakei* το *L. plantarum* και το *Carnobacterium maltaromaticum*. Ομοίως, το *L. curvatus* ήταν ο κυρίαρχος μικροοργανισμός στα φιλέτα από την περιοχή Β στους 7.9 °C, για την 28<sup>η</sup> ημέρα και την ημέρα οργανοληπτικής απόρριψης (63<sup>η</sup>), επικρατώντας των *L. sakei* και *C. zeylanoides*, στις περιπτώσεις όπου είχε απομονωθεί από MRS με τιμή pH 5.4 και 6.4. Ωστόσο, οι Leroi et al. (1998), βρήκαν ότι το *C. maltaromaticum* επικράτησε στα φιλέτα καπνιστού σολομού που προέρχονταν από την περιοχή της Γαλλίας. Αναφέρουν επίσης, ότι εκτός από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, πολλά είδη μικροοργανισμών αλλά και ζυμών μπορεί να απαντώνται στα καπνιστά φιλέτα σολομού (ψυχρής κάπνισης). Το *L. sakei*, αποτελεί έναν από τους κυριότερους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς για τα διάφορα επεξεργασμένα αλιευτικά προϊόντα

και ειδικά για τα καπνιστά (Joffraud et al., 2001; Lyhs et al., 2002; Løvdal, 2015). Αναφορικά με το *L. sakei*, επικράτησε στα φιλέτα από την περιοχή Α, την 21<sup>η</sup> ημέρα και την 70<sup>η</sup> (ημέρα αλλοίωσης) στους 7.9 °C. Όντως κατά τη συντήρηση ολόκληρων ιχθύων καπνιστής πέστροφας (ψυχρής κάπνισης), σε συσκευασία υπό κενό αέρα, στους 4.0 °C και 8.0 °C, με τη χρήση μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης των μικροοργανισμών, το *L. sakei*, το *L. curvatus* και το *C. piscicola*, βρέθηκαν να είναι οι 3 κυριότερες ομάδες αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (Lyhs et al., 1999). Επίσης, στην πρόσφατη μελέτη των Mejlholm & Dalgaard (2013), το *L. sakei* και το *L. curvatus* ταυτοποιήθηκαν μέσω αλληλούχισης του γονιδιώματος 16S rDNA, ως οι κυριότεροι μικροοργανισμοί του φυσικού μικροβιώματος των καπνιστών φιλέτων σολομού και γλώσσας (Γροιλανδίας).

Συμπερασματικά, ο κυριότερος παράγοντας που επηρέασε την τελική διάρκεια ζωής των φιλέτων καπνιστής πέστροφας, φάνηκε να είναι η θερμοκρασία αποθήκευσης, καθώς στους 2.0 °C τα φιλέτα από τις περιοχές Α και Β, απορρίφθηκαν μετά από 135 ημέρες και στους 7.9 °C χρειάστηκαν 70 και 63 ημέρες για την οργανοληπτική τους απόρριψη. Επιπλέον, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φιλέτων επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία αποθήκευσης, ενώ διαφορές παρατηρήθηκαν και στη μικροβιακή σύνθεση των φιλέτων ανάλογα και με την περιοχή προέλευσής τους. Λαμβάνοντας υπόψιν, την ταυτοποίηση με τη χρήση πρωτεωμικής ανάλυσης (MALDI Tof – MS), οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί ήταν το *C. zeylanoides* (κυρίως στους 2 °C) και το *L. sakei* (κυρίως στους 7.9 °C) στα φιλέτα της περιοχής Α, ενώ μικροοργανισμοί του γένους *Candida* (*C. famata*, *C. guilliermondii*), *Lactobacillus* (*L. curvatus*) και *Enterococcus* (*E. faecalis*) βρέθηκαν στα φιλέτα της περιοχής Β.

## Κεφάλαιο 7. Επίδραση του μικροβιακού πληθυσμού των φιλέτων καπνιστής πέστροφας στη συμπεριφορά του *L. monocytogenes*

### 7.1. Εισαγωγή

Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση των ψαριών και των αλιευτικών προϊόντων, αποτελούνται κυρίως από διάφορα ψυχρότροφα Gram αρνητικά ραβδόμορφα βακτήρια, δυνητικά ή και προαιρετικά αναερόβια, που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Brochothrix*, LAB κ.ά. (Comi & Iacumin, 2012; Comi, 2017; Boziaris & Parlapani, 2017). Ωστόσο, η επεξεργασία ενός τροφίμου, η θερμοκρασία αποθήκευσης, η συσκευασία του αλλά και ο χρόνος ζωής του καθορίζουν ποιοι μικροοργανισμοί θα επικρατήσουν τελικά (Ercolini et al., 2011). Απουσία οξυγόνου, σε αναερόβιες συνθήκες και στα τρόφιμα όπως είναι τα καπνιστά έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, κυριαρχούν τα *Lactobacillus* spp. (Hansen et al., 1998; Sikorski & Kolodziejaska, 2002; Boziaris et al., 2013).

Στα τρόφιμα, οι μικροβιακές αλληλεπιδράσεις, μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στην τύχη των παθογόνων που τα επιμολύνουν, όπως είναι και το *L. monocytogenes* (Buchanan & Bagi, 1999; Gram et al., 2002; Haruta et al., 2009). Συγκεκριμένα, το *L. sakei* παρουσιάζει υψηλή ανθεκτικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες και υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση των αλιευτικών προϊόντων κυρίως λόγω της παραγωγής οξέων που αναστέλλουν τα παθογόνα βακτήρια ή τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (Champomier-Vergès et al., 2001; Winkelströter et al., 2011). Πολυάριθμες έρευνες, έχουν επικεντρωθεί στη διερεύνηση του ανταγωνισμού των οξυγαλακτικών και άλλων βακτηρίων σε μόνο-

και πολυκαλλιέργειες, έναντι του ψυχρότροφου παθογόνου *L. monocytogenes* (Castellano et al., 2008; Ye et al., 2014; Saraoui et al., 2016).

Ωστόσο, ένα ακόμη σημαντικό πρόβλημα που θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν κατά την διεξαγωγή παρόμοιων μελετών είναι η διερεύνηση και κατανόηση της συμπεριφοράς των ανθεκτικότερων κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*. Είναι σημαντικό να γίνετε εκτίμηση της συμπεριφοράς των κυττάρων βιοϋμενίων του παθογόνου, στην επιφάνεια του τροφίμου, όπου αναπτύσσονται αλληλεπιδράσεις με τους μικροοργανισμούς που απαρτίζουν το φυσικά εμφανιζόμενο μικροβίωμα του τροφίμου, όπως είναι οι ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί. Τα βιοϋμενία που σχηματίζονται στη φύση αποτελούνται από περισσότερα από ένα στελέχη του *L. monocytogenes* και είναι πιο σταθερά (Giaouris, 2012). Για τον λόγο αυτό τα κύτταρα βιοϋμενίων, προήλθαν από μίγμα διαφορετικών στελεχών του παθογόνου προσομοιάζοντας καλύτερα τις πραγματικές συνθήκες εύρεσης στο πραγματικό περιβάλλον αλλά και στο τρόφιμο.

Στόχος του εν λόγω κεφαλαίου ήταν η διερεύνηση της πιθανής ανταγωνιστικής συμπεριφοράς των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης), έναντι των πλαγκτονικών και κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, χρησιμοποιήθηκαν στείρα μοντέλα υποστρώματος από ζωμό φιλέτων καπνιστής πέστροφας, προσομοιάζοντας τις πραγματικές συνθήκες. Η μελέτη της συμπεριφοράς των κυττάρων του *L. monocytogenes* είναι ιδιαίτερης σημασίας για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων καταπολέμησης του παθογόνου και δεν έχει πραγματοποιηθεί ποτέ σε στερεά μοντέλα φιλέτων καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης).

## **7.2. Υλικά και Μέθοδοι**

### **7.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός**

Στο παρόν Κεφάλαιο έγινε διερεύνηση της ανταγωνιστικής συμπεριφοράς που μπορεί να παρουσιάζεται μεταξύ των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας (βλέπε Κεφ. 6) και του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes*. Για την καλύτερη εκτίμηση της πραγματικής κατάστασης, μελετήθηκε ο ανταγωνισμός των πλαγκτονικών και κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, όπως και των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (AM) σε πραγματικά φιλέτα καθώς και σε μόνο- και πολυκαλλιέργειες, σε μοντέλα ζωμού καπνιστής πέστροφας.

### **7.2.2. Προέλευση δειγμάτων**

Οι πληροφορίες για την προέλευση των φιλέτων δίνονται στο Κεφάλαιο 6.

### **7.2.3. Μικροβιακά στελέχη**

Μίγμα διαφόρων οροτύπων του *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία πλαγκτονικών καθώς και καλά σχηματισμένων κυττάρων βιοϋμενίων (έπειτα από 8 ημέρες επώαση), όπως περιεγράφηκε στο Κεφάλαιο 3 (βλέπε 3.2). Κατόπιν τα κύτταρα του *L. monocytogenes* (πλαγκτονικά και βιοϋμένια) χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση του ανταγωνισμού τους παρουσία των AM που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν όπως περιεγράφηκε στο Κεφάλαιο 6. Συγκεκριμένα, οι *L. sakei*, *L. curvatus*, *C. zeylanoides* και *C. famata* που είχαν αποθηκευτεί στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (σε μικροφιαλίδια τύπου “bead vials”), ανανεώθηκαν δύο φορές για να διασφαλιστεί ότι θα βρίσκονται στην ίδια φυσιολογική κατάσταση μετά την υπερκατάψυξη, χωριστά σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν θρεπτικό μέσο



αύξησης de Mann, Rogosa, Sharpe Broth (MRS broth; Lab M; International Diagnostics Group Plc, Bury, Lancashire, UK) και επώστηκαν για 48 ώρες και 72 ώρες στους 25 °C, για τα *Candida* spp. και τα *Lactobacillus* spp., αντίστοιχα. Κατόπιν, συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (6770 ×g για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου), ξεπλύθηκαν εις διπλούν και επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε αποστειρωμένο διάλυμα 0.85 % (w/v) NaCl.

#### **7.2.4. Προετοιμασία στερεών μοντέλων υποστρώματος από ζωμό φιλέτων καπνιστής πέστροφας**

Η προετοιμασία των μοντέλων έγινε όπως περιγράφεται από τους Parlapani et al. (2017). Συγκεκριμένα, 100 γρ φιλέτων καπνιστής πέστροφας κόβονταν σε μικρά κομμάτια και τοποθετούνταν σε σακούλα τύπου Stomacher (BagLight PolySilk, Interscience, Saint Nom, France) με 100 mL απιονισμένου νερού και ομογενοποιούνταν για 3 λεπτά σε ομογενοποιητή τύπου Stomacher (Bag Mixer, Interscience, London, UK). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνονταν μέχρι την συγκέντρωση της επιθυμητής ποσότητας ιχθυοζωμού. Η συγκέντρωση του ζωμού ιχθύος γίνονταν με διήθηση του από διάτρητο ύφασμα (τούλι) σε κωνική φιάλη για τον διαχωρισμό των κομματιών σάρκας. Στη συνέχεια, ακολουθούσε βρασμός για 5 λεπτά και αφήνονταν σε ηρεμία μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και να γίνει εκ νέου διήθηση με τη χρήση διηθητικού ηθμού Whatman No. 1, 90 mm (Sigma-Aldrich, Millipore, Whatman™, Steinheim, Germany). Κατόπιν, γίνονταν προθήκη 0.10 M ρυθμιστικού φωσφορικού buffer (0.056 M H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub> και 0.044 M HK<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) και ρύθμιση του pH στο 6.4 με NaOH/HCl. Ακολουθούσε νέος βρασμός στους 100 °C για 30 λεπτά. Αμέσως μετά το βρασμό, ο αποστειρωμένος ιχθυοζωμός μοιράστηκε σε φιάλες Duran που περιείχαν 250 mL αποστειρωμένο εναιώρημα άγαρ

3.0 %, ώστε το τελικό υλικό να περιέχει 1.5 % άγαρ. Τέλος, το υλικό αφέθηκε σε υδατόλουτρο στους 51 °C και διαμοιράστηκε (ανά 20 mL) σε τρυβλία.

## 7.2.5. Προετοιμασία εμβολίου, ενοφθαλισμός και συνθήκες αποθήκευσης

### 7.2.5.1. Στερεά μοντέλα υποστρώματος από ζωμό φιλέτων καπνιστής πέστροφας

Ο ενοφθαλισμός των βακτηρίων που είχαν προετοιμαστεί όπως περιγράφεται παραπάνω, έγινε με επίστρωση 100  $\mu$ L από την κατάλληλη δεκαδική αραιώση στην επιφάνεια των στερεών μοντέλων σε τρυβλία. Ως μονοκαλλιέργειες θεωρήθηκαν α) τα κύτταρα του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; Lm), β) τα κύτταρα προερχόμενα από βιοϋμένια (Lm Bf) γ) το μίγμα των κυττάρων από τους AM που ταυτοποιήθηκαν στο Κεφάλαιο 6, καθώς και κάθε μικροοργανισμός του μίγματος των AM ξεχωριστά, δ) *L. sakei* (Ls), ε) *L. curvatus* (Lc), στ) *C. famata* (Cf) και ζ) *C. zeylanoides* (Cz). Στον πίνακα 7.1, φαίνεται η κωδικοποίηση των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν σε μονοκαλλιέργειες

**Πίνακας 7.1.** Κωδικοποίηση όλων των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν σε μονοκαλλιέργειες.

Μικροοργανισμοί	Κωδικοποίηση
<i>L. monocytogenes</i>	Lm
<i>L. monocytogenes</i> Biofilm	Lm Bf
Αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί	AM
<i>Lactobacillus sakei</i>	Ls
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Lc
<i>Candida famata</i>	Cf
<i>Candida zeylanoides</i>	Cz

Επιπλέον, μελετήθηκε ο ανταγωνισμός του παθογόνου με τους ΑΜ, σε πολυκαλλιέργειες που αφορούσαν: α) κύτταρα του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων) με τους ΑΜ και β) κύτταρα του *L. monocytogenes* από βιοϋμένια με τους ΑΜ. Στον πίνακα 7.2, φαίνεται η κωδικοποίηση των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν σε πολυκαλλιέργειες.

**Πίνακας 7.2.** Κωδικοποίηση όλων των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν σε πολυκαλλιέργειες.

	<b>Μικροοργανισμοί</b>	<b>Κωδικοποίηση</b>
<i>L. monocytogenes</i> – πλαγκτονικά κύτταρα (Lm)	<i>Lactobacillus sakei</i> (Ls)	Lm+Ls
	<i>Lactobacillus curvatus</i> (Lc)	Lm+Lc
	<i>Candida famata</i> (Cf)	Lm+Cf
	<i>Candida zeylanoides</i> (Cz)	Lm+Cz
<i>L. monocytogenes</i> – κύτταρα βιοϋμενίων (Lm Bf)	<i>Lactobacillus sakei</i> (Ls)	Lm Bf+Ls
	<i>Lactobacillus curvatus</i> (Lc)	Lm Bf+Lc
	<i>Candida famata</i> (Cf)	Lm Bf+Cf
	<i>Candida zeylanoides</i> (Cz)	Lm Bf+Cz
ΑΜ	<i>L. monocytogenes</i> (Lm)	ΑΜ+Lm
	<i>L. monocytogenes</i> Biofilm (Lm Bf)	ΑΜ+Lm Bf

Ο αρχικός πληθυσμός για κάθε μελετώμενο συνδυασμό καλλιιεργειών υπολογίστηκε να είναι περίπου στους 2.00 – 3.00 log CFU/g. Στη συνέχεια όλα τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε ειδικές συσκευασίες 160 mm x 230 mm (Polyamide 20 μm - Polyethylene 70 μm, Vacuum Bags, B.T. BYVAC DI TOFANI BARBARA, Lucca, Italy) για τον εγκλεισμό τροφίμων υπό κενό αέρα και συσκευάστηκαν με τη χρήση του Μηχανήματος (Aris 44A, Table type vacuum packaging machine, Alex Pak, Ελλάδα) που διαθέτει το εργαστήριο μας, ρυθμίζοντας τις παραμέτρους λειτουργίας του για τη δημιουργία κενού αέρα στα 25 δευτ. και για σφράγιση της συσκευασίας

στα 1.9 δευτ. Τέλος, όλα τα δείγματα μαζί με τα δείγματα ελέγχου (control) που περιείχαν 100 µL αποστειρωμένου νερού, τοποθετήθηκαν στους 4.0 και 7.9 °C.

#### 7.2.5.2. Πραγματικά φιλέτα καπνιστής πέστροφας

Για τον ενοφθαλμισμό των φιλέτων καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης), βάρους περίπου 65 γρ το κάθε φιλέτο, χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο από τα κύτταρα του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων) και τα προερχόμενα από βιοϋμένια. Ο αρχικός πληθυσμός των κυττάρων του *L. monocytogenes* που ενοφθαλμίστηκαν στην επιφάνεια των φιλέτων καπνιστής πέστροφας, υπολογίστηκε να είναι περίπου 3.00 log CFU/g, σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές οδηγίες για την πραγματοποίηση πειραμάτων υπολογισμού του εμπορικού χρόνου ζωής σε έτοιμα προς κατανάλωση (RTE) τρόφιμα (EC, 2014). Ο υπολογισμός της απαιτούμενης ποσότητας για τον σωστό ενοφθαλμισμό των φιλέτων έγινε με βάση τις οδηγίες του Εργαστηρίου αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για δοκιμές με το *L. monocytogenes* που αφορούν τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Beaufort et al., 2014), χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$C_{\text{inoculum}} \times V_{\text{inoculum}} = C_{\text{whole matrix}} \times M_{\text{matrix}} \quad (1)$$

Όπου:

$C_{\text{inoculum}}$ : ο πληθυσμός του ενοφθαλμίσματος

$V_{\text{inoculum}}$ : ο όγκος του εμβολίου για τον ενοφθαλμισμό

$C_{\text{whole matrix}}$ : ο επιθυμητός τελικός πληθυσμός σε CFU/g σάρκας

$M_{\text{matrix}}$ : το βάρος του δείγματος (φιλέτο καπνιστής πέστροφας)

Όλα τα φιλέτα αφαιρέθηκαν υπό άσηπτες συνθήκες από την αρχική τους συσκευασία και ενοφθαλμίστηκαν με 650 µL και από τις δύο πλευρές από την κατάλληλη αραίωση. Τα φιλέτα που αποτελούσαν τα δείγματα ελέγχου, ενοφθαλμίστηκαν με 650

μL αποστειρωμένου νερού. Τέλος, συσκευάστηκαν στο εργαστήριο όπως περιεγράφηκε παραπάνω (βλέπε 7.2.5.1) και τοποθετήθηκαν στους 4.0 και 7.9 °C.

#### **7.2.6. Μικροβιολογική ανάλυση μοντέλων και φιλέτων καπνιστής πέστροφας**

Την πρώτη ημέρα (ημέρα ενοφθαλμισμού) και κάθε 3 και 5 ημέρες για την χαμηλή και υψηλή θερμοκρασία, αντίστοιχα, λαμβάνονταν 1 γρ δείγματος ασηπτικά και μεταφέρονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 9 mL MRD και ακολουθούσε ανάδευση για τουλάχιστον 1 λεπτό σε συσκευή τύπου Vortex (F20, Velp Scientifica, Italy). Η απαρίθμηση των μικροβιακών πληθυσμών έγινε με επίστρωση, λαμβάνοντας 100 μL σε TSA για όλες τις καλλιέργειες και επώαση στους 25 °C για 72 ώρες, σε επιλεκτικό υπόστρωμα PALCAM άγαρ για το *L. monocytogenes* και MRS άγαρ για τους AM και επώαση στους 37 °C για 24 ώρες και στους 25 °C για 48 – 72 ώρες, αντίστοιχα.

Η δειγματοληψία των φιλέτων έγινε λαμβάνοντας 25 γρ σάρκας τα οποία μεταφέρονταν ασηπτικά σε αποστειρωμένες σακούλες Stomacher, με 225 mL MRD και στη συνέχεια γίνονταν ομογενοποίηση για 2 λεπτά σε συσκευή τύπου Stomacher. Οι μικροοργανισμοί απαριθμήθηκαν όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.

### 7.3. Αποτελέσματα

#### 7.3.1. Συμπεριφορά του *L. monocytogenes* σε πραγματικά φιλέτα καπνιστής πέστροφας

Στο σχήμα 7.1, παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, των πλαγκτονικών αλλά και κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* που ενοφθαλμίστηκαν στην επιφάνεια των φιλέτων και συντηρήθηκαν για 60 ημέρες υπό συσκευασία κενού στους 4.0 °C (θερμοκρασία αποθήκευσης στο λιανικό εμπόριο) και 7.9 °C (μη ορθή θερμοκρασία ψύξης οικιακού ψυγείου; Vermeulen et al., 2011). Αντίστοιχα, οι κινητικές παράμετροι των μικροοργανισμών παρουσιάζονται στον πίνακα 7.3.

Ο αρχικός πληθυσμός των πλαγκτονικών κυττάρων στα φιλέτα (4.0 °C) ήταν 1.93 log CFU/g και των βιοϋμενίων 1.43 log CFU/g (Σχ. 7.1 A). Τα πλαγκτονικά κύτταρα του *L. monocytogenes*, μετά από 15 ημέρες στην επιφάνεια των φιλέτων στους 4.0 °C αναπτύχθηκαν και έφτασαν τους 6.45 log CFU/g, ενώ συνέχισαν την αυξητική τους πορεία φτάνοντας στις 60 ημέρες τους 7.57 log CFU/g (Σχ. 7.1 A). Τα κύτταρα βιοϋμενίων του παθογόνου, εμφάνισαν μία όμοια αύξηση με αυτή των πλαγκτονικών κυττάρων (4.0 °C) την 15<sup>η</sup> ημέρα (6.05 log CFU/g) και την τελευταία ημέρα συντήρησης ο πληθυσμός τους, στους 4.0 °C, μειώθηκε σε 5.56 log CFU/g. Στα ενοφθαλμισμένα φιλέτα με πλαγκτονικά και κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* στους 4.0 °C, ο τελικός πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων (ημέρα 60) ήταν 8.74 και 8.86 log CFU/g, σχεδόν ίσος με τον πληθυσμό των ίδιων βακτηρίων στα μη ενοφθαλμισμένα φιλέτα (8.70 log CFU/g) (Σχ. 7.1 A).

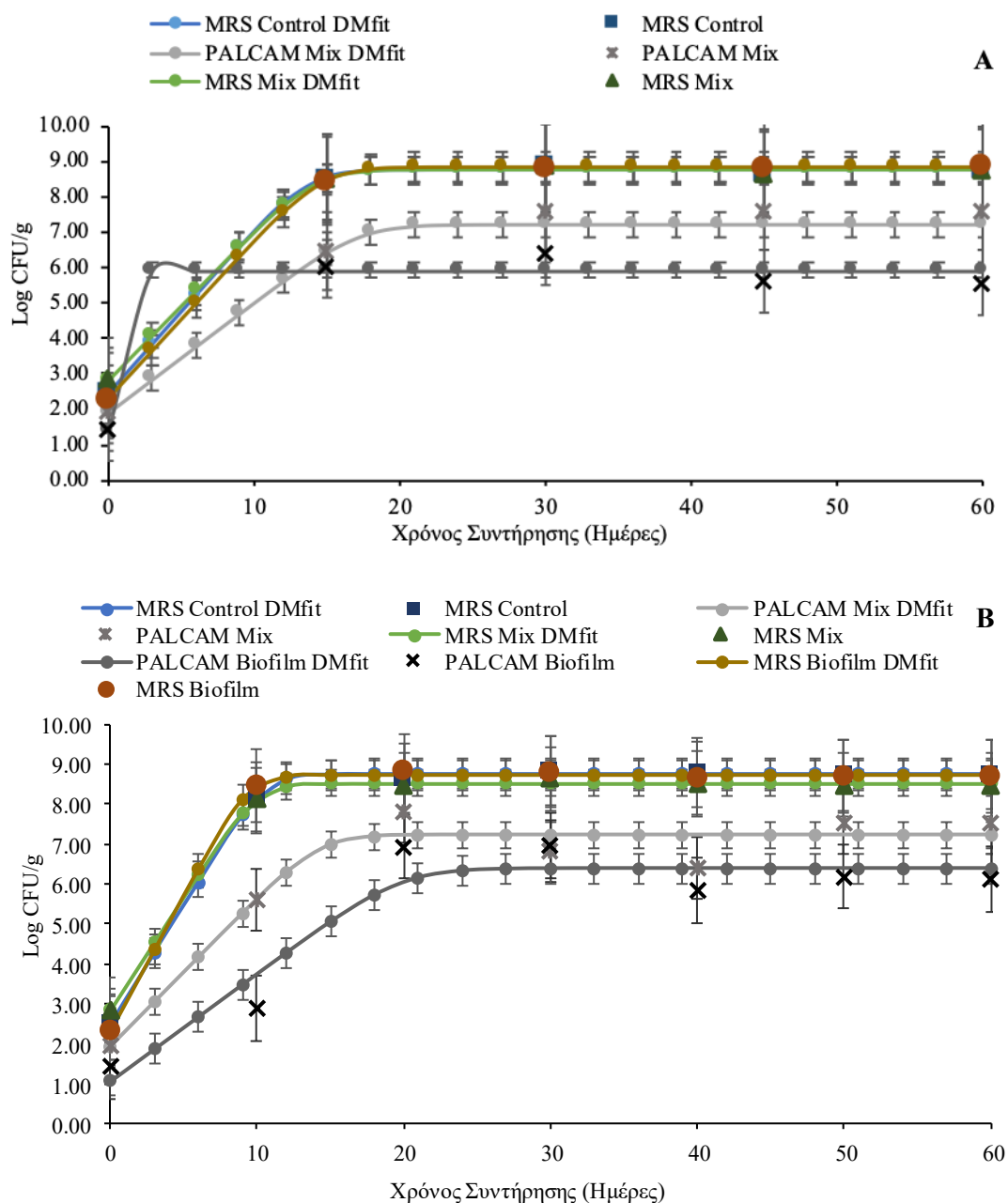
Για τα φιλέτα που είχαν αποθηκευτεί στους 7.9 °C δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, συγκριτικά με αυτά που είχαν αποθηκευτεί στους 4.0 °C, για το ίδιο χρονικό διάστημα (60 ημέρες). Την 30<sup>η</sup> και 40<sup>η</sup>

ημέρα συντήρησης, παρατηρήθηκε μία μείωση των πλαγκτονικών κυττάρων του παθογόνου στους 6.84 και 6.40 log CFU/g, αντίστοιχα από 7.80 log CFU/g (20<sup>η</sup> ημέρα) (Σχ. 7.1 B). Την μείωση επιδέχθηκε εκ νέου η αύξηση των κυττάρων του *L. monocytogenes* και αυτό είχε ως αποτέλεσμα να φτάσουν τους 7.54 log CFU/g, την τελευταία ημέρα συντήρησης στους 7.9 °C (Σχ. 7.1 B). Τα κύτταρα των βιοϋμενίων στους 7.9 °C, αναπτύχθηκαν με πιο αργό ρυθμό και σε χαμηλότερο τελικό πληθυσμό, σε σύγκριση με τα πλαγκτονικά κύτταρα του παθογόνου. Όπως και τα πλαγκτονικά κύτταρα, στις 40 ημέρες συντήρησης, παρατηρήθηκε μία μείωση των κυττάρων βιοϋμενίων στην επιφάνεια των φιλέτων, φτάνοντας σε πληθυσμό τους 5.85 log CFU/g από 6.94 log CFU/g (20<sup>η</sup> ημέρα) (Σχ. 7.1 B). Κατά την 60<sup>η</sup> ημέρα, ωστόσο ο τελικός πληθυσμός των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, ήταν 6.12 log CFU/g (Σχ. 7.1 B).

Κατά τη διάρκεια συντήρησης των φιλέτων και στις 2 θερμοκρασίες (4.0 °C και 7.9 °C) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων ή των κυττάρων του *L. monocytogenes*, έπειτα από απαρίθμηση σε MRS και PALCAM άγαρ, αντίστοιχα. Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων, στα φιλέτα που δεν είχαν ενοφθαλμιστεί με το παθογόνο, έφτασε στους 4.0 °C τους 8.70 log CFU/g και στους 7.9 °C τους 8.75 log CFU/g (Σχ. 7.1 A & B).

Παρατηρώντας τις κινητικές παραμέτρους των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των πλαγκτονικών κυττάρων και κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, που παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.3, φαίνεται ότι για καμία ομάδα μικροοργανισμών δεν υπήρχε φάση προσαρμογής (lag). Παρουσία του παθογόνου ο ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) των κυττάρων που απαριθμήθηκαν στο MRS άγαρ, δεν φάνηκε να επηρεάζεται και στις 2 θερμοκρασίες. Ωστόσο, αν και ο τελικός πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην επιφάνεια των φιλέτων καπνιστής πέστροφας,

έφτασε στα ίδια επίπεδα, ο ειδικός ρυθμός αύξησης των οξυγαλακτικών στους 7.9 °C, ήταν περίπου 50 % υψηλότερος (παρουσία και μη του παθογόνου), συγκριτικά με αυτόν στους 4.0 °C (Πίν. 7.3).



**Σχήμα 7.1.** Μικροβιολογική ανάλυση φιλέτων καπνιστής πέστροφας, μετά τον ενοφθαλμισμό τους με *L. monocytogenes* A) στους 4.0 °C και B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Ως ομάδα ελέγχου (control), θεωρήθηκαν οι πληθυσμιακές μεταβολές των οξυγαλακτικών βακτηρίων της φυσικής μικροβιακής σύνθεσης των φιλέτων σε MRS άγαρ. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).



**Πίνακας 7.3.** Κινητικές παράμετροι των πιθανών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του *L. monocytogenes* (πλαγκτονικά και κύτταρα βιοϋμενίων) σε φιλέτα καπνιστής πέστροφας, κατά τη συντήρηση σε συνθήκες κενού αέρα στους 4.0 και 7.9 °C. Οι τιμές (μέσοι όροι ± τυπ. απόκλιση, 3 επαναλήψεων) εκτός παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi (Baranyi & Roberts 1994).

T °C	Μικροοργανισμοί	Αρχικός	Τελικός πληθυσμός Nmax (log	lag±τυπ.απ.	μmax
		πληθυσμός (log CFU/g±τυπ.απ.)	CFU/g±τυπ.απ.)	(d)	(d-1)
4	Οξυγαλακτικά βακτήρια (control)	2.48 ± 0.59 (2.48)	8.86 ± 0.04 (8.73 ± 0.12) <sup>a</sup>	0.00	0.46
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (listeria mix)	2.84 ± 0.06 (2.84)	8.86 ± 0.07 (8.76 ± 0.09) <sup>a</sup>	0.00	0.42
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (listeria biofilm)	2.32 ± 0.28 (2.32)	8.86 ± 0.02 (8.84 ± 0.02) <sup>a</sup>	0.00	0.45
	<i>L. monocytogenes</i> Mix	1.93 ± 0.22 (1.93)	7.27 ± 0.10 (7.24 ± 0.06) <sup>b</sup>	0.00	0.31
	<i>L. monocytogenes</i> Biofilm	1.43 ± 0.38 (1.43)	6.41 ± 0.31 (5.91 ± 0.52) <sup>c</sup>	0.00	7.26
7.9	Οξυγαλακτικά βακτήρια (control)	-	8.84 ± 0.12 (8.76 ± 0.07) <sup>a</sup>	0.00	0.60
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (listeria mix)	-	8.65 ± 0.06 (8.53 ± 0.07) <sup>b</sup>	0.00	0.57
	Οξυγαλακτικά βακτήρια (listeria biofilm)	-	8.83 ± 0.08 (8.74 ± 0.08) <sup>a</sup>	0.00	0.68
	<i>L. monocytogenes</i> Mix	-	7.80 ± 0.14 (7.22 ± 0.64) <sup>c</sup>	0.00	0.37
	<i>L. monocytogenes</i> Biofilm	-	6.97 ± 0.22 (6.38 ± 0.90) <sup>d</sup>	0.00	0.27

### 7.3.2. Μονοκαλλιέργειες μικροοργανισμών σε στερεά μοντέλα υποστρώματος

Στα σχήματα 7.2 έως και 7.8 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, των πλαγκτονικών και κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* που ενοφθαλμίστηκαν στην επιφάνεια των στερεών μοντέλων υποστρωμάτων και συντηρήθηκαν για 60 ημέρες υπό συσκευασία κενού αέρα στους 4.0 °C και 7.9 °C. Στον πίνακα 7.1, φαίνεται η κωδικοποίηση των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν σε μονοκαλλιέργειες και αντίστοιχα, οι κινητικές παράμετροι των μικροοργανισμών παρουσιάζονται στον πίνακα 7.4.

Ο αρχικός πληθυσμός όλων των μικροοργανισμών που ενοφθαλμίστηκαν στην επιφάνεια των στερεών μοντέλων καπνιστής πέστροφας, υπολογίστηκε να είναι περίπου 3.00 log CFU/g. Ο τελικός πληθυσμός των πλαγκτονικών κυττάρων του *L. monocytogenes* έφτασε στα υψηλότερα αριθμητικά επίπεδα και συγκεκριμένα, στους 4.0 °C και 7.9 °C έφτασε τους 8.99 και 8.84 log CFU/g (Σχ. 7.2 A & B). Αντιθέτως, τα κύτταρα βιοϋμενίων του παθογόνου, μετά από 60 ημέρες παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα πλαγκτονικά και στις 2 θερμοκρασίες (Πίν. 7.4,  $P < 0.05$ ) και έφτασαν τους 7.94 και 7.84 log CFU/g στους 4.0 °C και 7.9 °C, αντίστοιχα (Σχ. 7.4. A & B). Ωστόσο, ο ειδικός ρυθμός αύξησης των πλαγκτονικών κυττάρων του *L. monocytogenes* στους 4.0 °C, ήταν ο δεύτερος χαμηλότερος ( $0.577 \text{ d}^{-1}$ ) στους 4.0 °C και ένας από τους χαμηλότερους ( $0.653 \text{ d}^{-1}$ ) στους 7.9 °C (Πίν. 7.4). Τον χαμηλότερο ειδικό ρυθμό αύξησης και για τις δύο μελετώμενες θερμοκρασίες παρουσίασαν τα κύτταρα βιοϋμενίων του παθογόνου (Πίν. 7.4).

Ο τελικός πληθυσμός των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (μίγμα; AM), εμφάνισε στατιστικώς σημαντικές διαφορές στους 4.0 °C και 7.9 °C, συγκριτικά με τον τελικό πληθυσμό των *L. sakei*, (Ls), *L. curvatus*, (Lc), *C. famata*,

(Cf) και *C. zeylanoides*, (Cz; Πίν. 7.4,  $P < 0.05$ ). Ο πληθυσμός των AM, στους 4.0 °C, έφτασε τους 8.56 log CFU/g και ο ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν ο υψηλότερος μεταξύ όλων των μικροοργανισμών και ίσος με 0.895 d<sup>-1</sup> (Πίν. 7.4).

Τόσο στους 4.0 °C όσο και στους 7.9 °C, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στον τελικό πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων *L. sakei*, (Ls) και *L. curvatus*, (Lc) στις αντίστοιχες μονοκαλλιέργειες (Πίν. 7.4,  $P > 0.05$ ).

Κατά τη διάρκεια συντήρησης των μοντέλων υποστρώματος και στις δύο θερμοκρασίες, που είχαν ενοφθαλμιστεί με τους προαναφερθέντες μικροοργανισμούς (Ls και Lc), δεν παρατηρήθηκε χρόνος προσαρμογής. Ο τελικός πληθυσμός του *L. sakei* (Ls) στους 4.0 °C και 7.9 °C, άγγιξε τους 7.17 και 7.40 log CFU/g και ο ειδικός ρυθμός αύξησης τους ήταν 0.651 και 0,468 d<sup>-1</sup>, αντίστοιχα (Σχ. 7.5 A & B, Πίν. 7.4). Σε όμοια επίπεδα κυμάνθηκαν και οι κινητικές παράμετροι του *L. curvatus* (Lc) και στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης (Σχ. 7.6 A & B, Πίν. 7.4).

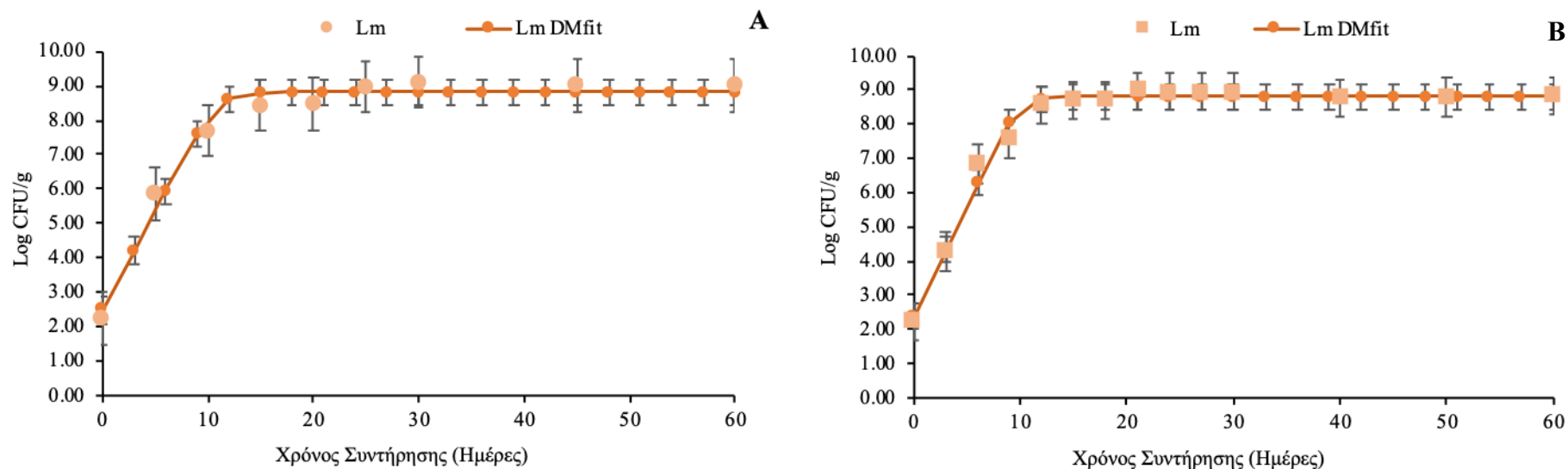
Σε αντίθεση με τα οξυγαλακτικά βακτήρια, οι ζύμες που αποτελούσαν μέρος των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, αναπτύχθηκαν και έφτασαν υψηλούς πληθυσμούς, έχοντας στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών τους στις δύο θερμοκρασίες (Πίν. 7.4,  $P < 0.05$ ). Αναλυτικά, ο πληθυσμός του *C. famata* (Cf), στους 4.0 °C και 7.9 °C, ανήλθε σε 8.35 και 8.42 log CFU/g (Σχ. 7.7 A & B). Ο ειδικός ρυθμός αύξησης του Cf, στους 4.0 °C ήταν ο δεύτερος μεγαλύτερος, με  $\mu_{max} = 0.871$  d<sup>-1</sup> και στους 7.9 °C ήταν ο υψηλότερος, με  $\mu_{max} = 0.754$  (Πίν. 7.4). Πάνω από τους 8.00 λογάριθμους παρέμεινε και ο πληθυσμός του *C. zeylanoides*, (Cz), στις μονοκαλλιέργειες των στερεών μοντέλων και στις δύο θερμοκρασίες όπως παρουσιάζεται και στο Σχήμα 7.8 A & B. Αντιστρόφως με τα αποτελέσματα του *C. famata*, ο μικροοργανισμός *C. zeylanoides*, στους 4.0 °C είχε ρυθμό αύξησης 0.881,

που ήταν ο υψηλότερος και  $\mu_{\max} = 0.728$ , στους  $7.9\text{ }^{\circ}\text{C}$  που αποτέλεσε τον δεύτερο υψηλότερο (Πίν. 7.4).

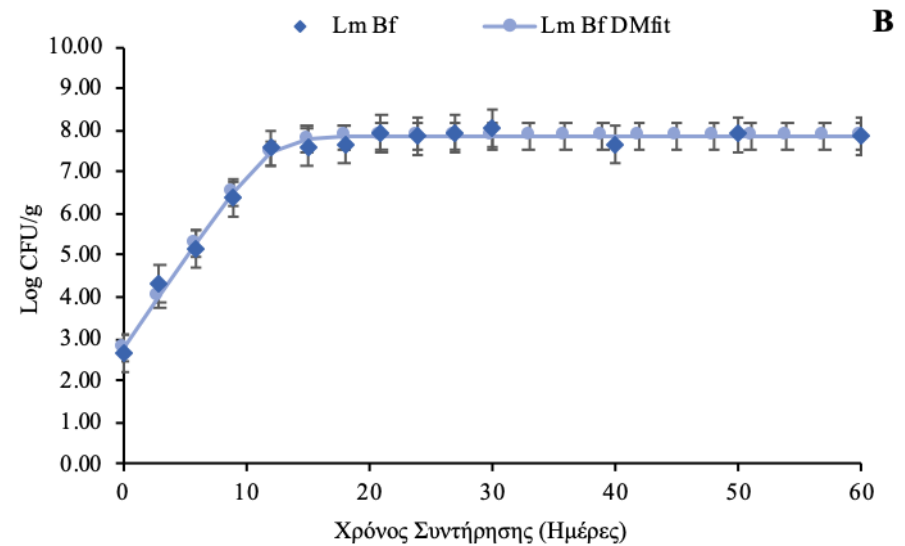
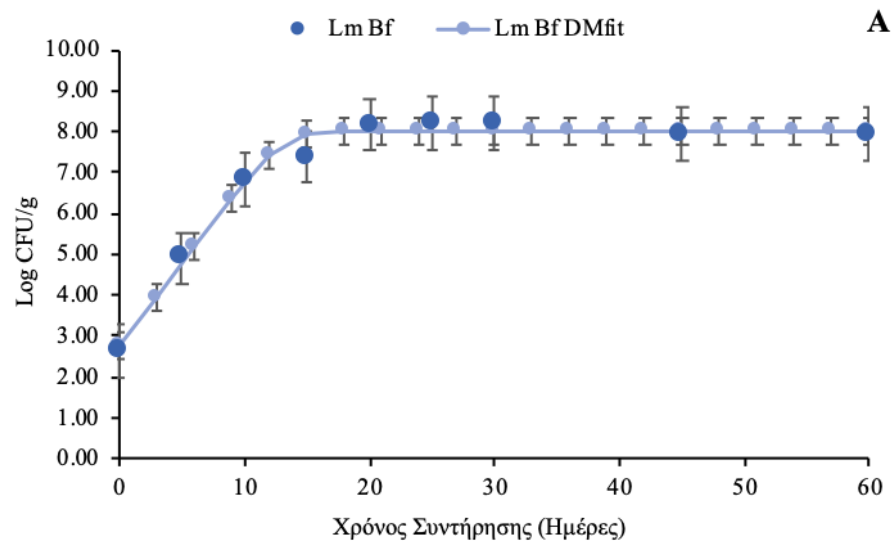
**Πίνακας 7.4.** Κινητικές παράμετροι των πιθανών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του *L. monocytogenes* (πλαγκτονικά και κύτταρα βιοϋμενίων) σε μονοκαλλιέργειες σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη συντήρηση σε συνθήκες κενού αέρα στους 4.0 και 7.9 °C. Οι τιμές εκτός παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi (Baranyi & Roberts 1994).

T°C	Μικροοργανισμοί	Αρχικός πληθυσμός (log	Τελικός πληθυσμός Nmax (log	lag±τυπ.απ. (d)	μmax (d <sup>-1</sup> )
		CFU/g±τυπ.απ.)	CFU/g±τυπ.απ.)		
4.0	Lm	2.24 ± 0.21 (2.37)	8.99 ± 0.01 (8.82 ± 0.39) <sup>a</sup>	0.00	0.577
	Lm Bf	2.66 ± 0.25 (2.80)	7.94 ± 0.01 (8.01 ± 0.27) <sup>e</sup>	0.00	0.406
	AM	2.79 ± 0.21 (2.86)	8.56 ± 0.03 (8.57 ± 0.12) <sup>b</sup>	0.00	0.895
	Ls	2.93 ± 0.07 (3.11)	7.17 ± 0.07 (7.17 ± 0.05) <sup>f</sup>	0.00	0.651
	Lc	2.66 ± 0.07 (2.88)	7.14 ± 0.13 (7.01 ± 0.16) <sup>f</sup>	0.00	0.617
	Cf	2.78 ± 0.06 (2.86)	8.35 ± 0.17 (8.40 ± 0.07) <sup>c</sup>	0.00	0.871
	Cz	2.69 ± 0.17 (2.72)	8.15 ± 0.11 (7.97 ± 0.21) <sup>d</sup>	0.00	0.881
7.9	Lm	-	8.84 ± 0.01 (8.82 ± 0.25) <sup>a</sup>	0.00	0.653
	Lm Bf	-	7.84 ± 0.06 (7.83 ± 0.16) <sup>d</sup>	0.00	0.413
	AM	-	8.51 ± 0.02 (8.50 ± 0.18) <sup>b</sup>	0.00	0.724
	Ls	-	7.40 ± 0.09 (7.27 ± 0.16) <sup>e</sup>	0.00	0.468
	Lc	-	7.23 ± 0.09 (7.10 ± 0.20) <sup>e</sup>	0.00	0.588
	Cf	-	8.42 ± 0.13 (8.36 ± 0.10) <sup>b</sup>	0.00	0.754
	Cz	-	8.02 ± 0.17 (8.08 ± 0.05) <sup>c</sup>	0.00	0.728

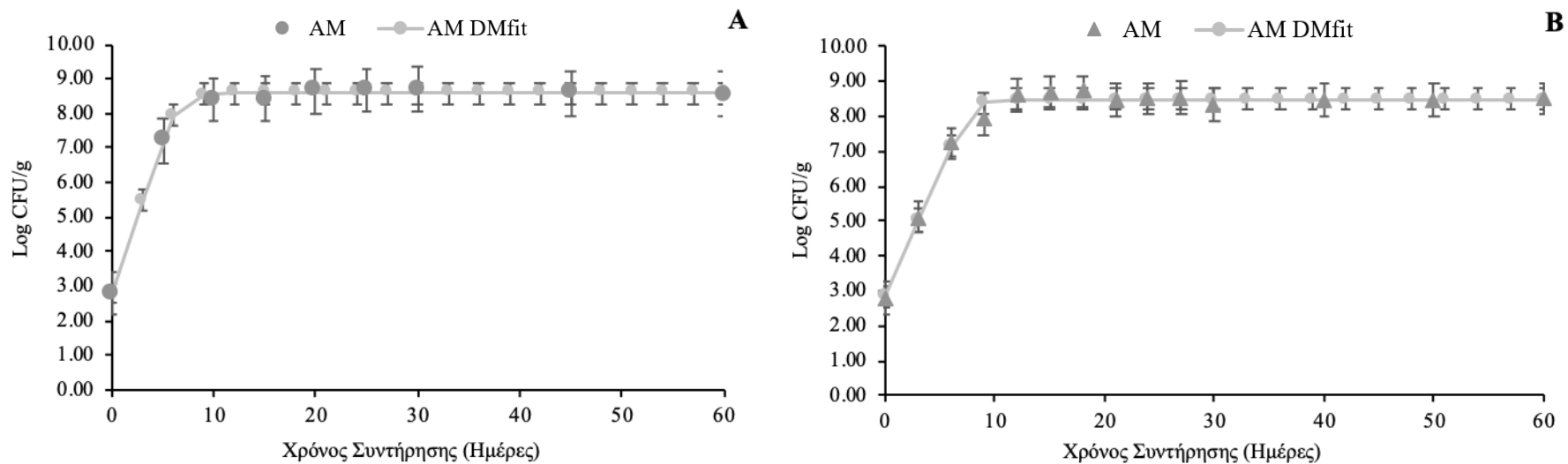
Οι τιμές (μέσοι όροι ± τυπ. απόκλιση, 6 επαναλήψεων), εντός της ίδιας θερμοκρασίας, στην ίδια στήλη, που συμβολίζονται με διαφορετικό μικρό γράμμα έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ). Η σύγκριση για τον αρχικό πληθυσμό των διαφόρων μικροοργανισμών δεν πραγματοποιήθηκε, καθώς ο αρχικός πληθυσμός είχε υπολογιστεί να είναι περίπου 3.00 log CFU/g. Ο αρχικός πληθυσμός ήταν κοινός και για τις δύο θερμοκρασίες.



**Σχήμα 7.2.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *L. monocytogenes* (μίγμα 5 οροτύπων), μετά τον ενοφθαλμισμό του σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

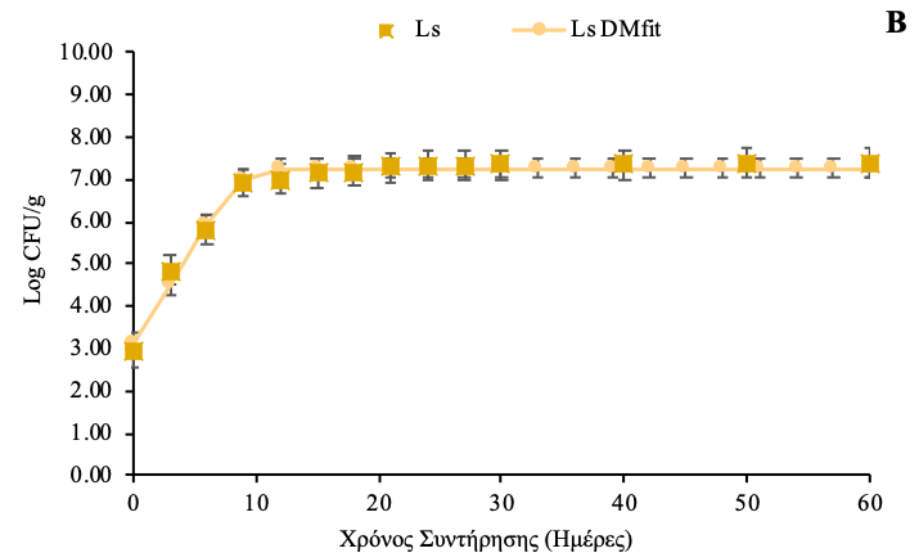
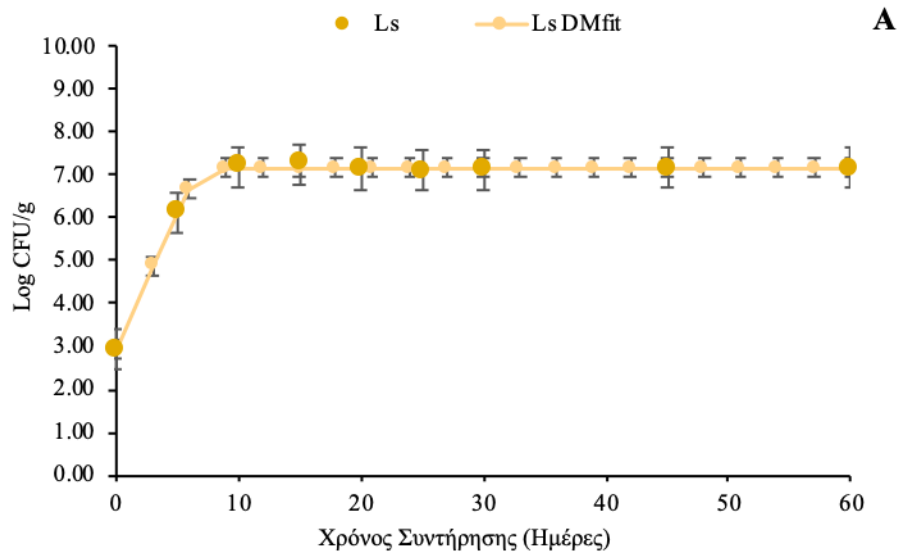


**Σχήμα 7.3.** Πληθυσμιακές μεταβολές των κυττάρων προερχόμενων από βιοϋμένια του *L. monocytogenes* (μίγμα 5 οροτύπων), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό Α) στους 4.0 °C, Β) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ).

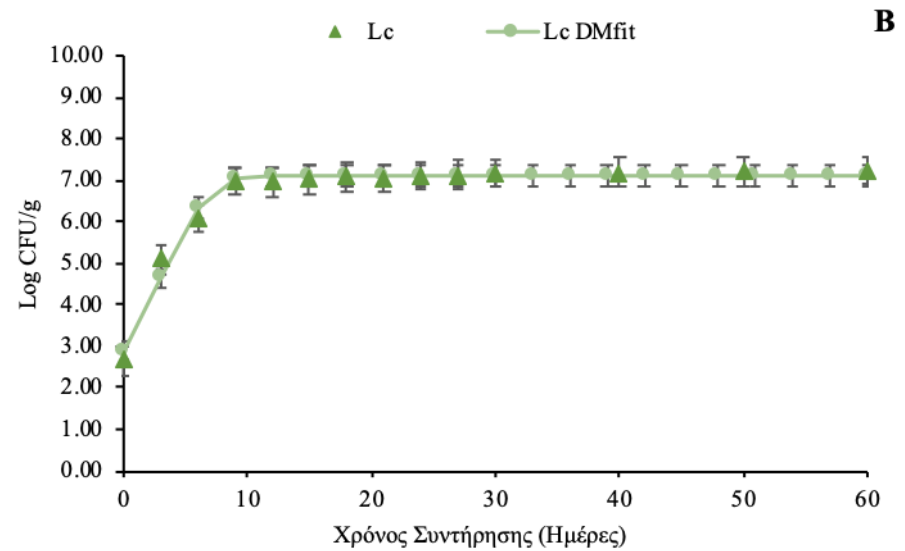
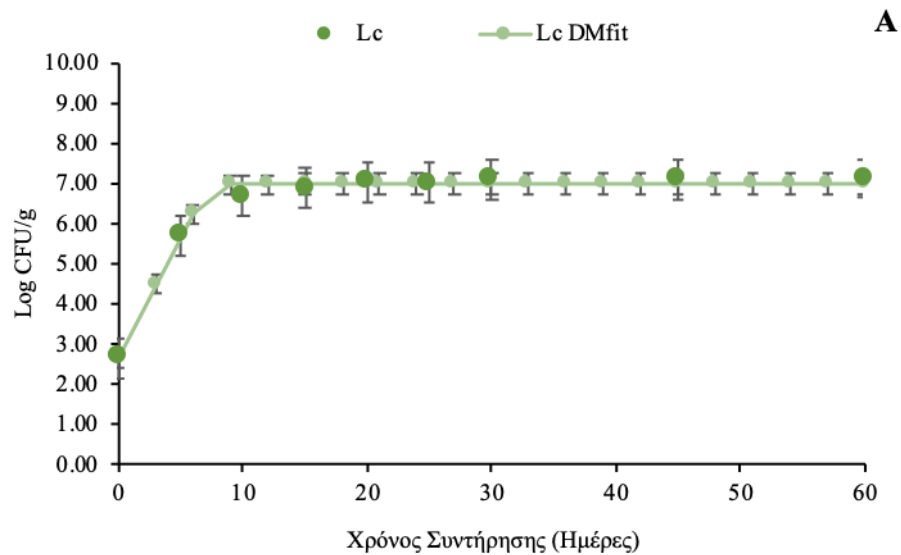


**Σχήμα 7.4.** Πληθυσμιακές μεταβολές των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων οργανισμών σε μίγμα (AM), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

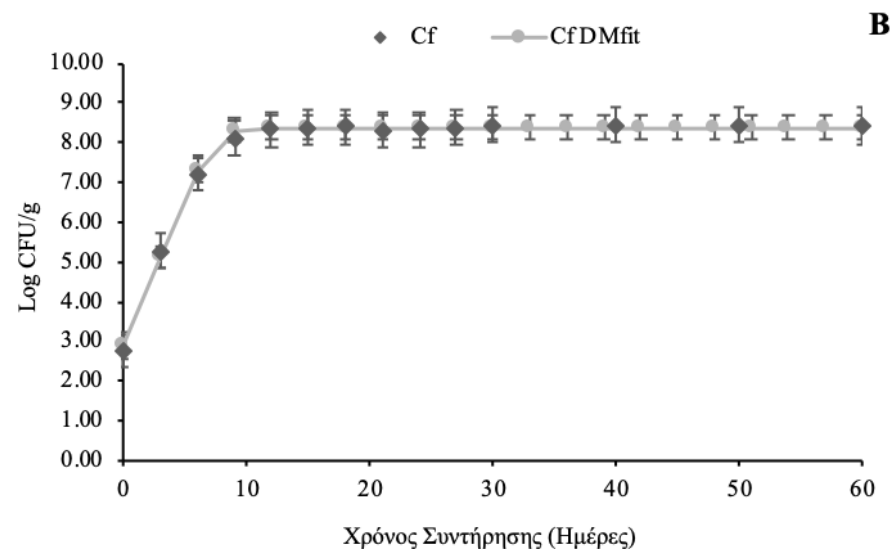
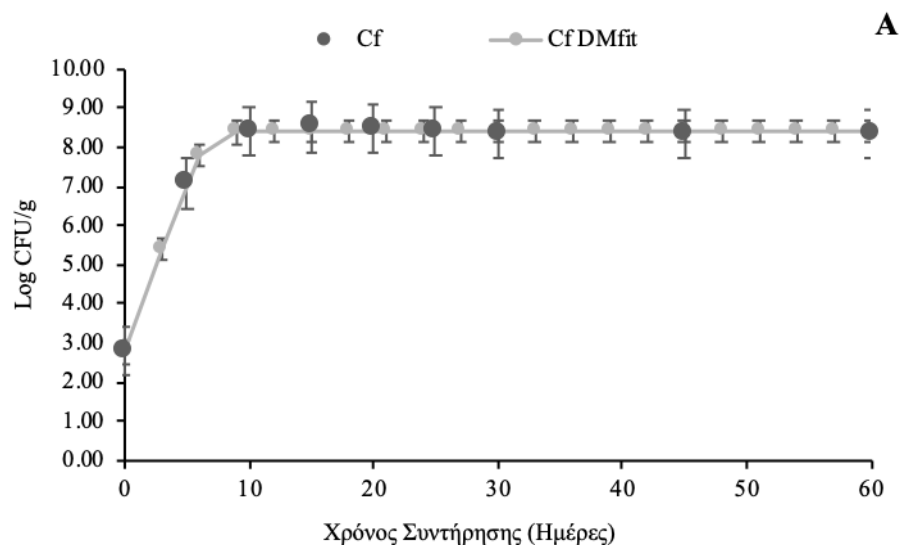




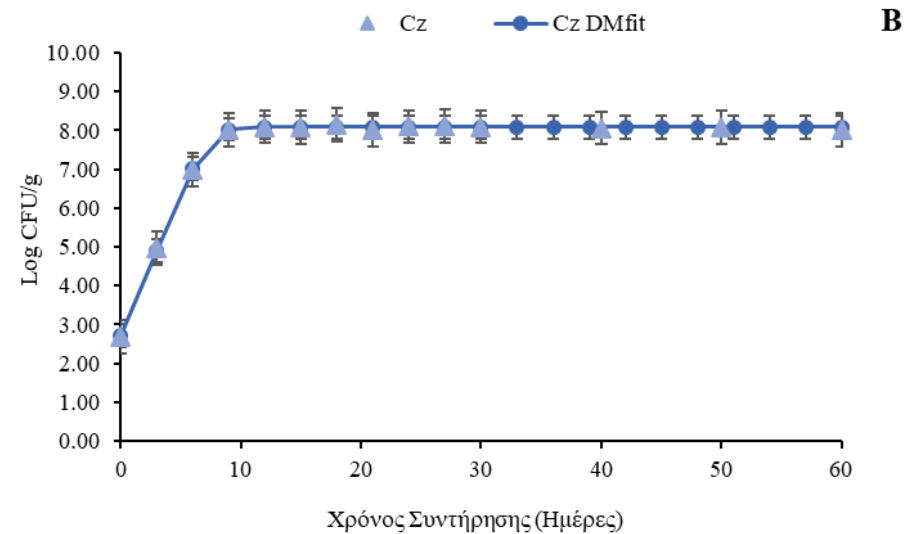
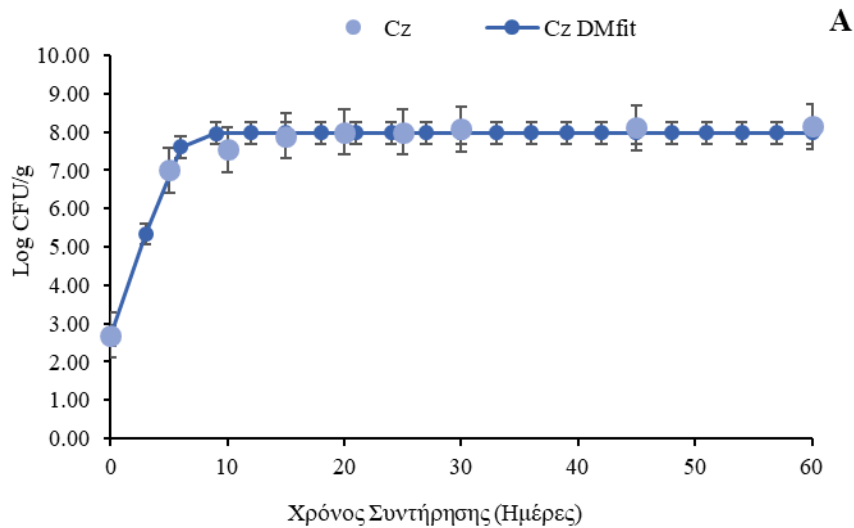
**Σχήμα 7.5.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Lactobacillus sakei* (Ls), μετά τον ενοφθαλμισμό του σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).



**Σχήμα 7.6.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Lactobacillus curvatus* (Lc), μετά τον ενοφθαλμισμό του σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).



**Σχήμα 7.7.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Candida famata* (Cf), μετά τον ενοφθαλμισμό του σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).



**Σχήμα 7.8.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Candida zeylanoides* (Cz), μετά τον ενοφθαλμισμό του σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).

### 7.3.3. Ανταγωνιστική συμπεριφορά του *L. monocytogenes* και των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε πολυκαλλιέργειες

Στα σχήματα 7.9 έως και 7.18 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (AM), των πλαγκτονικών και κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* σε πολυκαλλιέργειες, που ενοφθαλμίστηκαν στην επιφάνεια των στερεών μοντέλων υποστρωμάτων και συντηρήθηκαν για 60 ημέρες υπό συσκευασία κενού αέρα στους 4.0 °C και 7.9 °C. Στον πίνακα 7.2, φαίνεται η κωδικοποίηση των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν σε πολυκαλλιέργειες και αντίστοιχα, οι κινητικές παράμετροι των μικροοργανισμών παρουσιάζονται στον πίνακα 7.5.

Κατά τη συγκαλλιέργεια του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων) με το μίγμα των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (AM+Lm), ο τελικός πληθυσμός του *L. monocytogenes* στους 4.0 °C και 7.9 °C, έφτασε τους 8.20 και 7.87 log CFU/g (Πίν. 7.5) σε αντίθεση με τη μονοκαλλιέργεια, όπου στις ίδιες θερμοκρασίες ο πληθυσμός ήταν 8.99 και 8.84 log CFU/g (Πίν. 7.4), αντίστοιχα. Όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 7.9 (A & B), ο πληθυσμός των AM και στις δύο θερμοκρασίες, σε όλη τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων ήταν σταθερά υψηλότερος από τον αντίστοιχο του παθογόνου και ίσος με 8.42 και 8.49 log CFU/g, στους 4.0 °C και 7.9 °C, αντίστοιχα. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης άλλωστε των AM κατά τη συγκαλλιέργειά τους με το *L. monocytogenes*, στους 4.0 °C ήταν ο δεύτερος υψηλότερος, 0.898 d<sup>-1</sup> και ο υψηλότερος στους 7.9 °C και ίσος με 0.801 d<sup>-1</sup> (Πίν. 7.5).

Στην πολυκαλλιέργεια του *L. sakei* με το *L. monocytogenes* (Lm+Ls), στους 4.0 °C ο πληθυσμός του *L. sakei*, παρέμεινε σε υψηλότερα επίπεδα από αυτό του παθογόνου μέχρι και την 15<sup>η</sup> ημέρα, ενώ κατά την υπόλοιπη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων ο πληθυσμός του *L. monocytogenes* ήταν σταθερά και ελαφρώς

υψηλότερος ( $< 0.40 \log$ ) από τον αντίστοιχο του *L. sakei* (Σχ. 7.10 A). Στους  $7.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ο πληθυσμός του παθογόνου ήταν σταθερά υψηλότερος για όλη τη διάρκεια συντήρησης και ο τελικός πληθυσμός του έφτασε  $8.21 \log \text{CFU/g}$ , έναντι  $7.59 \log \text{CFU/g}$ , του *L. sakei* (Σχ. 7.10 B). Ο ειδικός ρυθμός αύξησης του παθογόνου στους  $4.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $0.435 \text{d}^{-1}$ ) ήταν χαμηλότερος από τον αντίστοιχο στους  $7.9\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $0.544 \text{d}^{-1}$ ), αντιθέτως το *L. sakei* παρουσίασε  $\mu_{\max}$  στους  $4.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  ίσο με  $0.652 \text{d}^{-1}$ , έναντι  $0.525 \text{d}^{-1}$  στους  $7.9\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Πίν. 7.5).

Ακριβώς η ίδια συμπεριφορά που περιεγράφηκε παραπάνω, παρατηρήθηκε σε συγκαλλιέργεια του *L. curvatus*, παρουσία του *L. monocytogenes* (Lm+Lc). Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσίασε ο τελικός πληθυσμός του παθογόνου (Lm), συγκριτικά με τον πληθυσμό του *L. curvatus* ( $8.41$  και  $7.71 \log \text{CFU/g}$ ) στους  $4.0$  και στους  $7.9\text{ }^{\circ}\text{C}$  φτάνοντας τους  $8.49$  και  $7.68 \log \text{CFU/g}$ , αντίστοιχα (Πίν. 7.5,  $P < 0.05$ ). Ο ειδικός ρυθμός αύξησης του *L. curvatus* ( $0.311 \text{d}^{-1}$ ), στους  $4.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  ήταν σχεδόν διπλάσιος από του παθογόνου ( $0.608 \text{d}^{-1}$ ; Πίν. 7.5), ενώ στους  $7.9\text{ }^{\circ}\text{C}$  το  $\mu_{\max}$  του *L. monocytogenes* ( $0.590 \text{d}^{-1}$ ) ήταν σχεδόν  $50\%$  υψηλότερο σε σχέση με του *L. curvatus* ( $0.455 \text{d}^{-1}$ ; Πίν. 7.5).

Με βάση τα πειραματικά δεδομένα στην πολυκαλλιέργεια (Lm+Cf), μέχρι την τελευταία ημέρα συντήρησης ( $60^{\text{h}}$ ) των μοντέλων στη χαμηλή θερμοκρασία ( $4.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), ο τελικός πληθυσμός του *C. famata* ήταν  $8.54 \log \text{CFU/g}$ , ενώ του *L. monocytogenes*  $8.59 \log \text{CFU/g}$ , χωρίς να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Σχ. 7.12 A). Ωστόσο, μετά την προσαρμογή των δεδομένων με το μοντέλο Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994), ο πληθυσμός του *L. monocytogenes*, διαμορφώθηκε σε  $8.25 \log \text{CFU/g}$  και του *C. famata* σε  $8.48 \log \text{CFU/g}$  (Πίν. 7.5). Στη μη ορθή θερμοκρασία συντήρησης ( $7.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), οι καμπύλες ανάπτυξης των δύο μικροοργανισμών, όπως φαίνεται και στο σχήμα 7.12 (B), ακολούθησαν την ίδια πορεία ανάπτυξης,

φτάνοντας σε τελικό πληθυσμό στις 60 ημέρες τους 8.63 και 8.49 log CFU/g, για το *L. monocytogenes* και το *C. famata*, αντίστοιχα. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης του *C. famata*, έναντι του παθογόνου ήταν υψηλότερος και στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης και σχεδόν διπλάσιος στους 4.0 °C (Πίν. 7.5).

Το *C. zeylanoides*, στη συγκαλλιέργεια του με τα πλαγκτονικά κύτταρα του *L. monocytogenes* (Lm+Cz), στους 4.0 °C αποτέλεσε το μοναδικό μικροοργανισμό που κατάφερε ν' αναπτυχθεί και να παραμείνει σε όλη τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων σε πληθυσμό, υψηλότερο από του παθογόνου (Σχ. 7.13 A). Ο τελικός πληθυσμός του *C. zeylanoides* (8.45 log CFU/g), ωστόσο δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά με αυτόν του *L. monocytogenes* (8.15 log CFU/g; Πίν. 7.5). Στους 7.9 °C, όπως συνέβη και με το *C. famata*, οι δύο μικροοργανισμοί αυξήθηκαν και παρέμειναν στη στατική φάση, σε ίδια πληθυσμιακά επίπεδα. Ο τελικός πληθυσμός του *C. zeylanoides* και του *L. monocytogenes* στους 7.9 °C, ήταν 8.21 και 8.59 log CFU/g (Πίν. 7.5,  $P > 0.05$ ). Ο ειδικός ρυθμός αύξησης στους 4.0 °C και 7.9 °C, για το *C. zeylanoides* διαμορφώθηκε σε 0.814 και 0.616 d<sup>-1</sup> και για το *L. monocytogenes* το  $\mu_{max}$  ήταν 0.451 και 0.577 d<sup>-1</sup>, αντίστοιχα (Πίν. 7.5).

Στη συνέχεια των πειραμάτων δοκιμάστηκαν σε πολυκαλλιέργειες με τους ίδιους μικροοργανισμούς που αναφέρθηκαν παραπάνω, κύτταρα του *L. monocytogenes* (από το ίδιο μίγμα οροτύπων) που προέρχονταν από καλά σχηματισμένα βιοϋμένια σε μεταλλικές επιφάνειες από ανοξείδωτο χάλυβα.

Κατά τη συγκαλλιέργεια των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* με το μίγμα των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (AM+Lm Bf), στους 4.0 και 7.9 °C, ο τελικός πληθυσμός του *L. monocytogenes* (Lm Bf), μετά από 60 ημέρες ήταν μόλις 6.62 και 6.87 log CFU/g (Πίν. 7.5), έναντι 7.94 και 7.84 log CFU/g για τις ίδιες θερμοκρασίες αντιστοίχως σε μονοκαλλιέργεια (Πίν. 7.4). Ο τελικός πληθυσμός

των AM, παρουσία των βιοϋμενικών κυττάρων του παθογόνου παρέμεινε ανεπηρέαστος σε σχέση με τον αντίστοιχο σε μονοκαλλιέργεια και ήταν περίπου στους 8.50 log CFU/g και για τις δύο θερμοκρασίες. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης των AM ( $0.872 \text{ d}^{-1}$ ) στους  $4.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ήταν 3.5 φορές υψηλότερος από τον αντίστοιχο του παθογόνου (Lm Bf;  $0.872 \text{ d}^{-1}$ ) και 2 φορές υψηλότερος στους  $7.9 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Πίν. 7.5).

Στη συγκαλλιέργεια κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* με το *L. sakei* (Lm Bf+Ls), παρά τον χαμηλό ειδικό ρυθμό αύξησης του, το παθογόνο στους  $4.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$  και  $7.9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , έφτασε σε πληθυσμό τους 8.49 και 7.54 log CFU/g, αντίστοιχα (Σχ. 7.15 A & B). Στη χαμηλή θερμοκρασία ο πληθυσμός του βακτηρίου (Ls), μέχρι και την 15<sup>η</sup> ημέρα ήταν υψηλότερος του *L. monocytogenes* (Lm Bf), αλλά τελικά στις 60 ημέρες διαμορφώθηκε σε 7.95 log CFU/g (Σχ. 7.15 A). όμως, στους  $7.9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , ο τελικός πληθυσμός του *L. sakei*, ήταν υψηλότερος του παθογόνου και διαμορφώθηκε σε 7.65 log CFU/g, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 7.15 (B). Ο ειδικός ρυθμός αύξησης στους  $4.0$  και  $7.9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , του *L. monocytogenes* (Lm Bf) ήταν 0.244 και  $0.387 \text{ d}^{-1}$  και για το *L. sakei* (Ls), ήταν υψηλότερος και ίσος με 0.678 και  $0.487 \text{ d}^{-1}$  (Πίν. 7.5).

Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στη συγκαλλιέργεια των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* με το *L. curvatus* (Lm Bf+Lc). Στους  $4.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , ο τελικός πληθυσμός του *L. monocytogenes* (Lm Bf), έφτασε τους 8.54 log CFU/g και του *L. curvatus* (Lc), τους 7.93 log CFU/g (Πίν. 7.5,  $p < 0.05$ ). Μεταβολές παρατηρήθηκαν στην ανάπτυξη των κυττάρων του παθογόνου στους  $7.9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , καθώς φάνηκε από τα αποτελέσματα να περιορίζεται η ανάπτυξή του από το *L. curvatus*, αφού ο τελικός του πληθυσμός (7.54 log CFU/g) ήταν ακριβώς ένα λογάριθμο χαμηλότερος από τον αντίστοιχο στους  $4.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Σχ. 7.16 A & B). Ο τελικός πληθυσμός του *L. curvatus* (Lc), στην ίδια θερμοκρασία, παρέμεινε υψηλότερος από τον πληθυσμό του παθογόνου (Lm Bf) και ήταν ίσος με 7.65 log CFU/g (Σχ. 7.16 B).



Ο ειδικός ρυθμός αύξησης των οξυγαλακτικών κυττάρων στους 4.0 °C ήταν 3 φορές υψηλότερος σε σχέση με τα κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* (0.688 και 0.247 d<sup>-1</sup>; Πίν. 7.5). Στους 7.9 °C, το μ<sub>max</sub> του *L. curvatus* ήταν και πάλι μεγαλύτερο του παθογόνου με τιμή 0.487 και 0.358 d<sup>-1</sup>, αντίστοιχα (Πίν. 7.5).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν και οι συγκαλλιέργειες των κυττάρων βιοϋμενίων του παθογόνου με τα κύτταρα των ζυμών *C. famata* (Cf) και *C. zeylanoides* (Cz). Συγκεκριμένα, στην πρώτη περίπτωση συγκαλλιέργειας (Lm Bf+Cf), ο τελικός πληθυσμός του *L. monocytogenes* και του *C. famata*, παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά και ίσος με 8.56 και 8.46 log CFU/g, αντίστοιχα (Σχ. 7.17 A, P < 0.05). Ωστόσο, η ανάπτυξη του *L. monocytogenes* επηρεάστηκε από την παρουσία του *C. famata* στο στερεό υπόστρωμα στους 7.9 °C και συγκεκριμένα περιορίστηκε σε τελικό πληθυσμό ίσο με 7.62 log CFU/g την ώρα που ο πληθυσμός του *C. famata* ήταν 8.50 log CFU/g. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης, των κυττάρων του *C. famata* ήταν ο υψηλότερος στους 4.0 °C (0.928 d<sup>-1</sup>) και από τους υψηλότερους στους 7.9 °C (0.765 d<sup>-1</sup>; Πίν. 7.5). Αντιθέτως, τα κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, όπως και στις υπόλοιπες συγκαλλιέργειες είχαν αρκετά χαμηλό ειδικό ρυθμό αύξησης που ισούταν με 0.247 και 0.348 d<sup>-1</sup>, στους 4.0 και 7.9 °C (Πίν. 7.5).

Τέλος, κατά τη συγκαλλιέργεια του *C. zeylanoides* με το *L. monocytogenes* (βιοϋμένια) (Lm Bf+Cz), υπήρξαν μεγάλες ομοιότητες τόσο στις κινητικές παραμέτρους όσο και στην αύξηση των μικροοργανισμών, με την αντίστοιχη συγκαλλιέργεια του παθογόνου με το *C. famata*. Ο τελικός πληθυσμός του *C. zeylanoides* (Cz) και του *L. monocytogenes* (Lm Bf), στους 4.0 °C ήταν 8.55 και 8.42 log CFU/g (P > 0.05) και στους 7.9 °C, 7.64 και 8.35 log CFU/g, αντίστοιχα (Πίν. 7.5, P < 0.05). Ο ειδικός ρυθμός αύξησης του *C. zeylanoides* στους 4.0 °C, υπολογίστηκε

σε  $0.831 \text{ d}^{-1}$  και για το *L. monocytogenes* σε  $0.246 \text{ d}^{-1}$  (Πίν. 7.5). Για τη θερμοκρασία των  $7.9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , το  $\mu_{\text{max}}$  για το *C. zeylanoides* ήταν  $0.719 \text{ d}^{-1}$  και για το *L. monocytogenes*  $0.346 \text{ d}^{-1}$  (Πίν. 7.5).

Από τη μελέτη της συμπεριφοράς του παθογόνου *L. monocytogenes* (πλαγκτονικά και κύτταρα βιοϋμενίων) σε στερεά υποστρώματα καπνιστής πέστροφας, εμφανίστηκαν πολύ ενδιαφέροντα και μεταβαλλόμενα αποτελέσματα, παρουσία των επικρατέστερων μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τα τρυβλία και αποτέλεσαν τους ΑΜ των φιλέτων. Διαπιστώθηκε, πως πολλοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ανταγωνισμού μεταξύ των κυττάρων του παθογόνου με τα κύτταρα των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών. Το είδος των κυττάρων, ο συνδυασμός μικροοργανισμών αλλά και η θερμοκρασία, ήταν μερικοί από αυτούς τους παράγοντες.

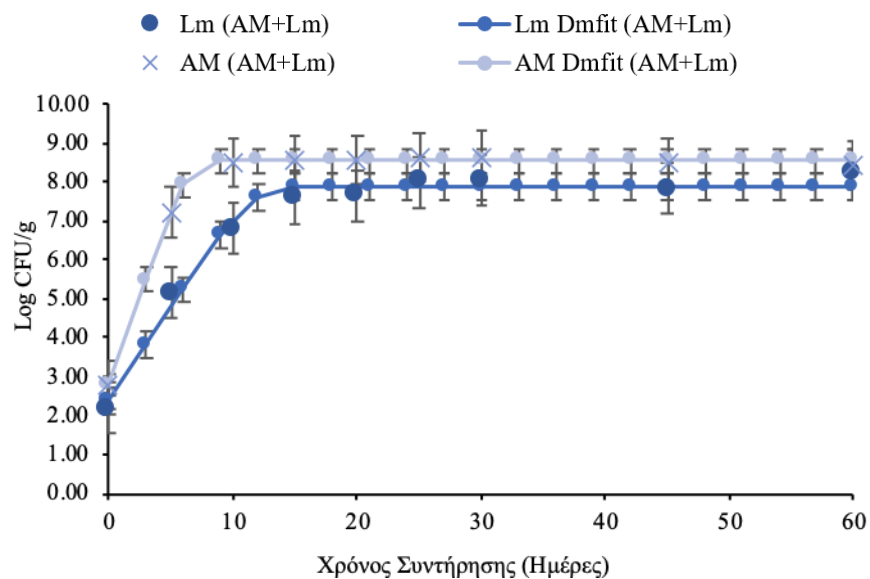
**Πίνακας 7.5.** Κινητικές παράμετροι των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του *L. monocytogenes* (πλαγκτονικά και κύτταρα βιοϋμενίων) σε πολυκαλλιέργειες, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη συντήρηση σε συνθήκες κενού αέρα στους 4.0 και 7.9 °C. Οι τιμές εκτός παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi (Baranyi & Roberts 1994).

Μικροοργανισμοί	4.0 °C				7.9 °C			
	Αρχικός πληθυσμός (log CFU/g±τυπ.απ.)	Τελικός πληθυσμός Nmax (log CFU/g±τυπ.απ.)	lag± τυπ. απ. (d)	μmax (d <sup>-1</sup> )	Τελικός πληθυσμός Nmax (log CFU/g±τυπ.απ.)	lag±τυπ. απ. (d)	μmax (d <sup>-1</sup> )	
Lm (AM+Lm)	2.19 ± 0.21 (2.24)	8.20 ± 0.23 (7.89 ± 0.29) <sup>abc</sup>	0.00	0.479	7.87 ± 0.07 (7.71 ± 0.32) <sup>bc</sup>	0.00	0.648	
AM (AM+Lm)	2.79 ± 0.13 (2.87)	8.42 ± 0.11 (8.55 ± 0.09) <sup>ab</sup>	0.00	0.898	8.39 ± 0.16 (8.49 ± 0.19) <sup>a</sup>	0.00	0.801	
Lm (Lm+Ls)	2.95 ± 0.07 (2.94)	8.22 ± 0.10 (8.00 ± 0.35) <sup>abc</sup>	0.00	0.435	8.21 ± 0.10 (8.10 ± 0.15) <sup>ab</sup>	0.00	0.544	
Ls (Lm+Ls)	2.76 ± 0.11 (2.99)	7.84 ± 0.14 (7.77 ± 0.05) <sup>cd</sup>	0.00	0.652	7.59 ± 0.10 (7.42 ± 0.19) <sup>c</sup>	0.00	0.525	
Lm (Lm+Lc)	2.87 ± 0.09 (2.81)	8.41 ± 0.14 (8.24 ± 0.52) <sup>ab</sup>	0.00	0.311	8.49 ± 0.09 (8.16 ± 0.33) <sup>a</sup>	0.00	0.590	
Lc (Lm+Lc)	2.96 ± 0.10 (3.16)	7.71 ± 0.10 (7.71 ± 0.14) <sup>d</sup>	0.00	0.608	7.68 ± 0.10 (7.45 ± 0.23) <sup>c</sup>	0.00	0.455	
Lm (Lm+Cf)	2.92 ± 0.11 (2.91)	8.59 ± 0.09 (8.25 ± 0.49) <sup>a</sup>	0.00	0.427	8.63 ± 0.04 (8.40 ± 0.26) <sup>a</sup>	0.00	0.559	
Cf (Lm+Cf)	2.74 ± 0.17 (2.86)	8.54 ± 0.07 (8.48 ± 0.11) <sup>ab</sup>	0.00	0.874	8.49 ± 0.10 (8.44 ± 0.16) <sup>a</sup>	0.00	0.796	
Lm (Lm+Cz)	2.87 ± 0.13 (2.98)	8.15 ± 0.07 (7.95 ± 0.29) <sup>bcd</sup>	0.00	0.451	8.56 ± 0.08 (8.35 ± 0.21) <sup>a</sup>	0.00	0.577	
Cz (Lm+Cz)	2.85 ± 0.21 (2.90)	8.45 ± 0.07 (8.20 ± 0.25) <sup>ab</sup>	0.00	0.814	8.21 ± 0.08 (8.17 ± 0.10) <sup>ab</sup>	0.00	0.616	
Lm Bf (AM+Lm Bf)	2.83 ± 0.17 (3.13)	6.62 ± 0.28 (7.27 ± 0.45) <sup>cd</sup>	0.00	0.269	6.87 ± 0.27 (6.97 ± 0.25) <sup>d</sup>	0.00	0.314	
AM (AM+Lm Bf)	2.96 ± 0.14 (3.04)	8.53 ± 0.16 (8.41 ± 0.24) <sup>ab</sup>	0.00	0.872	8.47 ± 0.05 (8.47 ± 0.16) <sup>a</sup>	0.00	0.725	
Lm Bf (Lm Bf+Ls)	2.72 ± 0.19 (2.66)	8.49 ± 0.22 (8.41 ± 0.38) <sup>ab</sup>	0.00	0.244	7.54 ± 0.09 (7.35 ± 0.19) <sup>c</sup>	0.00	0.387	
Ls (Lm Bf+Ls)	2.90 ± 0.11 (3.17)	7.95 ± 0.12 (7.89 ± 0.04) <sup>cd</sup>	0.00	0.678	7.65 ± 0.14 (7.53 ± 0.20) <sup>c</sup>	0.00	0.487	
Lm Bf (Lm Bf+Lc)	2.70 ± 0.06 (2.72)	8.54 ± 0.06 (8.47 ± 0.36) <sup>ab</sup>	0.00	0.241	7.54 ± 0.13 (7.37 ± 0.20) <sup>c</sup>	0.00	0.358	

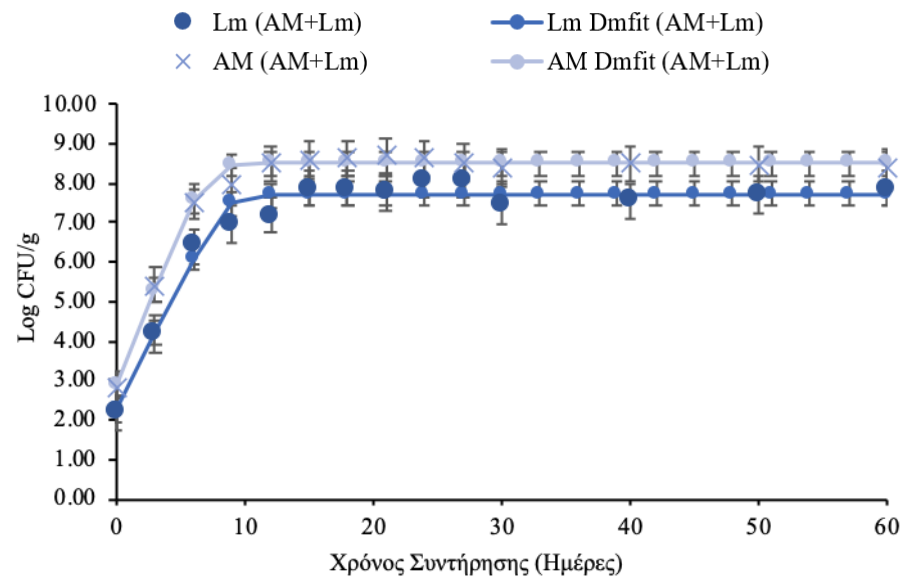
**Πίνακας 7.5. (Συνέχεια)**

Lc (Lm Bf+Lc)	2.74 ± 0.09 (3.17)	7.93 ± 0.12 (7.78 ± 0.11) <sup>cd</sup>	0.00	0.688	7.65 ± 0.10 (7.53 ± 0.20) <sup>c</sup>	0.00	0.487
Lm Bf (Lm Bf+Cf)	2.59 ± 0.02 (2.69)	8.56 ± 0.08 (8.46 ± 0.43) <sup>ab</sup>	0.00	0.247	7.62 ± 0.06 (7.47 ± 0.23) <sup>c</sup>	0.00	0.348
Cf (Lm Bf+Cf)	2.69 ± 0.17 (2.71)	8.46 ± 0.09 (8.49 ± 0.09) <sup>ab</sup>	0.00	0.928	8.50 ± 0.04 (8.39 ± 0.08) <sup>a</sup>	0.00	0.765
Lm Bf (Lm Bf+Cz)	2.63 ± 0.04 (2.69)	8.55 ± 0.11 (8.45 ± 0.42) <sup>ab</sup>	0.00	0.246	7.64 ± 0.13 (7.50 ± 0.24) <sup>c</sup>	0.00	0.346
Cz (Lm Bf+Cz)	2.78 ± 0.22 (2.80)	8.42 ± 0.20 (8.19 ± 0.34) <sup>ab</sup>	0.00	0.831	8.35 ± 0.11 (8.27 ± 0.14) <sup>a</sup>	0.00	0.719

Οι τιμές (μέσοι όροι ± τυπ. απόκλιση, 6 επαναλήψεων), εντός της ίδιας θερμοκρασίας, στην ίδια στήλη, που συμβολίζονται με διαφορετικό μικρό γράμμα έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ). Η σύγκριση για τον αρχικό πληθυσμό των διαφόρων μικροοργανισμών δεν πραγματοποιήθηκε, καθώς ο αρχικός πληθυσμός είχε υπολογιστεί να είναι περίπου 3.00 log CFU/g.

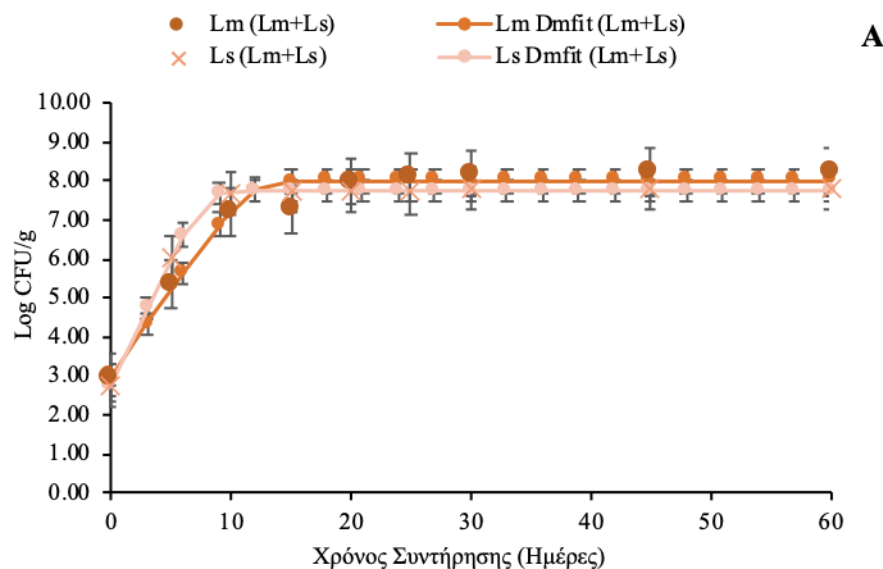


**A**

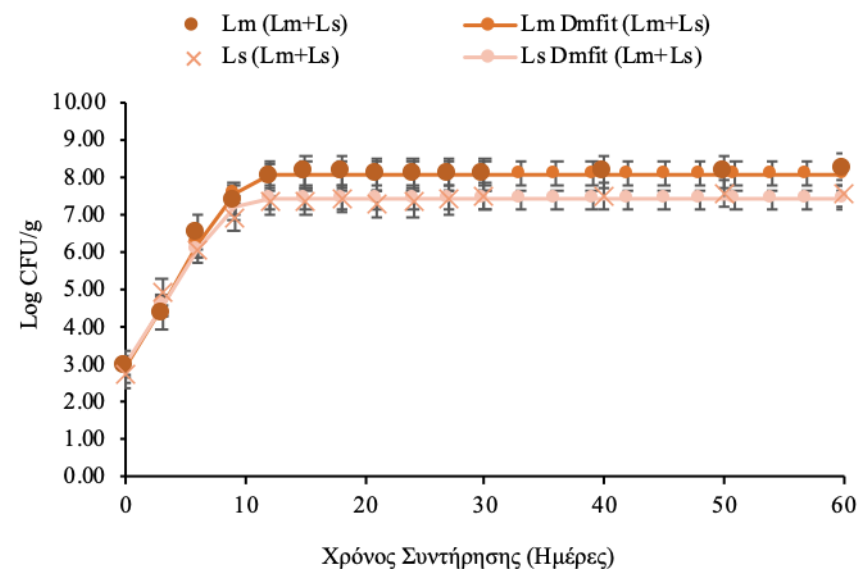


**B**

**Σχήμα 7.9.** Πληθυσμιακές μεταβολές των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε μίγμα (●) και του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ×), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).

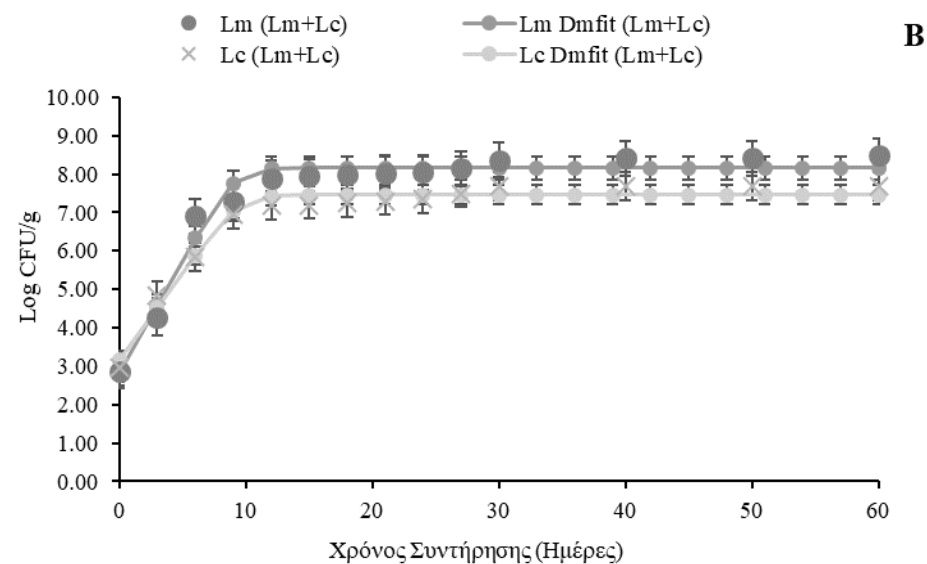
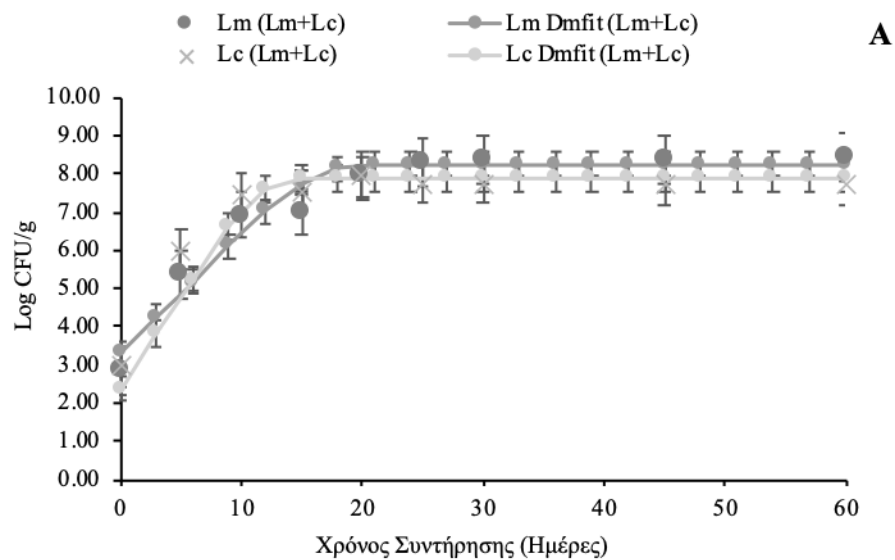


**A**

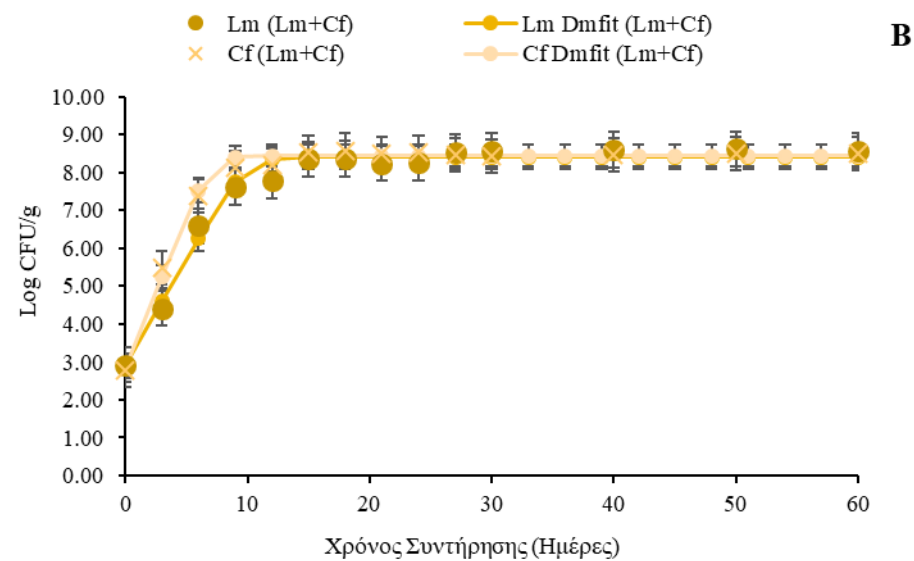
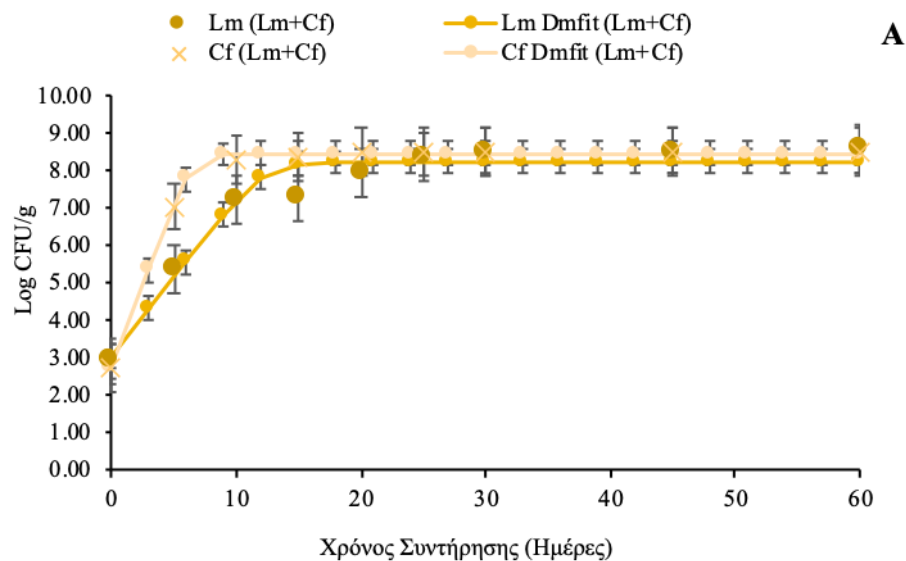


**B**

**Σχήμα 7.10.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Lactobacillus sakei* (●) και του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ×), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).

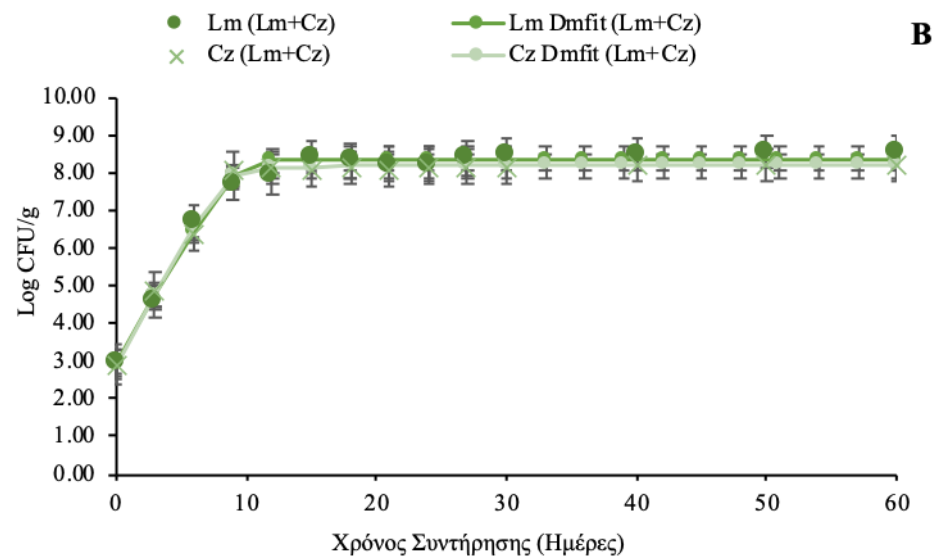
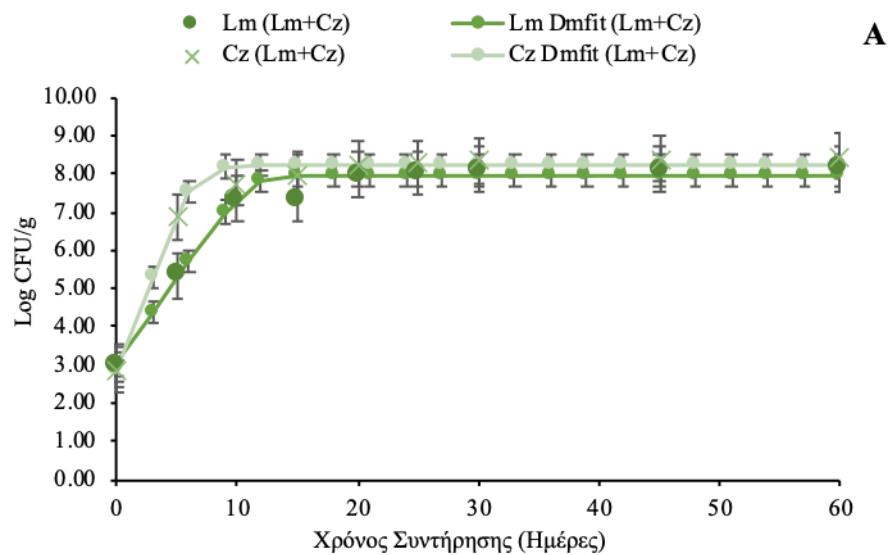


**Σχήμα 7.11.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Lactobacillus curvatus* (●) και του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ×), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).

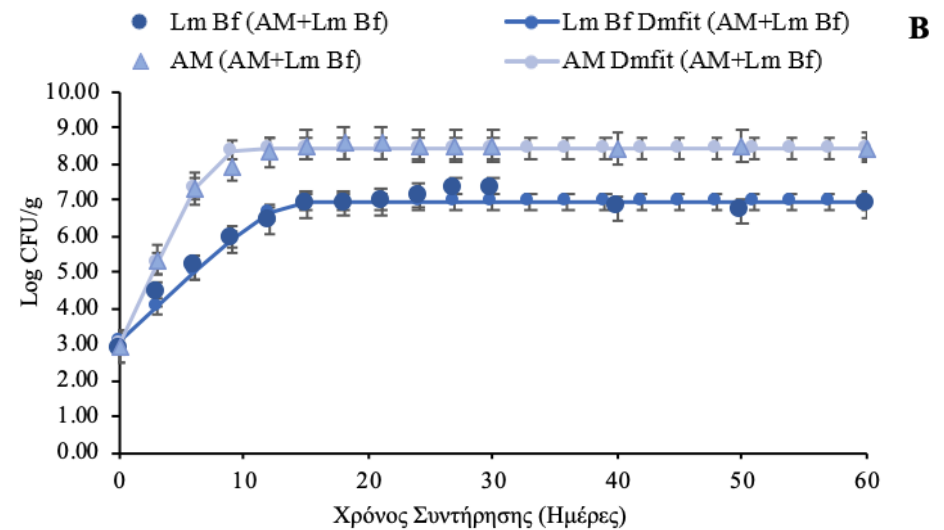
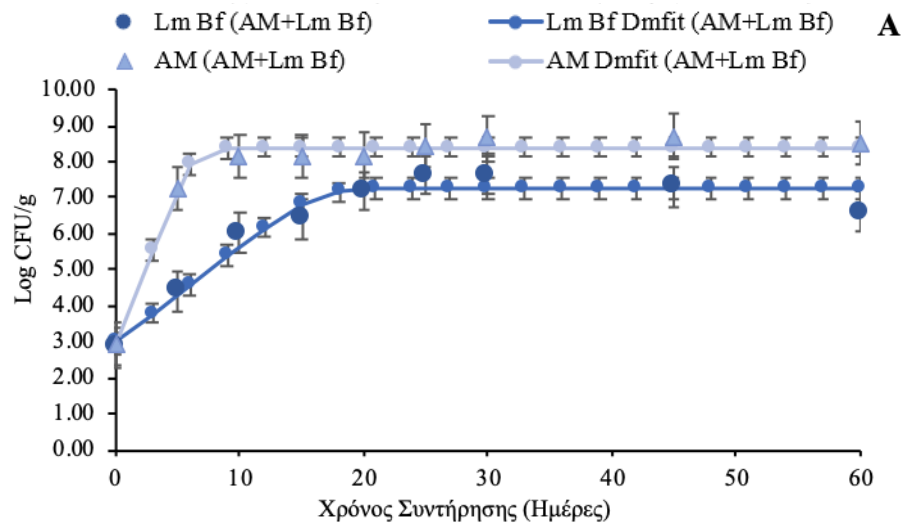


**Σχήμα 7.12.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Candida famata* (●) και του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ×), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).

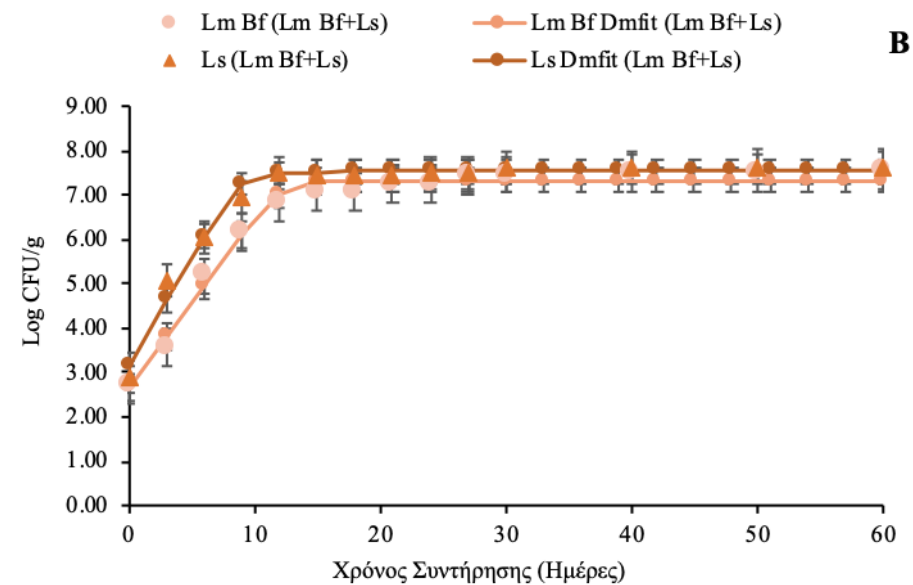
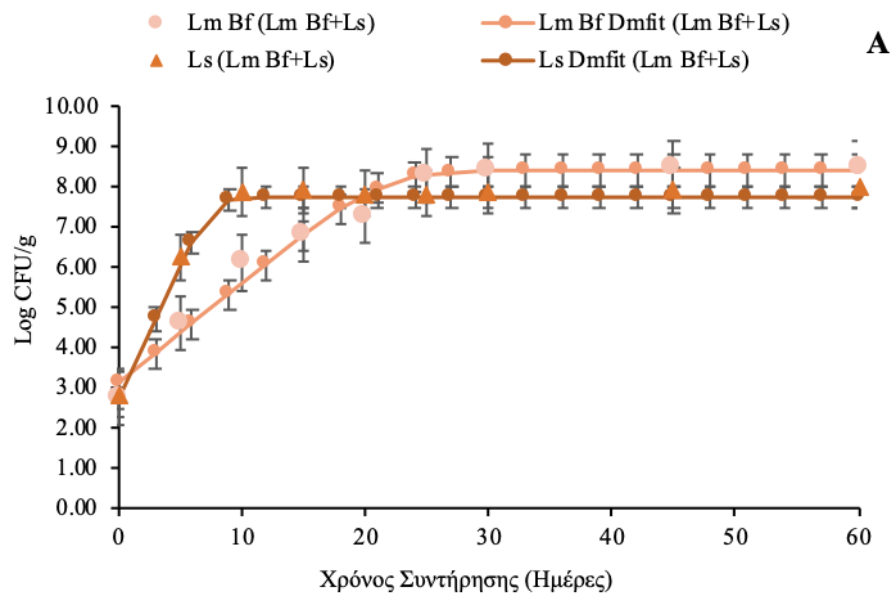




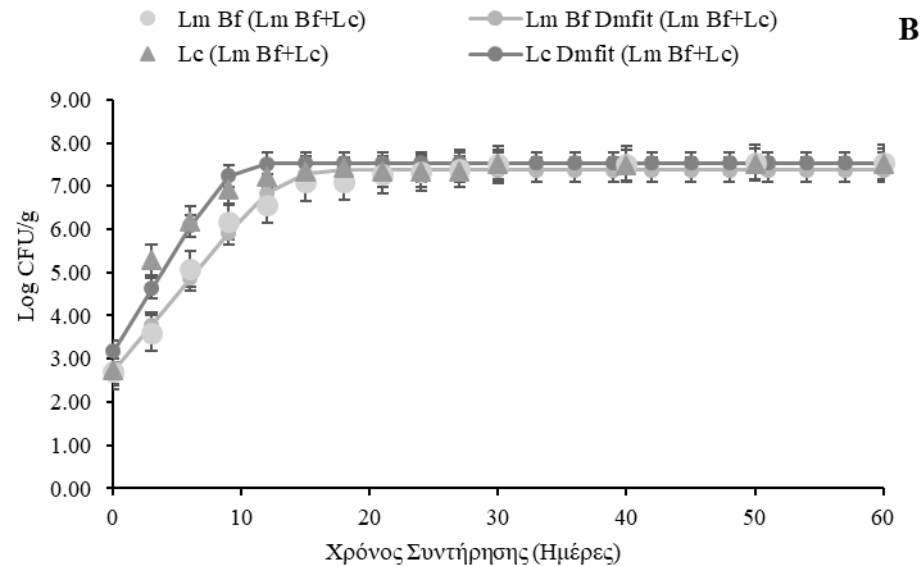
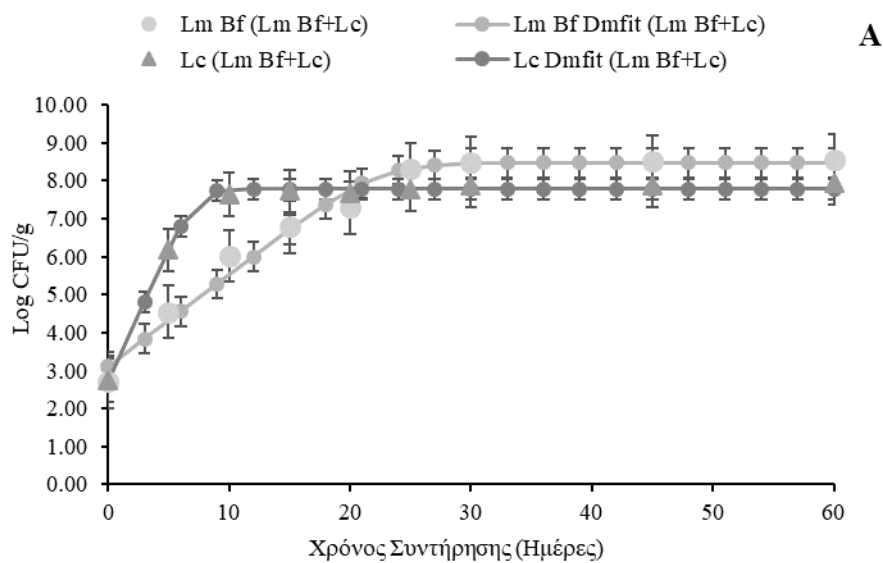
**Σχήμα 7.13.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Candida zeylanoides* (●) και του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ×), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).



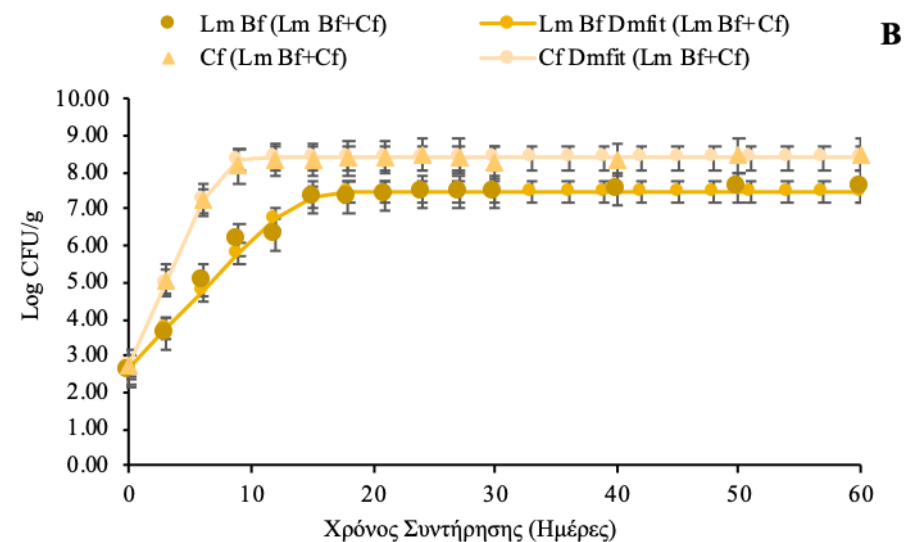
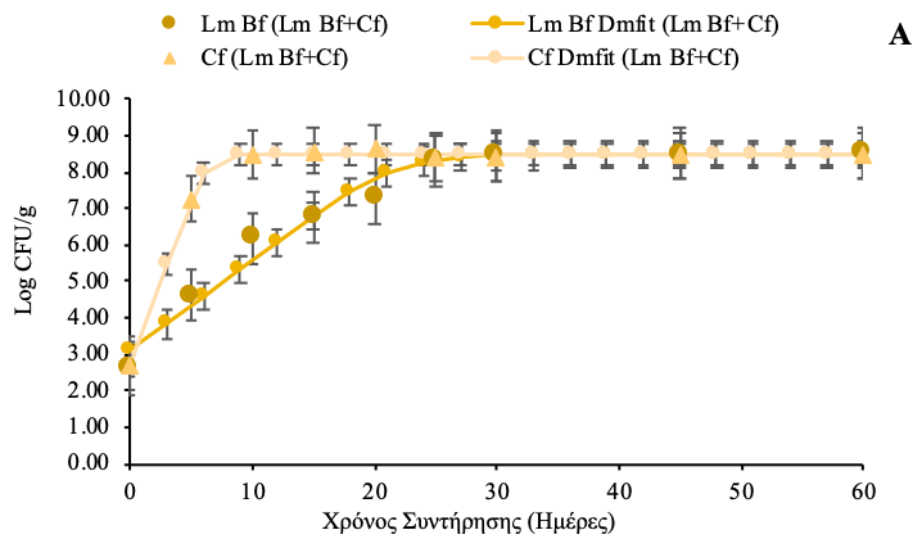
**Σχήμα 7.14.** Πληθυσμιακές μεταβολές των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε μίγμα (▲) και των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ●), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6).



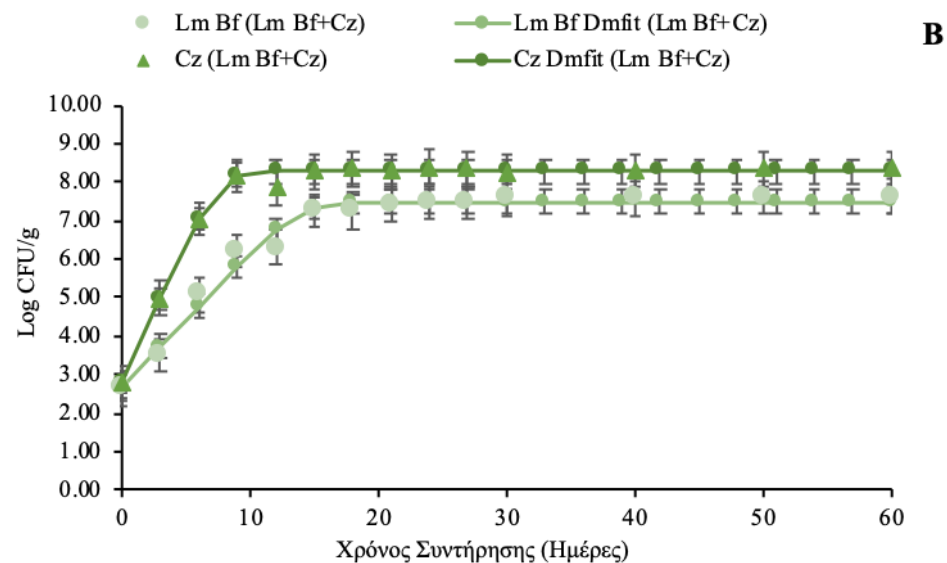
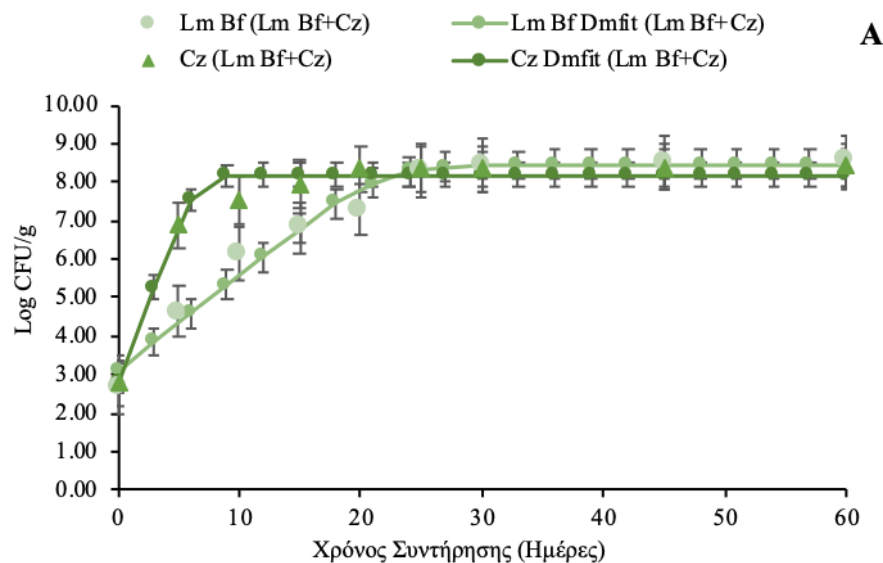
**Σχήμα 7.15.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Lactobacillus sakei* (▲) και των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ●), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).



**Σχήμα 7.16.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Lactobacillus curvatus* (▲) και των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ●), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).



**Σχήμα 7.17.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Candida famata* (▲) και των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ●), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).



**Σχήμα 7.18.** Πληθυσμιακές μεταβολές του *Candida zeylanoides* (▲) και των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* (μίγμα διαφόρων οροτύπων; ●), μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πολυκαλλιέργεια, σε στερεά μοντέλα υποστρώματος καπνιστής πέστροφας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συσκευασία υπό κενό A) στους 4.0 °C, B) στους 7.9 °C. Οι κουκίδες υποδεικνύουν τις τιμές από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι γραμμές με το ίδιο χρώμα απεικονίζουν την προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης στα δεδομένα με το μοντέλο Baranyi. Οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 3).

#### 7.4. Συζήτηση

Η συχνή επιμόλυνση των καπνιστών αλιευτικών προϊόντων σε υψηλά ποσοστά (15 %) με το παθογόνο *L. monocytogenes* (Shin et al., 2008) είναι καλά τεκμηριωμένη και αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για την ασφάλεια των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων, όπως είναι και τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας. Λόγω της αφθονίας του *L. monocytogenes*, στη φύση και στο περιβάλλον επεξεργασίας, η επιμόλυνση ενός τροφίμου μπορεί να γίνει όχι από ένα αλλά από περισσότερα στελέχη του βακτηρίου (Navas et al., 2007) αλληλοεπιδρώντας μεταξύ τους ή με τους διάφορους μικροοργανισμούς που υπάρχουν και αναπτύσσονται στο τρόφιμο (Zilelidou & Skandamis, 2018). Για την διερεύνηση της συμπεριφοράς του παθογόνου και τις συνθήκες που επηρεάζουν την επιβίωση του διεξάγονται δοκιμές ανταγωνισμού (challenge test; Sabanadesan et al., 2000), όπως έγινε και στο παρόν Κεφάλαιο.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια στην επιφάνεια των επιμολυσμένων φιλέτων καπνιστής πέστροφας, επικράτησαν και στις 2 θερμοκρασίες αποθήκευσης ξεπερνώντας τους 8.00 log CFU/g, έπειτα από 40 (4.0 °C) και 45 ημέρες (7.9 °C) και η ανάπτυξη τους δε φάνηκε να επηρεάζεται από την παρουσία των κυττάρων του *L. monocytogenes* ή τη θερμοκρασία. Ομοίως, οι Tosun & Özden (2014) αναφέρουν ότι, ο πληθυσμός των ψυχρότροφων βακτηρίων σε ενοφθαλμισμένα φιλέτα καπνιστής πέστροφας (σε κενό) παρουσία του *L. monocytogenes*, έπειτα από 42 ημέρες στους 2.0 °C, ήταν 7.35 log CFU/g. Οι Shin et al. (2008), αναφέρουν ότι το *L. monocytogenes*, που ενοφθαλμίστηκε σε φιλέτα καπνιστής πέστροφας θερμής κάπνισης, σε συνθήκες κενού αέρα, στους 3.0 °C, αυξήθηκε μόλις 1.00 log CFU/g, μετά από 30 ημέρες συντήρησης, σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα με τα οποία συμφωνούν οι Tosun & Özden (2014), όπου ο πληθυσμός του παθογόνου έφτασε τους  $7.90 \pm 0.45$  log CFU/g μετά από 42 ημέρες στους 2.0 °C. Αναφορικά με την υψηλότερη

θερμοκρασία μελέτης (7.9 °C), οι Shin et al. (2008), βρήκαν ότι στους 7.0 °C, σε διάστημα 30 ημερών το *L. monocytogenes*, έφτασε τους 7.00 log CFU/g. Ωστόσο, οι Jemni & Keusch (1992), ενοφθαλμίζοντας φιλέτα καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης), με ένα μόνο στέλεχος *L. monocytogenes* (ορότυπος 1/2 b), μετά από 20 ημέρες αποθήκευσης στους 8 – 10 °C, παρατήρησαν ότι ο πληθυσμός του έφτασε τους 7.00 MPN/g.

Ο πληθυσμός των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* στην επιφάνεια των φιλέτων φάνηκε να επηρεάζεται από την παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων (σε υψηλούς πληθυσμούς), καθώς από 6.41 log CFU/g (ημέρα 30) μειώθηκε σε 5.56 log CFU/g (ημέρα 60) στους 4.0 °C, και από 6.97 σε 6.12 log CFU/g για τις ίδιες μέρες, αντίστοιχα στους 7.9 °C. Πράγματι, άλλες μελέτες διαπίστωσαν (σε υγρό θρεπτικό) πως ο πληθυσμός του *L. monocytogenes* μειώθηκε παρουσία οξυγαλακτικών βακτηρίων (με δυνατότητα ή μη παραγωγής βακτηριοσίνης) σε συγκαλλιέργεια με το *Lactobacillus plantarum* (Mellefont et al., 2008) ή το *Carnobacterium piscicola* (Buchanan & Bagi, 1997), όταν ο αρχικός πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν υψηλότερος από τον αντίστοιχο του παθογόνου. Εκτός όμως από τη συγκέντρωση (πληθυσμό) των μικροοργανισμών στα φιλέτα, η μείωση του πληθυσμού των κυττάρων βιοϋμενίων του παθογόνου, μπορεί να σχετίζεται με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του τροφίμου, τη θερμοκρασία συντήρησης καθώς και το ιστορικό ανάπτυξης και τον ανταγωνισμό για τις διαθέσιμες πηγές (Buchanan & Bagi, 1997; Smoot & Pierson, 1998; Chavant et al., 2002; Mai & Conner, 2007; Mejlholm et al., 2015). Επίσης, μπορεί να οφείλεται στην παραγωγή οργανικών ενώσεων, όπως το γαλακτικό οξύ, το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), η καταλάση και άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα, από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Blanco-Lizarazo et al., 2016).



Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και το *L. monocytogenes*, είναι από τους καλύτερα προσαρμοσμένους μικροοργανισμούς με την ικανότητα να αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Delboni & Yang, 2017). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια και ορισμένα είδη ζυμών, έχουν την ικανότητα να αλλοιώνουν τρόφιμα, όπως τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας με μεγάλη διάρκεια ζωής αποθηκευμένα υπό ψύξη (in't Veld, 1996; Jay et al., 2005), όπως αποδεικνύεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής. Κατά τη διάρκεια συντήρησης των τροφίμων, οι πληθυσμοί αυτών των μικροοργανισμών μπορεί να αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους. Η αλληλεπίδραση του *L. monocytogenes*, με τους μικροοργανισμούς του τροφίμου, μπορεί να οδηγήσει, στην παρεμπόδιση της ανάπτυξής του, στη μείωση ή ακόμη και στην αύξηση του πληθυσμού του (Zilelidou & Skandamis, 2018). Συγκεκριμένα οι Lianou & Sofos (2007), ανέφεραν ότι σε καπνιστά ψάρια (θερμής κάπνισης), η απουσία του φυσικού μικροβιώματος του τροφίμου, οδήγησε στο γρήγορο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του *L. monocytogenes*. Τα αλιευτικά προϊόντα θερμής κάπνισης, είναι πιο ευάλωτα στην επιμόλυνση τους με παθογόνους μικροοργανισμούς συγκριτικά με αυτά της ψυχρής κάπνισης, αφού συνήθως δεν υπάρχει ανταγωνιστικό φυσικό μικροβίωμα (Jemmi & Keusch, 1992).

Η αλληλεπίδραση του παθογόνου με τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς του τροφίμου έχει μελετηθεί εκτενώς σε τρόφιμα όπως ο καπνιστός σολομός (ψυχρής κάπνισης; Gimenez & Dalgaard, 2004; Delignette-Muller et al., 2006; Mejlholm & Dalgaard, 2007), τα πουλερικά και τα κρεατοπαρασκευάσματα (Devlieghere et al., 2001; Mellefont & Ross, 2007; Ross et al., 2009; Melero et al., 2013; Baka et al., 2014) και τα λαχανικά (Breidt & Fleming, 1998; Liao & Sapers, 1999; Liao & Fett, 2001) αλλά ποτέ σε φιλέτα καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης). Οι περισσότερες μελέτες, ερευνούν την αλληλεπίδραση του παθογόνου με μεμονωμένα

στελέχη μικροοργανισμών που μπορεί να βρίσκονται στο τρόφιμο, ενώ στο παρόν κεφάλαιο έγινε διερεύνηση της συμπεριφοράς του *L. monocytogenes* και σε συγκαλλιέργεια με το μίγμα των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που είχαν απομονωθεί από τα φιλέτα.

Διφορούμενα συμπεράσματα προέκυψαν ως προς την ικανότητα του *L. monocytogenes* να αναπτύσσεται και να ανταγωνίζεται σε συγκαλλιέργειες με τους πιθανούς ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς των φιλέτων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι στις περισσότερες περιπτώσεις συγκαλλιέργειας τα πλαγκτονικά κύτταρα του παθογόνου κατάφεραν να αναπτυχθούν και να κυριαρχήσουν κατά τη διάρκεια συντήρησης των στερεών μοντέλων στους 4.0 °C και 7.9 °C. Ωστόσο, υπήρχαν διάφορες περιπτώσεις αλληλεπίδρασης, όπως συνέβη στη συγκαλλιέργεια των πλαγκτονικών κυττάρων του παθογόνου με το μίγμα των AM, όπου περιορίστηκε η ανάπτυξη του *L. monocytogenes*. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη ισχυρών ή και πιο αδύναμων ανταγωνιστικών στελεχών κατά του *L. monocytogenes* (Heir et al., 2018). Πράγματι, έπειτα από συγκαλλιέργεια των κυττάρων του παθογόνου με τους πιθανούς ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς που αποτέλεσαν το μίγμα των AM, βρέθηκε ανασταλτική δράση,  $< 0.50 \log$  του *C. famata* και  $< 1.00 \log$  του *C. zeylanoides* στους 4.0 °C έναντι των πλαγκτονικών κυττάρων του *L. monocytogenes*. Όπως περιγράφουν και οι Hibbing et al. (2010), ο ανταγωνισμός μεταξύ των βακτηρίων για τις διαθέσιμες πηγές συστατικών μπορεί να αποτελεί πιθανό παράγοντα της μείωσης του πληθυσμού των κυττάρων του παθογόνου σε συγκαλλιέργεια με τα στελέχη των ζυμών. Το ίδιο περιγράφουν και άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα και σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων, τονίζοντας ότι η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *L. monocytogenes*, οφείλονταν στον ανταγωνισμό

για θρεπτικά με άλλους μικροοργανισμούς (Delignette-Muller et al., 2006; Guillier et al., 2008). Οι αλληλεπιδράσεις του *L. monocytogenes* με τα οξυγαλακτικά βακτήρια: *L. sakei* και *L. curvatus*, φάνηκαν να είναι συμβιωτικές.

Από τον ανταγωνισμό των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς, παρατηρήθηκαν ποικίλες συμπεριφορές. Αρχικά, παρουσία του μίγματος των AM, ο πληθυσμός των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, μετά από 60 ημέρες αποθήκευσης μειώθηκε αισθητά, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Leriche & Carpentier (2000), που αναφέρουν πως ο ανταγωνισμός του *L. monocytogenes* (διαφορετικά στελέχη) με το μικροβίωμα του τροφίμου οδήγησε σε μειωμένους πληθυσμούς κυττάρων βιοϋμενίων. Το αποτέλεσμα αυτό αποδόθηκε στον ανταγωνισμό μεταξύ των κυττάρων, όπως προαναφέρθηκε για τη διαθέσιμη τροφή αλλά και στην παραγωγή εξωκυτταρικών ουσιών. Από την άλλη πλευρά, η παρουσία άλλων μικροοργανισμών σε πολυκαλλιέργειες μπορεί να έχει θετική επιρροή για την ανάπτυξη του *L. monocytogenes*. Συχνά αναφέρεται ότι η παρουσία διαφόρων *Pseudomonas* spp., τόσο σε τεχνητά θρεπτικά υλικά όσο και σε τρόφιμα μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ανάπτυξη του πληθυσμού του *L. monocytogenes* (Tsigarida et al., 2000; Giaouris et al., 2015). Στη δική μας περίπτωση, ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων του *L. monocytogenes*, σε συγκαλλιέργεια με το *L. sakei* ή το *L. curvatus* στους 4.0 °C, οδήγησε σε αύξηση του πληθυσμού του παθογόνου (> 0.50 log). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στη συγκαλλιέργεια του παθογόνου με τους *C. famata* και *C. zeylanoides*, στους 4.0 °C. Πράγματι, οι Ren et al. (2015), αναφέρουν πως η συνεργιστική αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών σε πολυκαλλιέργειες μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ανάπτυξη των κυττάρων βιοϋμενίων. Η επίδραση των φυσικά εμφανιζόμενων μικροοργανισμών ενός τροφίμου στην ανάπτυξη των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*,

μπορεί να είναι ουδέτερη, αρνητική ή και θετική και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που πρέπει να διερευνηθούν σε βάθος (Giaouris et al., 2015; Røder et al., 2015; Sanchez-Vizuete et al., 2015). Η θερμοκρασία ήταν σημαντικός παράγοντας για τη διαφορετική συμπεριφορά στον ανταγωνισμό του παθογόνου με τους ΑΜ. Χαρακτηριστικά, το *C. zeylanoides*, στους 4.0 °C δεν παρουσίασε ανασταλτική δράση ενώ στους 7.9 °C είχε μικρή ανασταλτική δράση (< 0.30 log) στα κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*. Η ανασταλτική δράση για το *C. zeylanoides* καθώς και άλλων *Candida* spp. που απομονώνονται από τα τρόφιμα, έχει αναφερθεί έναντι του *L. monocytogenes* στη μελέτη των Goerges et al. (2006).

Στους 4.0 °C, στις πολυκαλλιέργειες όπου ενοφθαλμίστηκαν κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* μαζί με τους πιθανούς ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς μεμονωμένα, Ls, Lc, Cf και Cz, η ανάπτυξη των κυττάρων βιοϋμενίων αρχικά περιορίστηκε και στη συνέχεια ξεπέρασε την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών. Οι Winkelströter et al. (2011), παρατήρησαν ότι το στέλεχος CFNS-S1 του *L. sakei* (με τη δυνατότητα παραγωγής βακτηριοσίνης, sakacin 1) αρχικά εμπόδιζε την ανάπτυξη των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* σε μεταλλικά κουπόνια (ανοξειδωτού χάλυβα). Ωστόσο, μετά από 2 ημέρες η ανάπτυξη των κυττάρων βιοϋμενίων του παθογόνου, παρουσία του *L. sakei* CFNS-S1 και του ATCC 15521 (χωρίς τη δυνατότητα παραγωγής βακτηριοσίνης) ήταν ίδια, καταλήγοντας ότι η αρχική ανασταλτική δράση του *L. sakei* CFNS-S1, δεν οφείλονταν εξ ολοκλήρου στη δράση της βακτηριοσίνης σε συμφωνία με άλλες μελέτες (Minei et al., 2008; Hammami et al., 2009). Όταν έγινε ενοφθαλμισμός ωστόσο των βιοϋμενίων με το μίγμα των ΑΜ, δεν παρατηρήθηκε το παραπάνω φαινόμενο, καθώς τόσο στους 4.0 °C όσο και στους 7.9 °C, ο πληθυσμός των ΑΜ ήταν υψηλότερος των κυττάρων βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* που μειώθηκαν έως και 1.50 log περίπου (ημέρα

60). Όντως, οι Vesccovo et al. (2006), συμπέραναν ότι ο συνδυασμός διαφορετικών στελεχών LAB, μπορεί να οδηγήσει στην αποτελεσματικότερη αναστολή των κυττάρων του *L. monocytogenes*.

Πολλές μελέτες έχουν περιγράψει, τη δυνατότητα παραγωγής βακτηριοσινών από τα οξυγαλακτικά βακτήρια του γένους *Lactobacillus*, που έχουν απομονωθεί από διάφορα τρόφιμα (Tichaczek et al., 1992; Sudirman et al., 1993; Garver & Muriana, 1994; Mataragas et al., 2002). Τα *L. sakei* και *L. curvatus*, αποτελούν μερικούς από τους πιο συχνά μελετώμενους μικροοργανισμούς (Ahmadova, 2013). Σε δοκιμαστικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο παραγωγής βακτηριοσίνης από τους μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας, δεν φάνηκε να υπάρχει δυνατότητα παραγωγής της από τα συγκεκριμένα στελέχη (αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Η παραγωγή βακτηριοσίνης, μπορεί να εξαρτάται από παράγοντες όπως οι συνθήκες καλλιέργειας των βακτηρίων, το υλικό καλλιέργειας και το pH, τη θερμοκρασία καθώς και το στάδιο ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Gänzle et al. 1999; Todorov et al. 2012; Zhang et al. 2012; Zhou et al. 2015; Turgis et al. 2016). Στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης και σε υψηλές συγκεντρώσεις του πληθυσμού των μικροοργανισμών μπορεί να μην παραχθεί βακτηριοσίνη (Todorov & Dicks 2009; Masuda et al. 2016; Yang et al., 2018).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το παρόν Κεφάλαιο, επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι ο ανταγωνισμός των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών με τα κύτταρα (πλαγκτονικά και βιοϋμενίων) του *L. monocytogenes*, μπορεί να έχει ποικίλα αποτελέσματα στην ανάπτυξη τους. Σε όλες τις περιπτώσεις συγκαλλιέργειας του *L. monocytogenes* (πλαγκτονικά και κύτταρα βιοϋμενίων, 4.0 και 7.9 °C) σε συγκαλλιέργεια με το μίγμα των AM, η ανάπτυξη του παθογόνου περιορίστηκε. Η

συγκαλλιέργεια των πλαγκτονικών κυττάρων του παθογόνου με τους AM ξεχωριστά, στους 4.0 °C φάνηκε να είναι συμβιωτική ενώ στους 7.9 °C, η ανάπτυξη των AM (Ls, Lc, Cz & Cf) περιορίστηκε από την παρουσία του *L. monocytogenes*. Το αντίθετο φαινόμενο παρατηρήθηκε για τα κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, με εξαίρεση στους 7.9 °C, όπου η ανάπτυξη του *L. monocytogenes* περιορίστηκε από τα *C. famata* και *C. zeylanoides*. Η συμπεριφορά του παθογόνου, όπως και ο σχηματισμός και η ανάπτυξη βιοϋμενίων, δεν θα μπορούσε να μην επηρεάζεται από την συνύπαρξη του με άλλους μικροοργανισμούς στο ίδιο μέσο, αλλά και από άλλους παράγοντες, όπως είναι η θερμοκρασία, το είδος και ο ανταγωνισμός μεταξύ των μικροοργανισμών. Αν και πολυάριθμες μελέτες έχουν ασχοληθεί με τον τρόπο με τον οποίο το *L. monocytogenes*, επιμολύνει τα αλιευτικά προϊόντα, θα πρέπει να δοθεί μεγαλύτερη προσοχή στον μηχανισμό και την κατανόηση των διάφορων περιβαλλοντικών παραγόντων που επηρεάζουν και υποστηρίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου κάνοντας τα αλιευτικά προϊόντα, όπως είναι και τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης) μη ασφαλή. Από τη μεριά της δημόσιας υγείας θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω η συμπεριφορά του παθογόνου, *L. monocytogenes*, ώστε να έχουμε πιο ασφαλή συμπεράσματα τα οποία θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη ή την αναστολή της ανάπτυξης του παθογόνου στα τρόφιμα.

## **Κεφάλαιο 8. Αδρανοποίηση του *L. monocytogenes* σε φιλέτα νωπής και καπνιστής πέστροφας με Υπερυψηλή Υδροστατική Πίεση (ΥΥΠ)**

### **8.1. Εισαγωγή**

Παρά το μεγάλο εύρος τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την συντήρηση των αλιευμάτων και τον έλεγχο της ανάπτυξης των παθογόνων σε αυτά (Neil, 2012; Boziaris, 2014), η μικροβιολογική αλλοίωση αλλά και τα παθογόνα βακτήρια παραμένουν σημαντικό πρόβλημα το οποίο πρέπει να επιλυθεί με αποτελεσματικό έλεγχο (Khan et al., 2017). Οι καινοτόμες μέθοδοι επεξεργασίας τροφίμων, όπως η Υψηλή Υδροστατική Πίεση (ΥΥΠ), προσφέρουν σημαντικές λύσεις που μπορούν να ενισχύσουν την ασφάλεια των τροφίμων και να παρατείνουν τον εμπορικό χρόνο ζωής των έτοιμων προς κατανάλωση (RTE) τροφίμων (Stratakos et al., 2019) και αλιευτικών προϊόντων (Georget et al., 2015; Syed et al., 2016; Possas et al., 2017).

Στις ημέρες μας, οι καταναλωτές επιθυμούν τρόφιμα ελαφρώς επεξεργασμένα χωρίς χημικά πρόσθετα, ασφαλή και με μεγάλη διάρκεια ζωής (Spence, 2006; Sun-Waterhouse et al., 2014; Moses et al. 2014). Η χρήση της ΥΥΠ μπορεί να συνεισφέρει στις παραπάνω απαιτήσεις των καταναλωτών, προσφέροντας ασφαλή προϊόντα, χωρίς να επηρεάζεται η θρεπτική τους αξία, αλλά και τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Τις τελευταίες δεκαετίες, η χρήση αυτής της τεχνικής έχει επεκταθεί σε μία πληθώρα τροφίμων στα οποία περιλαμβάνονται τα νωπά ψάρια και τα αλιευτικά προϊόντα. Επιπλέον, διάφορα προϊόντα που έχουν επεξεργαστεί με την ΥΥΠ είναι εμπορικώς διαθέσιμα σε περιοχές της κεντρικής Αμερικής, της Ευρώπης, της Αυστραλίας και της Ασίας. Στα αλιευτικά προϊόντα, η ΥΥΠ εφαρμόζεται ως μία μη θερμική επεξεργασία για την αδρανοποίηση των παθογόνων αλλά και τη μείωση

των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (Koutchma, 2014). Ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της ΥΥΠ είναι το υψηλό αρχικό κόστος επένδυσης για τον εξοπλισμό, το οποίο σε συνδυασμό με το κόστος λειτουργίας και τη χαμηλή παραγωγική δυνατότητα σε παρτίδες, έχει οδηγήσει στην περιορισμένη χρήση από τη βιομηχανία τροφίμων. Για το λόγο αυτό, η πλειοψηφία των ερευνητικών εργασιών επικεντρώνεται στη μείωση της εφαρμοζόμενης πίεσης, η οποία με τη σειρά της μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερα λειτουργικά κόστη και συντομότερο χρόνο επεξεργασίας, που μεταφράζεται σε αυξημένη παραγωγή παρτίδων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί ακολουθώντας τις βασικές αρχές της «Τεχνολογίας Εμποδίων», όπως τις περιέγραψε ο Leistner (1992).

Τα καπνιστά ψάρια διατίθενται συνήθως ως έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (RTE) και η χρήση της ΥΥΠ θα μπορούσε να βελτιώσει την ποιότητα τους και να συνεισφέρει στην περαιτέρω μείωση του μικροβιακού τους φορτίου αλλά και στην εξάλειψη των παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, πριν το στάδιο της ΥΥΠ θα μπορούσε να γίνει κατάψυξη των προϊόντων, ως μία άλλη μέθοδος για επιπλέον μείωση του μικροβιακού τους φορτίου και της διατήρησης της υψηλής τους ποιότητας (Vaudagna et al., 2012; Bulut, 2014a).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση της ΥΥΠ σε κατεψυγμένα προϊόντα, σε χαμηλές ή και θερμοκρασίες υπό το μηδέν, μπορεί να οδηγήσει στην αδρανοποίηση της μικροβιακής χλωρίδας ακόμη και σε χαμηλές πιέσεις (Knorr et al., 1998; Fernández et al., 2007; Vaudagna et al., 2012; Bulut, 2014a; 2014b; Albertos, 2016). Η αποτελεσματικότητα της συνδυαστικής εφαρμογής της ΥΥΠ με την κατάψυξη εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του προϊόντος (pH,  $a_w$ , σύνθεση κ.ά.) από τον τύπο του υπό μελέτη μικροοργανισμού αλλά και από τις συνθήκες επεξεργασίας (επίπεδο πίεσης, χρόνος κ.λπ.) (Sanz & Otero, 2014; Choi, 2008; Park et al., 2008).



Στο παρόν Κεφάλαιο, μελετήθηκε για πρώτη φορά η εφαρμογή της ΥΥΠ σε κατεψυγμένα φιλέτα πέστροφας (νωπά και καπνιστά), τα οποία είχαν προηγουμένως ενοφθαλμιστεί με συγκεντρώσεις συμπυκνωμάτων υγρών καπνών για την ενίσχυση της αναστολής του παθογόνου *L. monocytogenes*, που απομονώνεται συχνά από τα καπνιστά αλιεύματα.

## **8.2. Υλικά και Μέθοδοι**

### **8.2.1. Μικροβιακά στελέχη**

Για τις ανάγκες του παρόντος Κεφαλαίου, επιλέχθηκαν τρία διαφορετικά κοινώς χρησιμοποιούμενα στελέχη αναφοράς του *L. monocytogenes* (LO28, EGD-e και 10403S). Ο ορότυπος του LO28 είναι 1/2c καθώς τα EGD-e και 10403S, ανήκουν και τα δύο στον ορότυπο 1/2a. Όλα τα στελέχη ήταν αποθηκευμένα στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  σε ειδικά κρυοπροστατευτικά φιαλίδια, εμπλουτισμένα με 7.9 % (v/v) διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO; Sigma-Aldrich, Dorset, UK). Προτού ξεκινήσουν τα πειράματα, όλα τα στελέχη ξεχωριστά ελέγχθηκαν με γραμμική μετασπορά σε θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης BHI (Brain Heart Infusion) άγαρ (LABM, Lancashire UK) και επώαστηκαν όλο το βράδυ στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Κατόπιν, τα μικροβιακά στελέχη αναπτύχθηκαν όπως περιεγράφηκε στο 2.1. σε θρεπτικό ζωμό γενικής χρήσης BHI broth. Τα στελέχη συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (Heraeus™ Multifuge™ X 3 Centrifuge, Thermo Scientific, UK) στα  $9000 \times g$  για 5 λεπτά, ξεπλύθηκαν εις διπλούν με τη χρήση αποστειρωμένου PBS (Phosphate-buffered saline; Oxoid, Basingstoke, UK) με τιμή pH 7.1 και επαναδιαλυτοποιήθηκαν στο ίδιο μέσο (PBS). Κατόπιν πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις για επίστρωση σε τρυβλία BHI άγαρ και όλα τα τρυβλία αφέθηκαν για επώαση (24 ώρες,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### **8.2.2. Προετοιμασία συμπυκνωμάτων υγρού καπνού**

Τα συμπυκνώματα υγρών καπνών με τις ονομασίες L9 και G6 επιλέχθηκαν ως τα πιο αποτελεσματικά για τις ανάγκες των πειραμάτων σε αυτό το Κεφάλαιο. Η προετοιμασία τους περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2 (βλέπε 2.5).

### **8.2.3. Προσδιορισμός του πιο ανθεκτικού στελέχους έναντι των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού**

Στη συνέχεια των πειραμάτων, τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν και για τα τρία διαφορετικά στελέχη του *L. monocytogenes* ενοφθαλμίστηκαν χωριστά σε αποστειρωμένους περιέκτες από πολυστυρένιο (Universal Polystyrene Containers; Sterilin, UK) που περιείχαν 10 mL θρεπτικού ζωμού (BHI broth) με τελικές συγκεντρώσεις υγρού καπνού που κυμαίνονταν από 0.25 % έως 1.00 % (v/v) σε προσαυξήσεις των 0.25 %. Ο τελικός πληθυσμός των κυττάρων για κάθε στέλεχος χωριστά, ήταν  $10^9 - 10^{10}$  CFU/mL. Κατόπιν, τα δείγματα αφέθηκαν για επώαση στους 37 °C για 0, 30, 60 και 180 λεπτά. Οι δεκαδικές αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν σε αποστειρωμένα φιαλίδια Eppendorf που περιείχαν 900 μL MRD (Oxoid, Basingstoke, UK) προσθέτοντας κάθε φορά 100 μL δείγματος. Τέλος, 25 μL εμβολίου λαμβάνονταν από την κατάλληλη αραιώση αλλά και απευθείας από το ζωμό BHI ως μηδενική αραιώση και ρίχνονταν στην επιφάνεια τρυβλίων με BHI άγαρ, χρησιμοποιώντας την μέθοδο των Laubacher & Ades (2008) και επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37 °C. Το όριο ανίχνευσης ήταν 1.60 log CFU/mL.

### **8.2.4. Προετοιμασία δειγμάτων για την ΥΥΠ**

#### **8.2.4.1. Προετοιμασία δειγμάτων ζωμού BHI**

Μετά από επώαση 24 ωρών στους 37 °C, 10 mL ζωμού BHI τα οποία περιείχαν περίπου  $10^9 - 10^{10}$  CFU/mL πληθυσμό του *L. monocytogenes*, τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες σακούλες Stomacher (Worthing, UK). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ζωμού BHI που περιείχαν 3.80 % (w/v) NaCl. Ακολούθως, οι σακούλες που περιείχαν τα δείγματα κόπηκαν και σφραγίστηκαν θερμικά, αφού πρώτα αφαιρέθηκαν όλες οι ορατές φυσαλίδες, όπως περιγράφεται από τον Bulut (2014b).

Κατόπιν, τοποθετήθηκαν μεμονωμένα σε πλαστικές σακούλες από πολυαμίδιο / πολυαιθυλένιο και συσκευάστηκαν υπό κενό αέρα για 30 δευτ. χρησιμοποιώντας ένα μηχάνημα συσκευασίας κενού Fresco 300 (SousVidetools.com).

#### **8.2.4.2. Προετοιμασία δειγμάτων πέστροφας**

Φιλέτα νωπής και καπνιστής πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) αγοράστηκαν από τοπικό κατάστημα λιανικής πώλησης (Reading, UK). Τα φιλέτα κόπηκαν ομοιόμορφα σε μικρότερα κομμάτια των 5 γρ (περίπου 35 mm × 45 mm × 10 mm) και αφού τοποθετήθηκαν σε μια μεταλλική σχάρα χωρίς επαφή μεταξύ τους και το έδαφος, ψεκάστηκαν με διάλυμα αλκοόλης 70 % (v/v). Τα δείγματα αφέθηκαν μέσα σε θάλαμο ελασματοειδούς ροής (Laminar flow hood level 2) για να μην επιμολυνθούν μέχρι να εξατμιστεί η περίσσεια αλκοόλης. Στη συνέχεια, 100 μL αποστειρωμένου (121.1 °C για 15 λεπτά) διαλύματος NaCl 3.80 % (w/v) τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια των κομματιών νωπής πέστροφας. Πριν τη συσκευασία, όλα τα δείγματα ενοφθαλμίστηκαν με 100 μL από την καλλιέργεια του στελέχους 10403S του *L. monocytogenes* για να φτάσουν σε τελικό πληθυσμό τα 10<sup>7</sup> CFU/g. Επιπλέον, προστέθηκαν 100 μL από τα αποστειρωμένα συμπυκνώματα υγρών καπνών (L9 και G6) συγκέντρωσης 0.50 %. Στα δείγματα ελέγχου προστέθηκαν 100 μL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού. Ο ενοφθαλμισμός (διάλυμα άλατος, αποστειρωμένο νερό, υγρός καπνός και εμβόλιο κυττάρων *L. monocytogenes*) έγινε στην επάνω επιφάνεια των δειγμάτων πέστροφας. Έπειτα, όλα τα δείγματα συσκευάστηκαν θερμικώς και υπό κενό αέρα όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Τέλος, χωρίστηκαν σε δύο ομάδες καθώς τα μισά υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με ΥΥΠ και τα άλλα μισά αφέθηκαν όλο το βράδυ στους -80 °C σε ειδικό θάλαμο υπερκατάψυξης (Eppendorf HEF U570, New Brunswick, Germany) και στη συνέχεια εκτέθηκαν στην ΥΥΠ.

Δείγματα ελέγχου χωρίς την εφαρμογή της ΥΥΠ ή και της υπερκατάψυξης ελέγχθηκαν.

#### **8.2.5. Εφαρμογή Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης και πρόγραμμα λειτουργίας**

Η πίεση που εφαρμόστηκε για όλα τα δείγματα ήταν 200 MPa για 15 λεπτά, ως μία από τις χαμηλότερες που εφαρμόζονται στη βιομηχανία τροφίμων. Χρησιμοποιήσαμε ένα μηχάνημα εργαστηριακής κλίμακας (Stansted Fluid Power Products Ltd., Harlow, UK) και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο ειδικό δοχείο με διάμετρο 40 mm και 250 mL όγκο. Το υγρό που χρησιμοποιήθηκε ως μέσο μετάδοσης της πίεσης ήταν ένα υδατικό διάλυμα μονο-προπυλενο-γλυκόλης (mono propylene glycol) 30 % (v/v; Sigma-Aldrich, Dorset, UK). Ένας κυκλοφορητής ψύξης (Grant LTD6G, UK) χρησιμοποιήθηκε για να κυκλοφορεί το νερό που περιείχε αντιψυκτικό υγρό. Η δεξαμενή πίεσης είχε εγκλειστεί εντός ειδικού περιβλήματος για τον έλεγχο και τη διατήρηση της θερμοκρασίας επεξεργασίας στο μέσο (υγρό) πίεσης. Όλα τα δείγματα που είχαν συσκευαστεί τοποθετήθηκαν εντός του ειδικού δοχείου και έπειτα μέσα στη δεξαμενή πίεσης για επεξεργασία. Τα δείγματα που είχαν προηγουμένως καταψυχθεί στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , αφαιρέθηκαν από τον καταψύκτη και μεταφέρθηκαν εντός 20 δευτ. στο δοχείο της δεξαμενής πίεσης. Ο απαιτούμενος χρόνος για την αύξηση της πίεσης στη δεξαμενή ήταν περίπου 100 MPa/10 δευτ., καθώς για την αποσυμπίεση μετά το τέλος της επεξεργασίας χρειαζόνταν λιγότερο από 5 δευτ. Η θερμοκρασία εντός της δεξαμενής πίεσης καταγράφονταν συνεχώς από ένα θερμοπομπό (K-type thermocouple) που είχε τοποθετηθεί στο κέντρο του άνω κλεισίματος της δεξαμενής.

Τα δείγματα ελέγχου δεν υπέστησαν καμία επεξεργασία και δεν περιείχαν προσθήκη συμπυκνωμάτων καπνού για το θρεπτικό ζωμό BHI, τη νωπή και καπνιστή πέστροφα

και ήταν συσκευασμένα υπό κενό. Επίσης, συσκευασμένα δείγματα υπό κενό χωρίς εφαρμογή υψηλής πίεσης ή υπερκατάψυξης χρησιμοποιήθηκαν.

#### **8.2.6. Απαρίθμηση και υπολογισμός τραυματισμένων κυττάρων**

Για την απαρίθμηση του πληθυσμού στα δείγματα θρεπτικού ζωμού BHI, 100  $\mu\text{L}$  μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε πλαστικά φιαλίδια Errendorf που περιείχαν 900  $\mu\text{L}$  MRD. Για τα δείγματα πέστροφας (νωπής ή καπνιστής), ανοίγονταν ασηπτικά η συσκευασία και λαμβάνονταν τα 5  $\gamma\text{r}$  και τοποθετούνταν με χρήση αποστειρωμένης λαβίδας σε σακούλα Stomacher (Worthing, UK) με 45 mL MRD και ομογενοποιούνταν για 90 δευτ. σε συσκευή Stomacher (Worthing, UK). Στη συνέχεια, λαμβάνονταν εμβόλιο 25  $\mu\text{L}$  από την κατάλληλη δεκαδική αραίωση και ρίχνονταν στην επιφάνεια τρυβλίων με BHI άγαρ και αφήνονταν για επώαση στους 37 °C για 24 – 72 ώρες. Το όριο ανίχνευσης για τα δείγματα πέστροφας ήταν 2.60 log CFU/g.

Ο υπολογισμός των τραυματισμένων κυττάρων, έπειτα από την εφαρμογή της πίεσης, της υπερκατάψυξης και της έκθεσής τους στα συμπυκνώματα υγρών καπνών έγινε σε επιλεκτικό υλικό Brilliance™ Listeria Agar (OXOID, Wesel, Germany) όπως περιγράφεται και για το PALCAM άγαρ στο Κεφάλαιο 2 (βλέπε 2.2.2).

#### **8.2.7. Πειραματικός σχεδιασμός και στατιστική ανάλυση**

Όλα τα δείγματα λαμβάνονταν εις τριπλούν με δύο επαναλήψεις ( $n=3 \times 2=6$ ). Βλέπε 2.6.

### 8.3. Αποτελέσματα

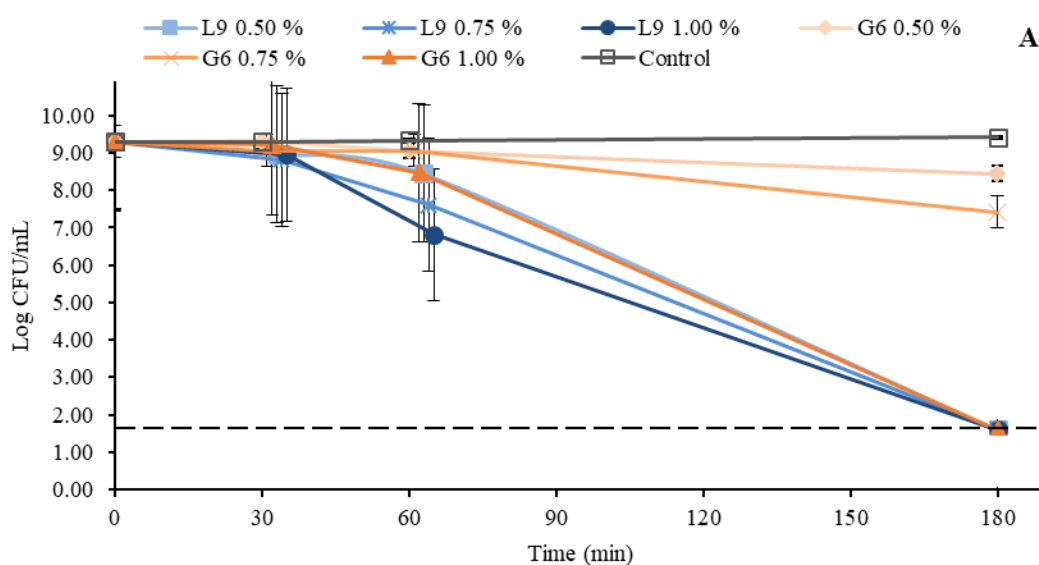
#### 8.3.1. Αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών κατά των στελεχών του *L. monocytogenes*

Αρχικά διερευνήθηκε η συμπεριφορά τριών διαφορετικών στελεχών (10403S WT, LO28 WT, EGD-e WT) του *L. monocytogenes* σε υγρό θρεπτικό ζωμό BHI, που περιείχε συγκεντρώσεις των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού (L9 και G6; Σχ. 8.1). Ο πληθυσμός των στελεχών του *L. monocytogenes* 10403S WT, LO28 WT, και EGD-e WT μετά από 180 λεπτά σε θρεπτικό ζωμό BHI χωρίς προσθήκη υγρών καπνών (control), ήταν 9.42, 9.22 και 8.89 log CFU/mL, αντίστοιχα (Σχ. 8.1).

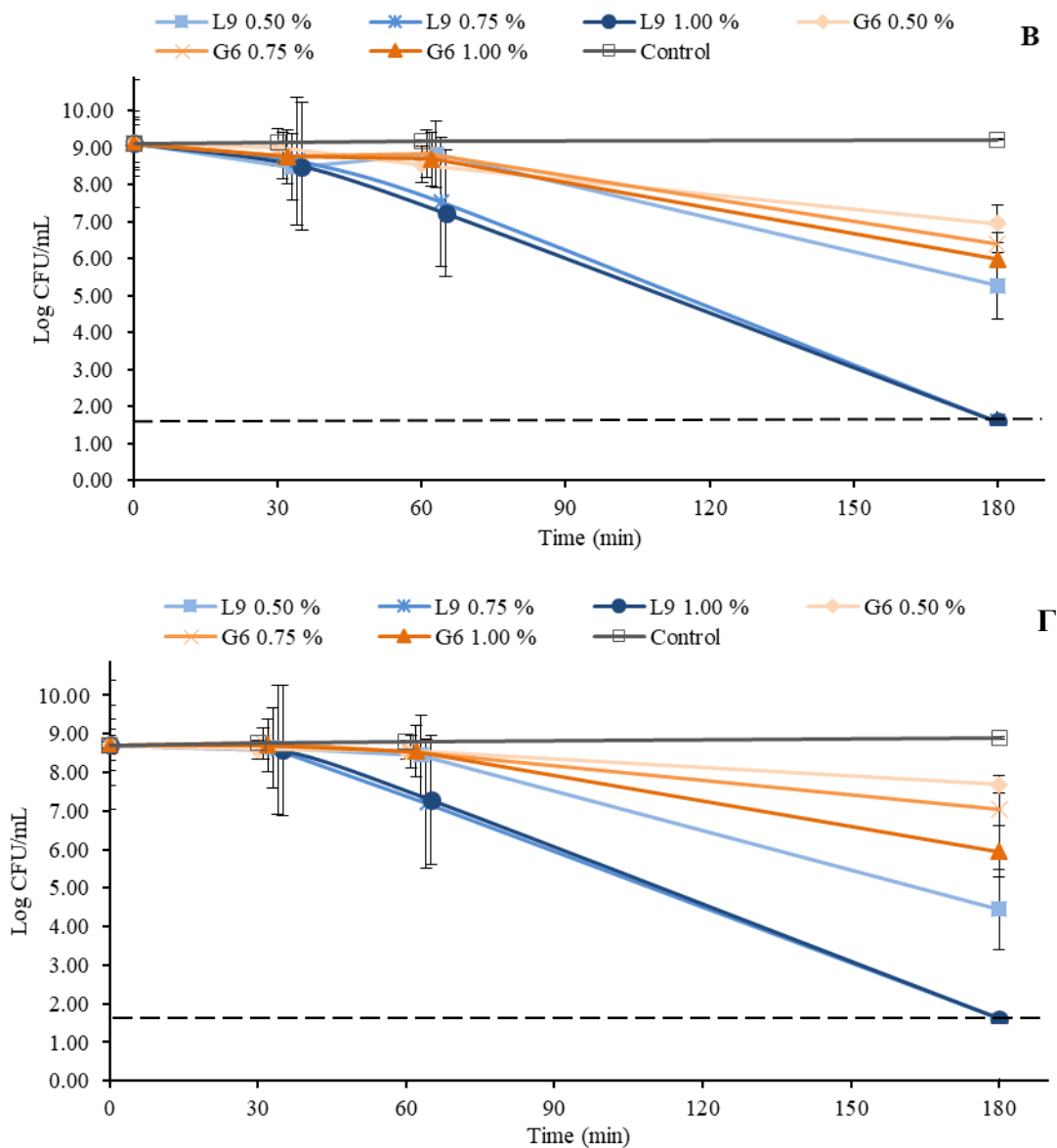
Έπειτα από έκθεση του στελέχους 10403S του *L. monocytogenes*, για 180 λεπτά στο θρεπτικό που περιείχε 1.00 % (v/v) L9 ή G6, παρατηρήθηκε ραγδαία μείωση του πληθυσμού του παθογόνου, φτάνοντας κάτω από το όριο ανίχνευσης (1.60 log CFU/mL), αντιστοιχώντας σε μείωση ίση με 7.70 log CFU/mL (Σχ. 8.1 Α). Ομοίως, μετά από 180 λεπτά έκθεσης, σε BHI με 0.75 % και 1.00 % (v/v) L9, ο τελικός πληθυσμός για τα στελέχη LO28 WT και EGD-e WT, μειώθηκε κατά 7.50 και 7.12 log CFU/mL, αντίστοιχα φτάνοντας σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (Σχ. 8.1 Β & Γ). Αντίθετα με τον L9, η αποτελεσματικότητα του G6 σε συγκέντρωση 1.00 % για 180 λεπτά, ήταν σημαντικά ( $P < 0.05$ ) μικρότερη, οδηγώντας σε μείωση ίση με 3.13 και 3.15 log CFU/mL, για τα στελέχη LO28 WT και EGD-e WT (Σχ. 8.1 Β & Γ). Τα αποτελέσματα μεταξύ των στελεχών LO28 WT και EGD-e WT του *L. monocytogenes*, μετά από 60 λεπτά έκθεσής τους, διέφεραν καθώς ο υγρός καπνός L9 0.75 % και 1.00 % ήταν στατιστικώς αποτελεσματικότερος συγκριτικά με τον G6 στις ίδιες συγκεντρώσεις. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 8.1 (Β & Γ), η καταγραφόμενη μείωση για τα στελέχη LO28 WT και EGD-e WT, μετά από 60 λεπτά στο θρεπτικό με 0.50 % και 0.75 % (v/v) G6, ήταν μικρότερη από 0.50 log CFU/mL.

Η παραμονή των κυττάρων των LO28 WT και EGD-e WT για 60 λεπτά στο BHI που είχε ενοφθαλμιστεί με 0.75 % (v/v) L9, οδήγησε σε μείωση 1.57 και 1.53 log CFU/mL, αντίστοιχα (Σχ. 8.1 B & Γ). Ο πληθυσμός του στελέχους 10403S WT, έπειτα από 60 λεπτά παραμονής του σε BHI με 0.50 %, 0.75 % και 1.00 % (v/v) L9, παρουσίασε μείωση ίση με 0.86, 1.69 και 2.49 log CFU/mL, αντίστοιχα (Σχ. 8.1 A). Τέλος, στο θρεπτικό με 1.00 % (v/v) G6 έπειτα από 60 λεπτά έκθεσης, ο πληθυσμός του 10403S WT, μειώθηκε κατά 0.83 log CFU/mL (Σχ. 8.1 A).

Από τα αποτελέσματα μας προέκυψε ότι η ανασταλτική δράση των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού, έπειτα από 30 λεπτά ήταν παρόμοια για όλα τα υποβαλλόμενα στελέχη, με μικρή μείωση του πληθυσμού τους, όχι υψηλότερη από 0.50 log CFU/mL (Σχ. 8.1 A, B & Γ).







**Σχήμα 8.1.** Πληθυσμιακή μείωση των στελεχών του *L. monocytogenes*: (Α) 10403S WT, (Β) LO28 WT, (Γ) EGD-e WT, που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό ζωμό BHI, ενοφθαλμισμένο με συγκεντρώσεις των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού (L9 ή G6), 0.50 %, 0.75 % και 1.00 % για 0, 30, 60 και 180 λεπτά. Τα δείγματα ελέγχου (control) αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό ζωμό BHI χωρίς προσθήκη υγρού καπνού. Οι γραμμές εμφανίζουν τις τιμές του μέσου όρου 3 επαναλήψεων (που αναλύθηκαν εις διπλούν); οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ). Με την κάθετη διακεκομμένη γραμμή, παρουσιάζεται το όριο ανίχνευσης, 1.60 log CFU/mL.

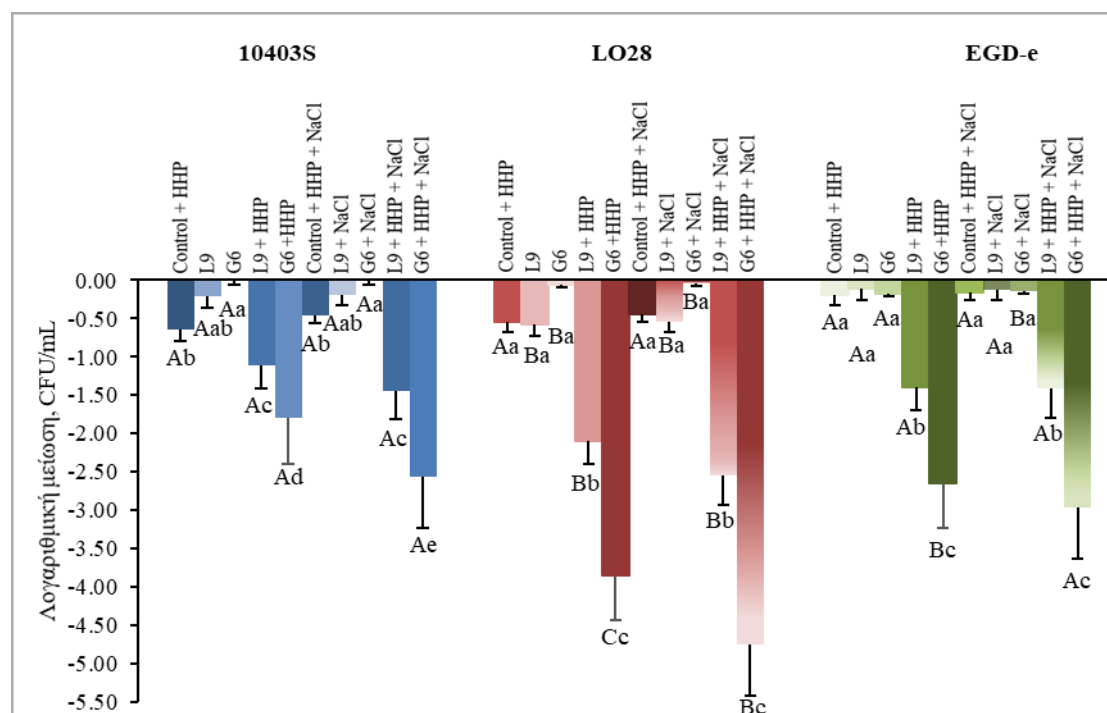
### 8.3.2. Αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών σε συνδυασμό με την εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης κατά των στελεχών του *L. monocytogenes*

Δεδομένου ότι ο στόχος μας ήταν να χρησιμοποιήσουμε την κατάψυξη σε συνδυασμό με τα συμπυκνώματα υγρού καπνού, για την μείωση της εφαρμοζόμενης υδροστατικής πίεσης, στη συνέχεια των πειραμάτων χρησιμοποιήσαμε μία από τις πιο χαμηλές πιέσεις της βιβλιογραφίας, αυτή των 200 MPa για 15 λεπτά. Η δοκιμή έγινε σε θρεπτικό ζωμό BHI, εμπλουτισμένο με 0.50 % (v/v) L9 και G6. Τα δείγματα με ή χωρίς NaCl που εκτέθηκαν σε 0.50 % (v/v) L9 ή G6 για 15 λεπτά χωρίς εφαρμογή ΥΥΠ, παρουσίασαν μείωση μικρότερη από 0.20 log CFU/mL (Σχ. 8.2;  $P > 0.05$ ). Η εφαρμογή της ΥΥΠ στα δείγματα ελέγχου (χωρίς προσθήκη υγρού καπνού), είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού των στελεχών του *L. monocytogenes* από 0.15 έως και 0.65 log CFU/mL για τα δείγματα με ή χωρίς NaCl (Σχ. 8.2;  $P > 0.05$ ).

Η εφαρμογή της ΥΥΠ σε συνδυασμό με τους καπνούς L9 ή G6, οδήγησε σε σημαντική μείωση του πληθυσμού όλων των υποβαλλόμενων στελεχών του *L. monocytogenes*. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα αποτελέσματα μεταξύ των τριών στελεχών διέφεραν. Η υψηλότερη λογαριθμική μείωση ήταν 4.75 και 3.85 log CFU/mL και καταγράφηκε για το LO28 σε ζωμό BHI με 0.50 % (v/v) G6, με ή χωρίς NaCl, αντίστοιχα (Σχ. 8.2;  $P < 0.05$ ). Η εφαρμογή της ΥΥΠ σε συνδυασμό με τον πιο αποτελεσματικό υγρό καπνό, G6 οδήγησε σε μείωση 2.97 και 2.64 log CFU/mL του πληθυσμού του EGD-e για τα δείγματα με ή χωρίς αλάτι, αντίστοιχα (Σχ. 8.2;  $P > 0.05$ ). Για το στέλεχος 10403S η υψηλή πίεση στο θρεπτικό ζωμό BHI με 0.50 % (v/v) G6, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των κυττάρων του κατά 2.56 και 1.80 log CFU/mL για τα δείγματα με ή χωρίς προσθήκη αλατος, αντίστοιχα (Σχ. 8.2;  $P < 0.05$ ).

Η εφαρμογή της ΥΥΠ (200 MPa για 15 λεπτά) σε συνδυασμό με τον L9 (χωρίς NaCl) οδήγησε σε 2.10, 1.40 και 1.12 log CFU/mL μείωση του τελικού πληθυσμού των στελεχών LO28, EGD-e και 10403S, αντίστοιχα (Σχ. 8.2;  $P < 0.05$ ). Όταν στα δείγματα θρεπτικού ζωμού BHI που περιείχαν L9 και NaCl εφαρμόστηκε πίεση, ο πληθυσμός των στελεχών του *L. monocytogenes* LO28, EGD-e και 10403S, μειώθηκε κατά 2.55, 1.42 και 1.44 log CFU/mL, αντίστοιχα (Σχ. 8.2).

Από τον έλεγχο των συνθηκών που εφαρμόστηκαν, προέκυψε ότι το στέλεχος 10403S του *L. monocytogenes*, ήταν το πιο ανθεκτικό στην ΥΥΠ, σε σύγκριση με τα άλλα δύο και επιλέχθηκε για τη συνέχεια των πειραμάτων.



**Σχήμα 8.2.** Επίδραση της ΥΥΠ στο *L. monocytogenes* 10403S WT, LO28 WT, EGD-e WT, σε θρεπτικό ζωμό BHI, με προσθήκη 0.50 % (v/v) G6 ή L9. Οι στήλες εμφανίζουν τις τιμές του μέσου όρου 3 επαναλήψεων (που αναλύθηκαν εις διπλούν); οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ). Οι τιμές, εντός της ίδιας διαχείρισης, που συμβολίζονται με ίδιο μικρό γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0.05$ ). Με διαφορετικά κεφαλαία γράμματα παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαχειρίσεων με ή χωρίς κατάψυξη ( $P < 0.05$ ). Οι τιμές, μεταξύ των τριών στελεχών, που συμβολίζονται με διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα είναι στατιστικώς σημαντικές ( $P < 0.05$ ).

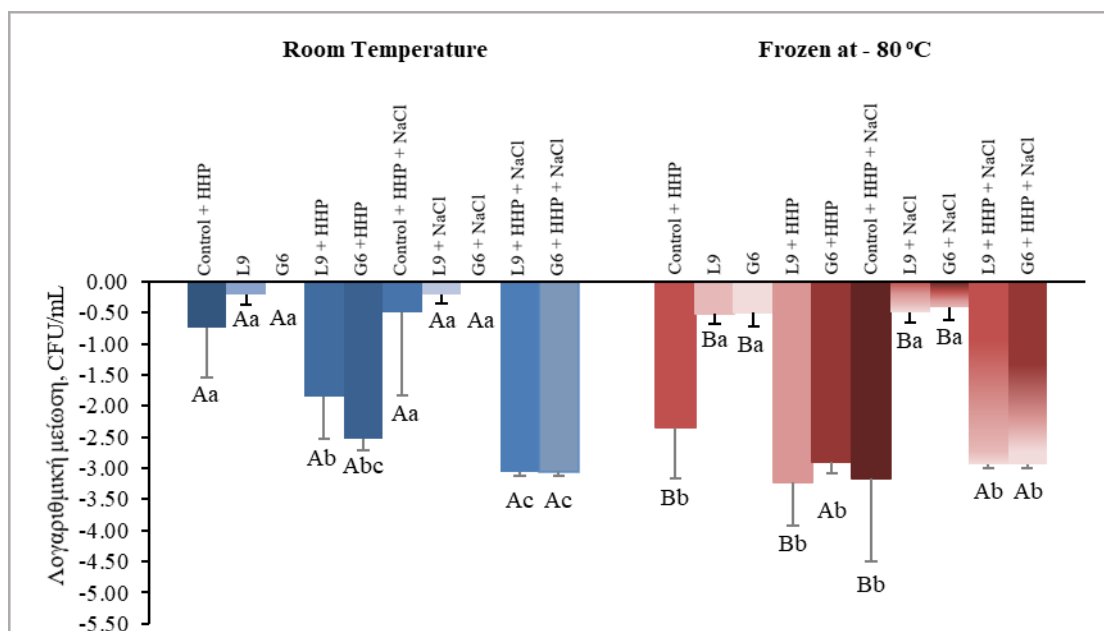
### 8.3.3. Εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης σε υγρά μοντέλα, νωπά και καπνιστά φιλέτα πέστροφας (θερμής κάπνισης) με ή χωρίς εφαρμογή υπερκατάψυξης στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Αμέσως μετά τον έλεγχο της αναστολής των κυττάρων του *L. monocytogenes* από την δράση των υγρών συμπυκνωμάτων καπνού σε συνδυασμό με την ΥΥΠ, η υπερκατάψυξη των προϊόντων στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , επιλέχθηκε έως ένα επιπρόσθετο εμπόδιο για την μείωση του πληθυσμού του παθογόνου *L. monocytogenes* και συγκεκριμένα του στελέχους 10403S.

Όπως παρουσιάζεται και στο σχήμα 8.3, τα δείγματα που περιείχαν υγρό καπνό (L9 ή G6) με ή χωρίς αλάτι δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές απουσία της ΥΥΠ, καθώς η καταγραφόμενη μείωση σε  $\log\text{ CFU/mL}$  ήταν κάτω από 0.50, ανεξαρτήτως αν τα δείγματα είχαν προηγουμένως καταψυχθεί ή όχι. Η επίδραση της ΥΥΠ στον πληθυσμό του *L. monocytogenes* 10403S, σε θρεπτικό ζωμό BHI, ήταν στατιστικώς σημαντική αλλά μικρή (0.73  $\log\text{ CFU/mL}$ ). Από την άλλη, όταν η ΥΥΠ συνδυάστηκε με την κατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , χωρίς παρουσία συμπυκνωμάτων καπνού, η μείωση που καταγράφηκε ήταν ίση με 2.35  $\log\text{ CFU/mL}$  (Σχ. 8.3). Όμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τα δείγματα μετά την ΥΥΠ, χωρίς καπνό αλλά με προσθήκη NaCl, παρουσιάζοντας μείωση 0.51 και 3.17  $\log\text{ CFU/mL}$ , πριν και μετά την κατάψυξη τους, αντίστοιχα (Σχ. 8.3;  $P < 0.05$ ).

Για τα δείγματα που βρίσκονταν σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς την εφαρμογή της ΥΥΠ η προσθήκη αλατιού σε συνδυασμό με τον υγρό καπνό, οδήγησε σε αύξηση της μείωσης του πληθυσμού του 10403S, από 1.85 σε 3.07  $\log\text{ CFU/mL}$  για τον L9 και από 2.53 σε 3.07  $\log\text{ CFU/mL}$  για τον G6 (Σχ. 8.3;  $P < 0.05$ ). Ωστόσο, ο πληθυσμός του *L. monocytogenes* 10403S στα δείγματα χωρίς κατάψυξη αμέσως μετά την εφαρμογή

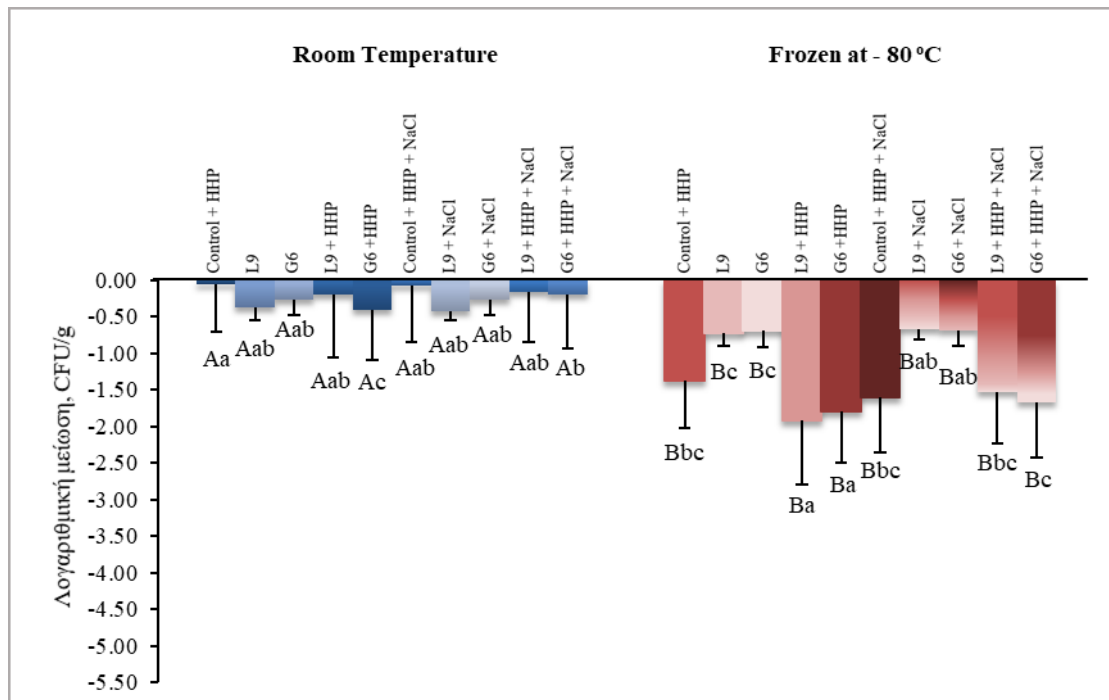
της ΥΥΠ με ή χωρίς NaCl, και με προσθήκη 0.50 % (v/v) G6 μειώθηκε κατά 3.07 και 2.53 log CFU/mL, αντίστοιχα (Σχ. 8.3;  $P > 0.05$ ). Η προσθήκη άλατος στα δείγματα, χωρίς ΥΥΠ που περιείχαν υγρό καπνό και είχαν καταψυχθεί ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) προξένησε μικρή μείωση στα δείγματα με 0.50 % (v/v) L9 (από 3.23 σε 2.94 log CFU/mL) και για τα δείγματα με 0.50 % (v/v) G6 (από 2.94 σε 2.90 log CFU/mL) (Σχ. 8.3).



**Σχήμα 8.3.** Επίδραση της ΥΥΠ στο *L. monocytogenes* 10403S WT, LO28 WT, EGD-e WT, σε θρεπτικό ζωμό BHI, με προσθήκη 0.50 % (v/v) G6 ή L9 με ή χωρίς NaCl, σε θερμοκρασία δωματίου ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) και μετά από κατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Οι στήλες εμφανίζουν τις τιμές του μέσου όρου 3 επαναλήψεων (που αναλύθηκαν εις διπλούν); οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ). Οι τιμές, εντός της ίδιας διαχείρισης, που συμβολίζονται με ίδιο μικρό γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0.05$ ). Με διαφορετικά κεφαλαία γράμματα παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαχειρίσεων με ή χωρίς κατάψυξη ( $P < 0.05$ ). Η θερμοκρασία στην αρχή της ΥΥΠ είχε ρυθμιστεί στους  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  και καταγράφονταν σε όλη τη διάρκεια.

Η συνδυαστική εφαρμογή των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού στην επιφάνεια των δειγμάτων νωπής πέστροφας με την ΥΥΠ, είχε μικρή αποτελεσματικότητα στη μείωση του πληθυσμού των κυττάρων του *L. monocytogenes* (10403S), παρουσία ή

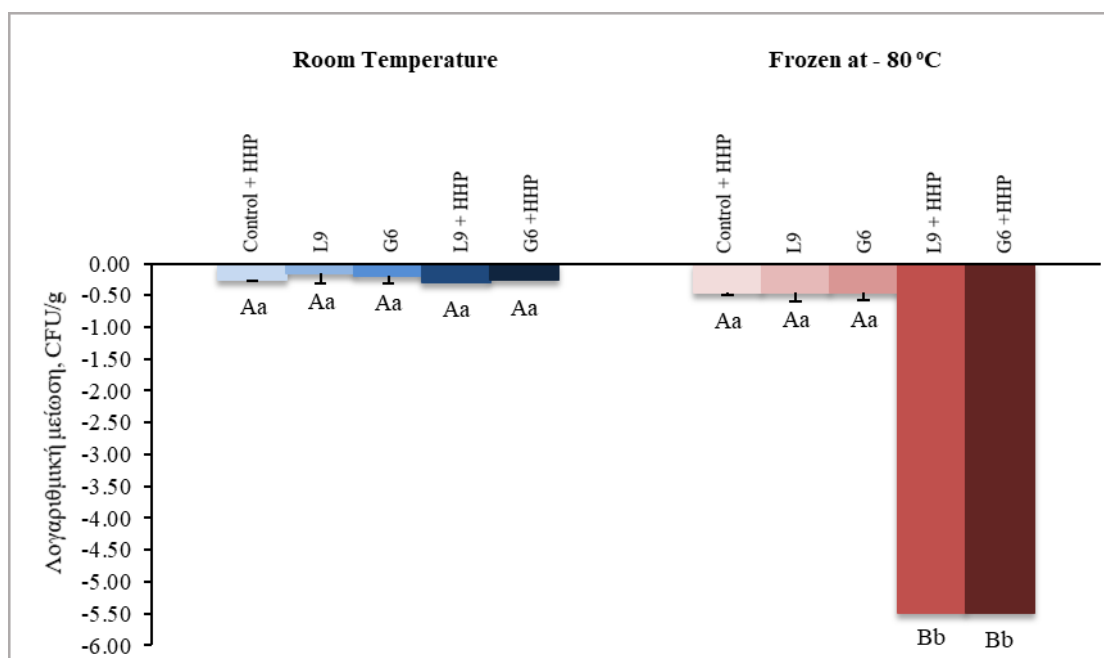
απουσία NaCl. Όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 8.4, η μέγιστη καταγραφόμενη μείωση πληθυσμού για όλα τα δείγματα νωπής πέστροφας, που βρίσκονταν σε θερμοκρασία δωματίου ήταν 0.42 log CFU/g. Η εφαρμογή της ΥΥΠ στα δείγματα νωπής πέστροφας που είχαν καταψυχθεί στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , εμφάνισε στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα για τη μείωση του πληθυσμού του *L. monocytogenes* 10403S για όλα τα δείγματα. Ο πληθυσμός του *L. monocytogenes* 10403S, μετά την κατάψυξη, στα δείγματα νωπής πέστροφας χωρίς υγρό καπνό, μειώθηκε κατά 1.60 και 1.37 log CFU/g παρουσία ή απουσία άλατος, αντίστοιχα (Σχ. 8.4;  $P > 0.05$ ). Παρουσία των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού L9 και G6, μετά από ΥΥΠ σε συνδυασμό με κατάψυξη, παρατηρήθηκε υψηλότερη μείωση ίση με 1.93 και 1.80 log CFU/g, αντίστοιχα για τα δείγματα χωρίς NaCl συγκριτικά με τη μείωση 1.54 και 1.68 log CFU/g, αντίστοιχα για τα δείγματα με NaCl και L9 ή G6 (Σχ. 8.4).



**Σχήμα 8.4.** Επίδραση της ΥΥΠ στο *L. monocytogenes* 10403S WT, σε νοπά φιλέτα πέστροφας, με προσθήκη 0.50 % (v/v) G6 ή L9 με ή χωρίς NaCl, σε θερμοκρασία δωματίου (20 °C) και μετά από κατάψυξη στους -80 °C. Οι στήλες εμφανίζουν τις τιμές του μέσου όρου 3 επαναλήψεων (που αναλύθηκαν εις διπλούν); οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n = 6). Οι τιμές, εντός της ίδιας διαχείρισης, που συμβολίζονται με ίδιο μικρό γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0.05$ ). Με διαφορετικά κεφαλαία γράμματα παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαχειρίσεων με ή χωρίς κατάψυξη ( $P < 0.05$ ). Η θερμοκρασία στην αρχή της ΥΥΠ είχε ρυθμιστεί στους 0 °C και καταγράφονταν σε όλη τη διάρκεια.

Στη συνέχεια των πειραμάτων, έγινε εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των τριών εμποδίων κατά του *L. monocytogenes* 10403S, σε πραγματικό προϊόν, δηλαδή στην επιφάνεια των φιλέτων καπνιστής πέστροφας. Η εφαρμογή της ΥΥΠ, στα δείγματα καπνιστής πέστροφας, πριν την κατάψυξη οδήγησε σε μικρή μείωση (0.25 log CFU/g; Σχ. 8.5). Ακόμη και μετά την παρουσία των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού η μείωση στον πληθυσμό του παθογόνου ήταν αμελητέα και συγκεκριμένα, στα δείγματα με 0.50 % (v/v) L9 και G6 ήταν μόλις 0.29 και 0.26 log CFU/g, αντίστοιχα

(Σχ. 8.5). Η εφαρμογή της κατάψυξης στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  στα δείγματα από μόνη της δεν έδειξε καμία μείωση των κυττάρων σε CFU/g (τα δεδομένα δεν δίνονται). Η εφαρμογή ΥΥΠ στα δείγματα καπνιστής πέστροφας (χωρίς καπνό), μετά την κατάψυξη ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) οδήγησε σε μικρή μείωση του πληθυσμού ( $0.46\text{ log CFU/g}$ ) του *L. monocytogenes* 10403S. Ωστόσο, μετά την προσθήκη των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού L9 ή G6 στα δείγματα καπνιστής πέστροφας, μετά από κατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  και εφαρμογή της ΥΥΠ, καταγράφηκε μία εκπληκτική μείωση του πληθυσμού του *L. monocytogenes* (10403S) ίση με  $5.48\text{ log CFU/g}$  ( $n=6, P < 0.05$ ; Σχ. 8.5).



**Σχήμα 8.5.** Επίδραση της ΥΥΠ στο *L. monocytogenes* 10403S WT, σε φιλέτα καπνιστής πέστροφας, με προσθήκη 0.50 % (v/v) G6 ή L9, σε θερμοκρασία δωματίου ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) και μετά από κατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Οι στήλες εμφανίζουν τις τιμές του μέσου όρου 3 επαναλήψεων (που αναλύθηκαν εις διπλούν); οι γραμμές σφάλματος εμφανίζουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ( $n = 6$ ). Οι τιμές, εντός της ίδιας διαχείρισης, που συμβολίζονται με ίδιο μικρό γράμμα δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0.05$ ). Με διαφορετικά κεφαλαία γράμματα παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαχειρίσεων με ή χωρίς κατάψυξη ( $P < 0.05$ ). Η θερμοκρασία στην αρχή της ΥΥΠ είχε ρυθμιστεί στους  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  και καταγράφονταν σε όλη τη διάρκεια.



### 8.3.4. Έλεγχος υποθανάτια τραυματισμένων κυττάρων του στελέχους 10403S WT του *L. monocytogenes*

Το ποσοστό των υποθανάτια τραυματισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes*, ήταν αρκετά υψηλό σε θρεπτικό ζωμό BHI και στα φιλέτα νωπής και καπνιστής πέστροφας, πριν την εφαρμογή της κατάψυξης στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  για τα δείγματα με προσθήκη των συμπυκνωμάτων L9 ή G6 και χωρίς αλάτι. Αναλυτικότερα, το μεγαλύτερο ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων πριν την κατάψυξη ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), καταγράφηκε στα δείγματα που είχαν ενοφθαλμιστεί με τον G6 και ήταν  $51.49\% \pm 19.82\%$  για τα δείγματα BHI,  $32.79\% \pm 10.11\%$  για τα φιλέτα νωπής πέστροφας και  $24.16 \pm 7.31\%$  για τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας, χωρίς να στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών εμποδίων που εφαρμόστηκαν ( $P > 0.05$ ; Πίν. 8.1).

Όπως παρατηρήθηκε, ο συνδυασμός της κατάψυξης με την ΥΥΠ, προκάλεσε υψηλά ποσοστά τραυματισμένων κυττάρων. Μετά από κατάψυξη, τα κύτταρα του 10403S σε ζωμό BHI με ή χωρίς NaCl, αλλά χωρίς προσθήκη συμπυκνωμάτων καπνού, παρουσίασαν το μεγαλύτερο ποσοστό τραυματισμού με  $55.23\% \pm 3.93\%$  και  $55.98\% \pm 8.64\%$ , αντίστοιχα ( $P > 0.05$ , Πίν. 8.1). Στα δείγματα BHI, μετά από την εφαρμογή υψηλής πίεσης με προσθήκη L9 ή G6, χωρίς όμως NaCl, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για τα ποσοστά των τραυματισμένων κυττάρων που καταγράφηκαν πριν ή μετά από την κατάψυξη ( $P > 0.05$ , Πίν. 8.1). Το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* 10403S, σε ζωμό BHI μετά από την ΥΥΠ, με προσθήκη αλάτος και L9, σε θερμοκρασία δωματίου ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ήταν  $15.12\% \pm 4.81\%$ , ενώ μετά από την κατάψυξη των ίδιων δειγμάτων το ποσοστό αυξήθηκε σε  $55.86\% \pm 1.24\%$  ( $P < 0.05$ , Πίν. 8.1).

Όπως φαίνεται στον πίνακα 8.1, υψηλό ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων εμφανίστηκε και για τα κύτταρα του *L. monocytogenes* 10403S, όταν αυτά ενοφθαλμίστηκαν στην επιφάνεια των δειγμάτων νωπής πέστροφας. Για τα δείγματα νωπής πέστροφας, σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς προσθήκη άλατος στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο μεταξύ των δειγμάτων με 0.50 % (v/v) G6 ( $32.79 \% \pm 10.11 \%$ ) και χωρίς υγρό καπνό ( $10.87 \% \pm 3.56 \%$ ). Η ταυτόχρονη εφαρμογή κατάψυξης και ΥΥΠ προκάλεσε τραυματισμό των κυττάρων του παθογόνου σε ποσοστά  $36.11 \% \pm 5.58 \%$  και  $26.92 \% \pm 5.61 \%$  για τα δείγματα νωπής πέστροφας με L9, με ή χωρίς προσθήκη άλατος, αντίστοιχα ( $P > 0.05$ , Πίν. 8.1).

Το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων στην επιφάνεια των φιλέτων καπνιστής πέστροφας, πριν την κατάψυξη χωρίς την προσθήκη καπνού ήταν  $14.31 \% \pm 1.23 \%$ ,  $19.47 \% \pm 9.47 \%$  παρουσία του L9 και  $24.16 \% \pm 7.31 \%$  παρουσία του G6 ( $P > 0.05$ ; Πίν. 8.1). Από την συνδυαστική εφαρμογή της ΥΥΠ και της κατάψυξης στα δείγματα καπνιστής πέστροφας, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων του παθογόνου παρουσία των συμπυκνωμάτων L9 και G6, το οποίο ήταν μηδενικό (Πίν. 8.1). Στα δείγματα καπνιστής πέστροφας για όλες τις διεργασίες που πραγματοποιήθηκαν δεν προστέθηκε επιπλέον NaCl, σε ένα ήδη αλατισμένο προϊόν.

**Πίνακας 8.1.** Ποσοστό (%) τραυματισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* 10403S WT, σε θρεπτικό ζωμό BHI, σε νωπά και καπνιστά φιλέτα πέστροφας, έπειτα από εφαρμογή ΥΥΠ στα 200 MPa για 15 λεπτά με προσθήκη ή χωρίς G6 ή L9 0.50 % (v/v) και σε συνδυασμό με ή χωρίς κατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Εμβόλιο	Χωρίς κατάψυξη (20 °C)			Με κατάψυξη στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$		
	BHI ζωμός	Νωπή πέστροφα	Καπνιστή πέστροφα	BHI ζωμός	Νωπή πέστροφα	Καπνιστή πέστροφα
- NaCl						
Lm	$3.26 \pm 4.23^a$	$10.87 \pm 3.56^b$	$14.31 \pm 1.23^b$	$55.98 \pm 8.64^d$	$38.58 \pm 8.37^{cd}$	$38.59 \pm 3.15^c$
Lm + L9	$26.58 \pm 12.81^{abc}$	$14.41 \pm 5.25^a$	$19.47 \pm 9.47^{ab}$	$43.79 \pm 17.56^{cd}$	$26.92 \pm 5.61^{bcd}$	$0.00 \pm 0.00^d$
Lm + G6	$51.49 \pm 19.82^{ab}$	$32.79 \pm 10.11^a$	$24.16 \pm 7.31^a$	$37.08 \pm 18.88^{ab}$	$36.64 \pm 15.24^{ab}$	$0.00 \pm 0.00^b$
+ NaCl						
Lm	$3.00 \pm 3.27^a$	$29.13 \pm 13.93^b$	-	$55.23 \pm 3.93^c$	$38.95 \pm 10.75^{bc}$	-
Lm + L9	$15.12 \pm 4.81^a$	$10.94 \pm 0.89^a$	-	$55.86 \pm 1.24^c$	$36.11 \pm 5.58^b$	-
Lm + G6	$25.24 \pm 22.14^{ab}$	$8.98 \pm 2.06^a$	-	$49.42 \pm 10.92^b$	$35.13 \pm 10.14^b$	-

Lm: *Listeria monocytogenes*10403S WT

Οι τιμές (μέσοι όροι  $\pm$  τυπ. απ., 6 επαν.), εντός της ίδιας στήλης, που συμβολίζονται με διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ).

Οι τιμές (μέσοι όροι  $\pm$  τυπ. απ., 6 επαν.), εντός της ίδιας γραμμής, που συμβολίζονται με διαφορετικό μικρό γράμμα έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ).

#### 8.4. Συζήτηση

Στο παρόν Κεφάλαιο έγινε μια προσπάθεια διερεύνησης της συμπεριφοράς τριών στελεχών του *L. monocytogenes* σε θρεπτικό ζωμό BHI, σε φιλέτα νωπής και καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης), μετά την συνδυαστική εφαρμογή των μεταχειρίσεων της κάπνισης, της ΥΥΠ και της υπερκατάψυξης. Η εφαρμογή της ΥΥΠ έγινε στα 200 MPa για 15 λεπτά, που είναι μία από τις χαμηλότερες αν όχι η χαμηλότερη πίεση που χρησιμοποιείται από την βιομηχανία τροφίμων (Koutchma, 2014; Khan et al., 2017).

Αρχικά, η εφαρμογή της ΥΥΠ συνδυάστηκε με δύο υδατοδιαλυτά συμπυκνώματα υγρού καπνού με την ονομασία L9 και G6. Τα συμπυκνώματα υγρών καπνών ήταν αποτελεσματικά έναντι των τριών στελεχών που χρησιμοποιήσαμε (LO28, EGD-e και 10403S) ανάλογα και με τον κατάλληλο συνδυασμό συγκέντρωσης και χρόνου έκθεσης σε αυτά. Στις ημέρες μας, η παραδοσιακή κάπνιση στα τρόφιμα χρησιμοποιείται κυρίως για να τους προσδώσει τα τυπικά χαρακτηριστικά, όπως η γεύση, το χρώμα και το άρωμα (Theobald et al., 2012; Fasano et al., 2016). Τα συμπυκνώματα υγρού καπνού ωστόσο, εκτός από αυτά τα χαρακτηριστικά μπορούν να έχουν και αντιμικροβιακή δράση έναντι των τροφιμογενών παθογόνων (Lingbeck et al., 2014).

Η αποτελεσματικότητα της ΥΥΠ είναι δυνατόν να ενισχυθεί από την αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών και το αντίθετο. Οι Vitt et al. (2001), δοκίμασαν την αντιμικροβιακή δράση πέντε εμπορικών σκευασμάτων υγρού καπνού, έναντι των *L. innocua* και *L. monocytogenes* και κατέληξαν ότι η συγκέντρωση 0.50 % ήταν αρκετή για να αναστείλει το *L. innocua* σε θρεπτικό ζωμό BHI. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τα δικά μας, όπου φάνηκε ότι 0.50 % (v/v) συγκέντρωση υγρού καπνού ήταν ιδανική για την συνέχεια των πειραμάτων μας,

καθώς είχε μικρή αλλά μετρήσιμη μείωση στον πληθυσμό του *L. monocytogenes*. Από τα στελέχη που χρησιμοποιήσαμε, το LO28 είναι ένα κανονικό στέλεχος του *L. monocytogenes*, το EGD-e είναι ένα εργαστηριακό στέλεχος με εξαιρετική αντοχή στο οξειδωτικό στρες και το 10403S είναι ένα ιδιαίτερα οξυ-άντοχο στέλεχος, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται και με την υψηλή αντοχή του στην ΥΥΠ. Ωστόσο, ο συνδυασμός μίας μικρής συγκέντρωσης υγρού καπνού με πολύ χαμηλές πιέσεις έδειξε να έχει υποσχόμενα αποτελέσματα καθώς ο πληθυσμός του κανονικού στελέχους LO28 μειώθηκε περισσότερο από 4.00 λογάριθμους.

Συνεχίζοντας, χρησιμοποιήσαμε την κατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  πριν την εφαρμογή της υψηλής πίεσης. Η συνδυαστική δράση αυτών των δύο μεθόδων έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (Bulut, 2014a; 2014b; Su et al., 2014). Η προσθήκη των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού βελτίωσε σε μικρό βαθμό την αντιμικροβιακή δράση της κατάψυξης σε συνδυασμό με την ΥΥΠ. Αντιθέτως, η αντιμικροβιακή δράση της ΥΥΠ, χωρίς κατάψυξη ενισχύθηκε αρκετά από την προσθήκη των υγρών καπνών. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στην αλλαγή των καταστάσεων (υγρή, στερεά) των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού κατά τη διάρκεια της κατάψυξης, έχοντας σημείο πήξης χαμηλότερο από του νερού (Ledfort, 1981) όμως χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για την διερεύνησή του. Όταν η κατάψυξη πραγματοποιείται σωστά, χωρίς ενδιάμεσα στάδια, τότε η ποιότητα των τροφίμων επηρεάζεται ελάχιστα (Oosterhuis, 1981; Evans, 2009). Οι Redmond et al. (2003), χρησιμοποίησαν ειδικό κρυογονικό θάλαμο ψύξης με τη χρήση υγρού άζωτου, όπου έπειτα από 24 λεπτά στους  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ο πουρές πατάτας έφτασε στους  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ενώ χρειάστηκαν 78 λεπτά για να φτάσει στους  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Σχετικά με την μικροβιολογική ασφάλεια, είναι γνωστό ότι η κατάψυξη μπορεί να προκαλέσει υψηλά ποσοστά τραυματισμού στον πληθυσμό των βακτηρίων (El-Kest

& Marth, 1991). Οι Jiang et al. (2011), βρήκαν ότι ένα προηγούμενο στάδιο κατάψυξης στους  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  πριν την αποθήκευση των προϊόντων ψητής γαλοπούλας στους  $4.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  σε συνδυασμό με την επιφανειακή εφαρμογή αντιμικροβιακών οδήγησε σε σημαντική μείωση του *L. monocytogenes*. Οι Golden et al. (1988), αναφέρουν ότι, μετά από 2 εβδομάδες στους  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  ο πληθυσμός των τραυματισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* έφθασε το 82 %. Ομοίως, τα δεδομένα μας για το *L. monocytogenes*, μετά από ΥΥΠ και κατάψυξη, παρουσίασαν υψηλά ποσοστά τραυματισμένων κυττάρων.

Κατόπιν, όταν το *L. monocytogenes* 10403S, ενοφθαλμίστηκε στην επιφάνεια των φιλέτων νωπής πέστροφας, μετά από ΥΥΠ και χωρίς κατάψυξη, παρατηρήθηκε πολύ μικρή μείωση στον πληθυσμό του ( $< 0.40\text{ log CFU/g}$ ) για όλα τα δείγματα και στατιστικά μικρότερη από αυτή για τα αντίστοιχα δείγματα σε ζωμό BHI. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη σύνθεση της σάρκας της νωπής πέστροφας, τα συστατικά της οποίας μπορεί να είχαν προστατευτική δράση για τα κύτταρα του παθογόνου. Ο τύπος, η σύνθεση αλλά και η δομή του δοκιμαζόμενου τροφίμου, μπορεί να επηρεάζει την αντίσταση των βακτηρίων κατά την υποβολή τους σε υψηλές υδροστατικές πιέσεις (Bucur et al., 2018). Υψηλότερα ποσοστά τραυματισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* καταγράφηκαν στα δείγματα νωπής πέστροφας μετά την κατάψυξη τους συγκριτικά με τα δείγματα που παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου. Όπως παρατηρήσαμε και για τα δείγματα σε θρεπτικό ζωμό (BHI), έτσι και για τα δείγματα νωπής πέστροφας η αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών σε συνδυασμό με υπερκατάψυξη και χωρίς ΥΥΠ, ήταν μικρή.

Το ποσοστό των τραυματισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes*, στα δείγματα καπνιστής πέστροφας που καταψύχθηκαν και υπέστησαν ΥΥΠ (χωρίς προσθήκη υγρών καπνών) ήταν διπλάσιο συγκριτικά με αυτό στα δείγματα χωρίς κατάψυξη,

δείχνοντας την πιθανή συνεργιστική δράση μεταξύ των δύο αυτών μεθόδων (κατάψυξη και ΥΥΠ). Ωστόσο, με την προσθήκη μικρής συγκέντρωσης (0.50 %, v/v) υγρών καπνών σε δείγματα καπνιστής πέστροφας, μετά από υπερκατάψυξη και ΥΥΠ, παρατηρήσαμε μία εντυπωσιακή μείωση ίση με 5.48 log CFU/g του *L. monocytogenes* 10403S. Στην παραπάνω περίπτωση η συνεισφορά της αντιμικροβιακής δράσης των υγρών καπνών ήταν εμφανής, αφού για τα ίδια δείγματα απουσία των L9 ή G6, η μείωση ήταν μικρότερη από 0.50 log (CFU/g). Συμπεραίνουμε ότι αυτή η ισχυρή συνεργιστική δράση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την μείωση των πιέσεων που εφαρμόζονται στη βιομηχανία, δηλαδή τη μείωση του κόστους.

Στην έρευνα των Vitt et al. (2001), σε φιλέτα καπνιστού σολομού (ψυχρής κάπνισης), βρέθηκε ότι η συγκέντρωση 0.50 % υγρού καπνού δεν ήταν αρκετή για την αναστολή των *L. innocua* και *L. monocytogenes* και μία πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση ήταν αναγκαία για να το καταφέρουν αυτό, λόγω των πρωτεϊνών του σολομού που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των φαινολικών ενώσεων. Ακόμη, οι Painter et al. (1998), προτείνουν τρεις πιθανούς μηχανισμούς για την ανασταλτική δράση των καρβονυλίων, όπου ο "Τύπος Α" αφορά την συμπύκνωση (Condensation Reaction) των μορίων αμινοξέων και της αμμωνίας με τα καρβονύλια, ο "Τύπος Β" αναφέρει πως τα καρβονύλια είναι αποτελεσματικότερα έναντι των σαπροφυτικών βακτηρίων και των ζυμών και τέλος ο "Τύπος Γ" εξηγεί ότι μέσω χημικών αλλαγών το υπόστρωμα γίνεται λιγότερο προσιτό στα ένζυμα των μικροβίων. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός αδρανοποίησης των μικροοργανισμών παραμένει άγνωστος και τόσο οι φαινολικές όσο και οι καρβονυλικές ενώσεις φαίνεται να είναι υπεύθυνες για την αναστολή διαφόρων βακτηρίων.

Από τα αποτελέσματα μας, προέκυψε ότι, η εφαρμογή της ΥΥΠ ή η παρουσία των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού (0.50 %), από μόνα τους δεν ήταν αρκετά για τη θανάτωση του *L. monocytogenes* στην επιφάνεια των δειγμάτων καπνιστής πέστροφας (μείωση < 0.30 log CFU/g). Ωστόσο, συνδυάζοντας την ΥΥΠ, με την υπερκατάψυξη και παρουσία των συμπυκνωμάτων καπνού (L9 & G6), καταφέραμε να μειώσουμε τον πληθυσμό του *L. monocytogenes* κατά 5.48 log CFU/g, δηλαδή κάτω από το όριο ανίχνευσης (2.60 log CFU/g; Σχ. 8.5). Τελικά, καταφέραμε να μειώσουμε τον πληθυσμό του πιο ανθεκτικού στελέχους (από τα δοκιμαζόμενα), του *L. monocytogenes*, περισσότερο από 5.00 log, σύμφωνα με τις απαιτήσεις της Αμερικανικής Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων (USFDA, 2000), όπως προβλέπετε για τη χρήση νέων τεχνολογιών. Ωστόσο, η καταγραφόμενη μείωση παρατηρήθηκε στο έτοιμο προϊόν φιλέτων καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης). Αυτό σημαίνει, ότι θα μπορούσε ήδη να περιέχει υψηλή συγκέντρωση των ενώσεων του καπνού και η επιπλέον προσθήκη 0.50 % συγκέντρωσης των συμπυκνωμάτων μας (μέγιστο επιτρεπόμενο όριο χρήσης από την εταιρία παραγωγής, 2.91 % για αλιευτικά προϊόντα) στην επιφάνεια των φιλέτων καπνιστής πέστροφας, θα μπορούσε να επηρεάσει την ποιότητα και την αποδοχή του τελικού προϊόντος. Έτσι αποφασίστηκε να προσθέσουμε μία μικρή συγκέντρωση υγρού καπνού σε ένα ήδη καπνισμένο προϊόν, για την επιπρόσθετη ενίσχυση της αντιμικροβιακής δράσης, χωρίς να επηρεάσουμε τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Επιπλέον, τα προϊόντα θερμής κάπνισης επιμολύνονται συχνά με στελέχη του παθογόνου *L. monocytogenes* και λόγω της μεγάλης διάρκειας ζωής τους αλλά και της απουσίας του φυσικού μικροβιώματος του τροφίμου (Lianou & Sofos, 2007), το παθογόνο μπορεί να πολλαπλασιαστεί, αυξάνοντας τον κίνδυνο προσβολής των καταναλωτών (Jemmi & Keusch, 1992). Στην πρόσφατη έρευνα των Hokkanen et al. (2018), μελετήθηκαν 80



διαφορετικά καπνιστά αλιευτικά προϊόντα με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών GC-MS και βρέθηκε ότι ο μέσος όρος της συγκέντρωσης του βενζο[α]πυρένιου και των PAHs, ήταν χαμηλότερος από τα μέγιστα επιτρεπτά όρια. Από τα παραπάνω στοιχεία πιστεύουμε ότι τα επίπεδα των επιβλαβών ουσιών του καπνού στα δείγματα μας, θα είναι κάτω από τα επιτρεπτά όρια και αν τα υπερβαίνουν δεν θα είναι πολύ υψηλότερα. Επιπλέον, οι Visciano et al. (2008), βρήκαν ότι έπειτα από κάπνιση φιλέτων πέστροφας με τη χρήση υγρών καπνών η συγκέντρωση των επιβλαβών PAH δεν αυξήθηκε.

Σχετικά με την ασφάλεια των προϊόντων μας, μετά την προσθήκη των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι, στα εκχυλίσματα καπνού μπορεί να περιέχονται χημικές ενώσεις, όπως είναι το βενζο[α]πυρένιο (BaP), το βενζο[α]ανθρακενίο ή άλλα PAHs, που θεωρούνται δυνητικά γονιδιοτοξικές και καρκινογόνες ενώσεις (Alomirah et al., 2011; McDonald, 2015). Για τον λόγο αυτό είναι πολύ σημαντικό να τηρούνται πάντα οι μέγιστες επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις των συμπυκνωμάτων στο τελικό προϊόν. Το μέγιστο επιτρεπόμενο επίπεδο, όπως έχει οριστεί από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, για το βενζο[α]πυρένιο (BaP) είναι 2 µg/kg για τα καπνιστά κρεατοπαρασκευάσματα, πουλερικά και αλιευτικά προϊόντα (E.C., 2011). Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius, (2015) το επιτρεπόμενο επίπεδο για τα βενζοϊκά οξέα είναι 200 mg/kg, ενώ για τους PAHs γενικά είναι μόλις 5 µg/kg (Varlet et al., 2007). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας το 1994, κατέθεσε ότι η συνολική ημερήσια δόση φαινολικών ουσιών από ένα ενήλικο άτομο δεν θα πρέπει να ξεπερνάει τα 100 µg/kg, βάρους σώματος την ημέρα, ενώ δεν υπάρχουν επίσημα θεσπισμένα όρια για την πρόσληψη καρβονυλίων. Τα εκχυλίσματα υγρών καπνών (L9 & G6) που χρησιμοποιήσαμε στο παρόν κεφάλαιο, συμμορφώνονται με τους κανονισμούς για τη χρήση τέτοιου είδους

ουσιών. Ωστόσο, είναι ενθαρρυντικό ότι υπάρχουν ποικίλες έρευνες που συναινούν ότι, η κάπνιση με τη χρήση των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού, έναντι της παραδοσιακής μεθόδου, οδηγεί σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις ή και καθόλου PAHs στο τελικό προϊόν (Gomaa et al., 1993; EFSA, 2007; Muratore et al., 2007; Varlet et al., 2007; Dimitriadou et al., 2008; McDonald, 2015). Από τα αποτελέσματα μας, διαφάνηκε η συνεργιστική δράση μεταξύ των τριών μεθόδων που χρησιμοποιήσαμε και είναι πολύ σημαντικό καθώς θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για περαιτέρω έρευνα, ώστε να προσδιοριστούν οι ακριβείς παράμετροι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τη βιομηχανία τροφίμων. Η αποτελεσματικότητα της ΥΥΠ εξαρτάται τόσο από το προϊόν, όσο και από τις τεχνολογικές παραμέτρους που χρησιμοποιούμε, ενώ οι δύο αυτοί παράγοντες μπορούν να δράσουν συνεργιστικά (Bucur et al., 2018).

Όλες οι προσπάθειες που έγιναν στο παρόν Κεφάλαιο, ήταν προσανατολισμένες ως προς το προϊόν, λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα χαρακτηριστικά του για την εφαρμογή της κατάλληλης πίεσης που θα οδηγούσε στη θανάτωση του *L. monocytogenes*. Η ίδια προσοχή δόθηκε κατά την επιλογή όλων των εμποδίων που περιεγράφηκαν πιο πάνω, προσομοιάζοντας όσο το δυνατόν τις πραγματικές συνθήκες παραγωγής του, προσπαθώντας να μειώσουμε τα επίπεδα της εφαρμοζόμενης ΥΥΠ, καθώς η χρήση της σε υψηλά επίπεδα πιέσεων παραμένει αρκετά ακριβή συγκριτικά με τις παραδοσιακές μεθόδους, όπως είναι η θέρμανση (Elamin et al., 2015). Ακολουθώντας τις σύγχρονες απαιτήσεις της αγοράς για αύξηση της χρήσης νέων μη θερμικών μεθόδων, όπως είναι η ΥΥΠ, καταφέραμε να μειώσουμε την εφαρμοζόμενη πίεση και επομένως το κόστος της ΥΥΠ, συνδυάζοντας την με την αντιμικροβιακή δράση των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού και την κατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Όπως παρατηρήθηκε, η κατάψυξη των προϊόντων ως μεταχείριση πριν από την εφαρμογή υψηλών πιέσεων δεν φάνηκε να επηρεάζει την εμφάνιση των τελικών μας

προϊόντων (νωπή και καπνιστή πέστροφα). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες που παρατήρησαν τις διαφορές στο χρώμα φιλέτων σολομού ιχθυοκαλλιέργειας (*Oncorhynchus tshawytscha*), πριν και μετά την ΥΥΠ στα 200 έως 600 MPa σε συνδυασμό με την προσθήκη συμπυκνωμάτων υγρού καπνού, σε κατεψυγμένες γαρίδες στα 250 MPa έως και 10 λεπτά (Parlapani et al., 2019b) καθώς και την επίδραση της ΥΥΠ σε νωπά φιλέτα ιριδίζουσας πέστροφας (Erkan et al., 2010) ή ακόμα και σε καπνιστά ψάρια (Erkan et al., 2011). Τελικά, ανέφεραν ότι, η ΥΥΠ δεν φάνηκε να επηρεάζει το χρώμα των προϊόντων. Η συγκεκριμένη παρατήρηση, μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς η εμφάνιση του τροφίμου φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην τελική απόφαση του καταναλωτή για την αγορά του (Garber et al., 2003).

Επιπλέον, η εφαρμογή της ΥΥΠ πίεσης μπορεί να είναι αποτελεσματική έναντι των βλαστικών κυττάρων αλλά δεν επαρκεί από μόνη της για την πλήρη θανάτωση του παθογόνου *L. monocytogenes*, ενώ τα αποτελέσματα της μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με το στέλεχος. Παρότι, η κατάψυξη σε χαμηλές θερμοκρασίες όπως οι  $-80^{\circ}\text{C}$ , μπορεί να είναι δαπανηρή, προτείνουμε μια σύντομη κατάψυξη των προϊόντων η οποία μπορεί να οδηγήσει σε δραματική μείωση των υψηλών πιέσεων που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία, που σημαίνει χαμηλότερο λειτουργικό κόστος. Επίσης, η μέθοδος της βαθιάς κατάψυξης είναι κατάλληλη για μικρής και μεσαίες βιομηχανίες, κατά το στάδιο της παραγωγής και ανάπτυξης των προϊόντων τους καθώς το κόστος ενός θαλάμου κατάψυξης με τη χρήση αζώτου είναι πολύ μικρότερο, συγκριτικά με το κόστος ενέργειας για μηχανική ψύξη. Προτείνουμε τα αποτελέσματά μας να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν από την βιομηχανία αλιευτικών προϊόντων για την παραγωγή νέων ασφαλέστερων προϊόντων, σε

συνδυασμό με φυσικές μεθόδους όπως η κατάψυξη και η χρήση υγρών συμπυκνωμάτων καπνού αντί της μη ελεγχόμενης παραδοσιακής κάπνισης.

Καταλήγοντας, δεν υπάρχουν άλλες μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία που να αναφέρουν παρόμοια θανάτωση του παθογόνου *L. monocytogenes*, σε τόσο χαμηλές υδροστατικές πιέσεις (200 MPa). Η πραγματική πρωτοτυπία των αποτελεσμάτων μας έγκειται στον επιτυχή συνδυασμό των τριών μεθόδων (ΥΥΠ, 0.50 % συγκέντρωση υγρού καπνού και κατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) που αποτελούν μία πραγματική καινοτόμο προσέγγιση και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και να έχουν πραγματικό αντίκτυπο για τη βιομηχανία των καπνιστών αλιευτικών προϊόντων.

## **Κεφάλαιο 9. Γενική συζήτηση, συμπεράσματα και προτάσεις για μελλοντική έρευνα**

### **9.1. Γενική Συζήτηση και Συμπεράσματα**

Η συνεχώς αυξανόμενη κατανάλωση νωπών και μεταποιημένων αλιευτικών προϊόντων, σχετίζεται με την αύξηση των κρουσμάτων λιστερίωσης και απασχολεί όλους τους εμπλεκόμενους φορείς, τις κυβερνητικές αρχές αλλά και τους καταναλωτές (Khan et al., 2017). Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, μπορούν να συνεισφέρουν στην καλύτερη κατανόηση της μικροβιακής οικολογίας, της διασφάλισης της ποιότητας αλλά και της προστασίας των καταναλωτών από παθογόνους μικροοργανισμούς που μπορεί να υπάρχουν στο τρόφιμο και καταφέρνουν να ανταπεξέρχονται, των διαφόρων σταδίων επεξεργασίας των φιλέτων καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης), αλλά και κατ' επέκταση της βιομηχανίας των καπνιστών αλιευτικών προϊόντων.

Κατά την παραγωγή της καπνιστής πέστροφας με θερμή κάπνιση, υπάρχει μία αλληλουχία διεργασιών, οι οποίες προκαλούν συγκεκριμένες καταπονήσεις στα κύτταρα του *L. monocytogenes*. Η επιμόλυνση με *L. monocytogenes* εκτός από το αρχικό προϊόν, δύναται να συμβεί και στα ενδιάμεσα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, όπως (i) μετά την αλάτιση και πριν τη θερμή κάπνιση ή (ii) μετά τη θερμική επεξεργασία και την ταυτόχρονη κάπνιση των φιλέτων και πριν το τελικό στάδιο της συσκευασίας.

Τα κύτταρα του παθογόνου μπορεί να προέρχονται είτε (i) από την πρώτη ύλη, όπου όμως δύναται να επιμολύνουν το προϊόν και σε ενδιάμεσα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, λόγω διασταυρούμενης επιμόλυνσης (η προσομοίωση πραγματοποιήθηκε με ενοφθαλμισμό μίγματος στελεχών πλαγκτονικών κυττάρων

που αναπτύχθηκαν σε εργαστηριακά υλικά), είτε (ii) από επιμόλυνση του προϊόντος από τις επιφάνειες, όπου το *L. monocytogenes* είχε αναπτύξει βιοϋμένια (η προσομοίωση πραγματοποιήθηκε με ενοφθαλμισμό μίγματος στελεχών βιοϋμενικών κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε μεταλλικές επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα). Επιπλέον, πλησιάζοντας καλύτερα τις πραγματικές καταστάσεις εύρεσης του παθογόνου στο περιβάλλον (Skandamis et al., 2009), χρησιμοποιήθηκαν 5 στελέχη του παθογόνου από τους πιο κοινά εμπλεκόμενους ορότυπους (4b, 1/2a και 3a) στα κρούσματα λιστερίωσης (Spanu et al. 2014).

Η ικανότητα του παθογόνου να προσαρμόζεται σε μία καταπόνηση μπορεί να του προσδώσει αυξημένη αντοχή στην ίδια ή επιπρόσθετη καταπόνηση (Yousef, 2000; Skandamis et al., 2008; Paramythiotis & Skandamis, 2015). Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής μελέτης, τα ωσμωτικά προσαρμοσμένα κύτταρα του *L. monocytogenes*, παρουσίασαν αυξημένη ανθεκτικότητα στη θερμική επεξεργασία. Οι χρόνοι δεκαδικής μείωσης που καταγράφηκαν, συμπίπτουν με τη βιβλιογραφία, όπου οι τιμές D για θέρμανση του *L. monocytogenes* στους 60 °C, κυμαίνονται από 5.61 λεπτά (Murphy et al., 2004) έως και 22.98 λεπτά (Osaili et al., 2006). Παράλληλα και η αλατότητα του μέσου θέρμανσης ήταν ένας ακόμη παράγοντας που επηρέασε την αντοχή των κυττάρων στη θερμική επεξεργασία ειδικότερα εάν τα κύτταρα προέρχονταν από περιβάλλον όπου είχαν προσαρμοστεί σε χαμηλότερη ή υψηλότερη αλατότητα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να υφίστανται και ένα είδος ωσμωτικού σοκ παράλληλα με τη θερμική επεξεργασία, προς τα κάτω (downsift) ή προς τα πάνω (upshift).

Ανθεκτικότερα στη θερμική επεξεργασία ήταν και τα κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, καθώς ο χρόνος δεκαδικής μείωσης ( $D_{60°C}$ ) ήταν 6.29 λεπτά, ενώ για τα πλαγκτονικά κύτταρα ήταν 4.19 λεπτά. Η υψηλότερη θερμοανθεκτικότητα των

κυττάρων βιοϋμενίων σε σχέση με τα πλαγκτονικά έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές, ωστόσο οι ρυθμοί θανάτου διαφέρουν από περίπτωση σε περίπτωση (Frank & Koffi 1990; Taormina & Dorsa, 2007). Όσον αφορά τους τραυματισμένους επιζώντες αυτοί έδειξαν μεγαλύτερη ευαισθησία όταν απαριθμήθηκαν σε PALCAM άγαρ παρά σε TSA με 5.00 % (w/v) NaCl, γεγονός που όπως εξηγούν και οι Liamkaew et al. (2014), αποδίδεται στην ανασταλτική δράση των ουσιών του PALCAM άγαρ, έναντι των στρεσαρισμένων κυττάρων του *L. monocytogenes* σε σχέση με την επίδραση του NaCl. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν φαινόμενα όπως “shouldering”, “lag periods” και “tailing” που υποδεικνύουν πιο ανθεκτικούς υπό-πληθυσμούς του μικροοργανισμού (Karyotis et al., 2017). Αυτό το φαινόμενο, μπορεί να οφείλεται στην ποικιλομορφία των διαφορετικών στελεχών του μίγματος που χρησιμοποιήθηκε ή ακόμη και στην ανομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας στα κύτταρα (Stringer et al., 2000).

Καταλήγοντας, θα πρέπει να σημειωθεί και να ληφθεί υπόψη από την επιστημονική κοινότητα και τη Βιομηχανία, ότι πιθανόν οι θερμικές επεξεργασίες να είναι λιγότερο αποτελεσματικές καθώς, οι δοκιμές θερμοανθεκτικότητας βασίζονται σε πρωτόκολλα που χρησιμοποιούν εργαστηριακές πλαγκτονικές καλλιέργειες, που έχουν μία συνεχή, ίδια δομή και συμπεριφορά, σε αντίθεση με την ποικιλομορφία (διαφορετική συμπεριφορά) των φυσικά εμφανιζόμενων πληθυσμών του παθογόνου στο περιβάλλον επεξεργασίας.

Κατόπιν, έγινε μελέτη της απόκρισης των κυττάρων του *L. monocytogenes* με διαφορετικό ιστορικό ανάπτυξης, (κύτταρα ωσμωτικά προσαρμοσμένα, θερμικά καταπονημένα, κύτταρα προερχόμενα από βιοϋμένια), μετά από τις επακόλουθες καταπονήσεις, όπως η ωσμωτική και η θερμική, έναντι των αντιμικροβιακών ουσιών των συμπυκνωμάτων καπνού. Παρουσία των υγρών καπνών βρέθηκε, ότι η

ωσμωτική προσαρμογή του *L. monocytogenes*, δεν φάνηκε να του προσδίδει αυξημένη ανθεκτικότητα στην αντιμικροβιακή δράση των καπνών, πριν ή μετά τη θερμική καταπόνηση. Ωστόσο, μικρή συγκέντρωση (< 1.00 %) των συμπυκνωμάτων καπνού, οδήγησε στην εξάλειψη του πληθυσμού των κυττάρων (ωσμωτικά προσαρμοσμένα και μη) του *L. monocytogenes*. Αντιθέτως, τα κύτταρα βιοϋμενίων μετά από θερμική καταπόνηση παρουσίασαν υψηλότερη ανθεκτικότητα στην αντιμικροβιακή δράση των υγρών καπνών, συγκριτικά με τα πλαγκτονικά κύτταρα αλλά και τα κύτταρα χωρίς θερμική καταπόνηση. Αξιοσημείωτο είναι, ότι σε όλες τις περιπτώσεις, συγκέντρωση > 0.50 % του πιο αποτελεσματικού καπνού (L9), ήταν αρκετή για να οδηγήσει τα κύτταρα του *L. monocytogenes* σε πληθυσμούς κάτω από το όριο ανίχνευσης, όμως χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος πριν την εφαρμογή του.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, στην παρούσα διδακτορική διατριβή τα κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* που αποκολλήθηκαν (detached) με μηχανικό τρόπο από τις μεταλλικές τους επιφάνειες, χρησιμοποιήθηκαν αμέσως, ώστε να μην επηρεαστεί η φυσιολογική τους κατάσταση κατά την παραμονή τους στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι η φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων βιοϋμενίων (αποκολλημένα ή προσκολλημένα) στις μεταλλικές επιφάνειες, είναι διαφορετική από αυτή των πλαγκτονικών και χρειάζεται να επέλθει ένα χρονικό διάστημα τουλάχιστον 3 ωρών, ώστε να αλλάξει η φυσιολογική τους κατάσταση (Rollet et al., 2009). Επιπλέον, οι Xu et al. (1998), αναφέρουν πως τα αποκολλημένα κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* είναι δύσκολο να επανέλθουν στην πλαγκτονική τους μορφή (planktonic mode), τουλάχιστον για μερικές ώρες.

Καταλήγοντας, θα πρέπει να σημειωθεί και να ληφθεί υπόψη από την επιστημονική κοινότητα και τη Βιομηχανία, ότι για την εξάλειψη των ανθεκτικών βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, θα πρέπει να εξετάζεται κάθε φορά ο πιο αποτελεσματικός



συνδυασμός εμποδίων κατά την παραγωγική διαδικασία, ο οποίος θα μπορούσε να ενισχυθεί από την εφαρμογή αποτελεσματικών αντιμικροβιακών ουσιών, όπως ο υγρός καπνός για τα καπνιστά αλιευτικά προϊόντα (αποτελέσματα παρούσας διδακτορικής διατριβής).

Εκτός από την επιμόλυνση των τροφίμων από παθογόνους μικροοργανισμούς, η μικροβιακή αλλοίωση παραμένει ένα πρόβλημα που δεν έχει ελεγχθεί ακόμη αποτελεσματικά (Khan et al., 2017). Για την επίτευξη αυτού του στόχου είναι απαραίτητη η μελέτη και η γνώση της μικροβιακής οικολογίας των φιλέτων καπνιστής πέστροφας που είναι περιορισμένη. Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στοχεύοντας στον προσδιορισμό της μικροβιακής οικολογίας των καπνιστών αλιευτικών προϊόντων (Civera et al., 1993; Shimasaki et al., 1994; Gram & Huss, 1996; Delignette-Muller et al., 2006; Ellouze et al., 2011; Løvdal, 2015) και ελάχιστες για τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας θερμής κάπνισης (Jemni & Keusch, 1992; Shin et al., 2008; Ficicilar & Genccelep, 2017), χωρίς όμως να δοθεί έμφαση στον προσδιορισμό των ειδικών αλλοιωγόνων και των υπολοίπων μικροοργανισμών που εμφανίζονται στη σάρκα των φιλέτων, όπως πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Ο εμπορικός χρόνος ζωής (shelf life) των φιλέτων, όπως ήταν αναμενόμενο επηρεάστηκε από τη θερμοκρασία αποθήκευσής τους και ήταν σημαντικά μικρότερος στους 7.9 °C (περίπου 2 μήνες), συγκριτικά με την ορθή θερμοκρασία ψύξης, όπου απορρίφθηκαν έπειτα από περισσότερο από 4 μήνες. Τα υψηλά επίπεδα της OMX ( $10^7$ - $10^8$  CFU/g), δεν αποτελούν απαραίτητα δείκτη αλλοίωσης στα αλιευτικά καπνιστά προϊόντα (Hansen & Huss, 1998), και το ίδιο φάνηκε και από τα δικά μας αποτελέσματα.

Κατόπιν, ταυτοποιήθηκαν οι πιθανοί ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (AM) που μπορεί να οδηγούν στην αλλοίωση των φιλέτων καπνιστής πέστροφας. Οι AM που

απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση πρωτεωμικής ανάλυσης και ειδικότερα με MALDI-TOF MS και προέκυψαν 3 διαφορετικά γένη (*Enterococcus*, *Candida* και *Lactobacillus spp.*) μικροοργανισμών για τα δείγματα των φιλέτων από τις 2 περιοχές και 2 θερμοκρασίες. Τόσο τα Gram θετικά οξυγαλακτικά βακτήρια, όσο και οι ζύμες, έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί ως αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί από διάφορα καπνιστά και άλλα αλιευτικά προϊόντα (Hansen & Huss, 1999; Leroi et al., 2001; Kilinc & Cakli, 2005; Sallam, 2008; Boziaris et al., 2013; Løvdal, 2015).

Η γνώση της σύνθεσης των μικροοργανισμών που απαρτίζουν την κοινότητα ενός τροφίμου είναι απαραίτητη. Επίσης, είναι σημαντικό να μελετηθούν και οι μικροβιακές αλληλεπιδράσεις, ανάμεσα στους μικροοργανισμούς του φυσικά εμφανιζόμενου μικροβιώματος ενός τροφίμου και των παθογόνων που μπορεί να το επιμολύνουν (Gram et al., 2002; Haruta et al., 2009). Είναι αδιαμφισβήτητο πως η τύχη των κυττάρων (πλαγκτονικά και βιοϋμενίων) του παθογόνου μπορεί να επηρεαστεί από τον αριθμό και το είδος των μικροοργανισμών που είναι παρόν σε μία επιφάνεια ή ακόμη και στο τρόφιμο, όπως φάνηκε και από τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής (πραγματικό προϊόν και μοντέλα υποστρώματος). Στα φιλέτα καπνιστής πέστροφας, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ανάπτυξη των κυττάρων του παθογόνου παρουσία του φυσικού μικροβιώματος που αποτελούνταν κυρίως από οξυγαλακτικά βακτήρια. Ωστόσο, όταν έγινε ενοφθαλμισμός των κυττάρων του παθογόνου σε εργαστηριακά μοντέλα (καπνιστής πέστροφας) παρουσία των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων βακτηρίων, φάνηκε καλύτερα αυτό που ωραία διατύπωσαν οι Zilelidou & Skandamis (2018), λέγοντας πως η συνύπαρξη των μικροοργανισμών σε μικρές ή μεγάλες κοινότητες, δημιουργεί ένα δίκτυο με επιζήμιες ή ωφέλιμες σχέσεις μεταξύ τους.

Από τη συνύπαρξη των πιθανών ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (έναν προς έναν) με τα πλαγκτονικά κύτταρα του *L. monocytogenes*, σε άλλες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν συμβιωτικές σχέσεις και σε άλλες η παρουσία του *L. monocytogenes* περιόρισε την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, όπως βρέθηκε στη συγκαλλιέργεια του, με τον *L. sakei* ή τον *L. curvatus*. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τα κύτταρα βιοϋμενίων του *L. monocytogenes*, με πιο χαρακτηριστική την περίπτωση, όπου η ανάπτυξη των κυττάρων βιοϋμενίων του παθογόνου αυτή τη φορά, περιορίστηκε από τα *C. famata* και *C. zeylanoides*. Χαρακτηριστικά, σε όλες τις περιπτώσεις συγκαλλιέργειας του *L. monocytogenes* (πλαγκτονικά και κύτταρα βιοϋμενίων) με το μίγμα των ΑΜ, η ανάπτυξη του παθογόνου περιορίστηκε. Τα παραπάνω φαινόμενα μικροβιακού ανταγωνισμού μπορεί να οφείλονται στην παραγωγή οργανικών ενώσεων, από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Blanco-Lizarazo et al., 2016) αλλά και στον ανταγωνισμό για τις διαθέσιμες πηγές (Guillier et al., 2008). Συμπερασματικά, η αποτελεσματικότητα των φυσικά εμφανιζόμενων μικροοργανισμών ως μία ομάδα να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του *L. monocytogenes*, μπορεί να οφείλεται στη σύνθεση, την ισορροπία, την αποτελεσματικότητα και τη συμπληρωματικότητα όλων των μικροοργανισμών που την απαρτίζουν και τη συνθέτουν και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που πρέπει να διερευνηθούν σε βάθος.

Για την επίτευξη της ασφάλειας, ποιότητας και ευκολίας χρήσης, εκτός από την ανάγκη για την μελέτη των συνθηκών επεξεργασίας και αποθήκευσης, είναι αναγκαία και η δοκιμή νέων τεχνολογιών, καινοτομιών και στρατηγικών. Οι καινοτόμες μέθοδοι επεξεργασίας τροφίμων, όπως η Υψηλή Υδροστατική Πίεση (ΥΥΠ), σε συνδυασμό με άλλες αντιμικροβιακές ουσίες, προσφέρουν σημαντικές λύσεις που μπορούν να ενισχύσουν την ασφάλεια των τροφίμων και να παρατείνουν τον

εμπορικό χρόνο ζωής των έτοιμων προς κατανάλωση (RTE) αλιευτικών προϊόντων (Georget et al., 2015; Syed et al., 2016; Possas et al., 2017).

Μελετήθηκε η εφαρμογή ΥΥΠ σε συνδυασμό με μικρές συγκεντρώσεις καπνού και κατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ο συνδυασμός και των τριών μεθόδων οδήγησε σε μία εντυπωσιακή μείωση του πληθυσμού του *L. monocytogenes* 10403S, στην επιφάνεια των δειγμάτων νωπής και καπνιστής πέστροφας, ίσο με  $5.48\text{ log CFU/g}$ . Όπως προέκυψε, η συνεργιστική δράση των υγρών καπνών σε συνδυασμό με την ΥΥΠ, ενισχύθηκε από την εφαρμογή της κατάψυξης των δειγμάτων. Καταλήγοντας, φάνηκε ότι με αυτή τη προσέγγιση μπορεί να επιτευχθεί μείωση της εφαρμοζόμενης πίεσης, σε πιέσεις χαμηλές έως και τα 200 MPa με μικρή χρονική διάρκεια 15 λεπτών.

Τα παραπάνω συμπεράσματα, είναι σημαντικά για τη Βιομηχανία, καθώς μία τόσο υψηλή βακτηριακή θανάτωση σε τόσο χαμηλές πιέσεις, θα μπορούσε να οδηγήσει στην παραγωγή νέων και ασφαλέστερων προϊόντων με τη χρήση μη θερμικών μεθόδων, όπως είναι η ΥΥΠ σε προσιτή τιμή, λόγω της μείωσης του πιο σημαντικού κόστους (λειτουργίας) σε χαμηλές πιέσεις.

## 9.2. Προτάσεις για Μελλοντική έρευνα

Σε συνέχεια των δικών μας αποτελεσμάτων/συμπερασμάτων θα μπορούσαν να λάβουν χώρα μελέτες που να αφορούν την εμφάνιση στα εξής σημεία αιχμής:

1. Καθώς η έρευνα των διαφόρων σταδίων που επηρεάζουν την απόκριση του παθογόνου *L. monocytogenes* και του προσδίδουν αυξημένη αντοχή σε διαδοχικά εμπόδια, έχει λάβει ιδιαίτερη προσοχή τα τελευταία χρόνια (αποτελέσματα παρούσας διατριβής, Stephens et al., 1994; Hill et al., 2002; Ryan et al., 2008; Karyotis et al., 2017), είναι σημαντικό σε επίπεδο βασικής έρευνας η μελέτη των γονιδίων αλλά και των πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες και συμβάλλουν σε αυτό το φαινόμενο.
2. Η καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων τόσο εντός ενός είδους, όσο και μεταξύ των ειδών του *L. monocytogenes* σε μοριακό επίπεδο, θα μπορούσε να οδηγήσει στη δημιουργία καινοτόμων στρατηγικών παρέμβασης για τον έλεγχο του σχηματισμού βιοϋμενίων του παθογόνου στη βιομηχανία, αυξάνοντας την ασφάλεια τροφίμων. Ακόμη, οι ιδιότητες των βιοϋμενίων του *L. monocytogenes* που τους παρέχουν προστασία στις διάφορες καταπονήσεις και η σωστή αντιστοίχιση των μηχανισμών ανθεκτικότητας στις αντιμικροβιακές ουσίες, αποτελούν μεγάλη πρόκληση για το μέλλον, όπως τονίζουν οι Giaouris et al. (2015).
3. Θα πρέπει να πραγματοποιηθούν νέες μελέτες για τον έλεγχο της μικροβιακής οικολογίας, τον προσδιορισμό των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και την ταυτοποίησή τους με μοριακές και άλλες τεχνικές γρήγορης και υψηλής διακριτικότητας, για καπνιστά αλιευτικά προϊόντα, όπως τα φιλέτα καπνιστής πέστροφας (θερμής κάπνισης), καθώς υπάρχει λιγοστή πληροφόρηση.

4. Το σημαντικότερο πρόβλημα για την εμπορευματοποίηση της διαδικασίας της ΥΥΠ, είναι το πολύ υψηλό κόστος επένδυσης και εξαρτάται από παράγοντες όπως είναι οι εφαρμοζόμενες πιέσεις που χρησιμοποιούνται. Στοχεύοντας στην επίλυση των παραπάνω, τα αποτελέσματα μας έδειξαν, πως ο συνδυασμός της ΥΥΠ, με τη χαμηλή θερμοκρασία (υπερκατάψυξη) αλλά και αντιμικροβιακές ουσίες, μπορεί να έχει υποσχόμενα αποτελέσματα, υποδεικνύοντας την ανάγκη για μελλοντική έρευνα σε παρόμοιους συνδυασμούς.
5. Είναι κοινώς αποδεκτό, πως οι αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιούνται γίνονται όλο και λιγότερο αποτελεσματικές, και η ανάγκη για δημιουργία νέων ασφαλών και αποτελεσματικότερων απολυμαντικών είναι επιτακτική. Βάσει των στοιχείων της βιβλιογραφίας, τα συμπυκνώματα υγρών καπνών είναι φιλικά προς το περιβάλλον και ασφαλή στη χρήση, και όπως διαπιστώσαμε έχουν υψηλή αντιμικροβιακή δράση. Το ενδιαφέρον θα πρέπει να στραφεί στη δημιουργία νέων απολυμαντικών με τη χρήση φυσικών αντιμικροβιακών έναντι των παραδοσιακών απολυμαντικών με βάση το χλώριο, αποφεύγοντας την παραγωγή τοξικών χλωραμινών.
6. Λίγα είναι γνωστά για την ικανότητα των αρωματικών υδρογονανθράκων (cyclic hydrocarbons) που περιέχονται στους υγρούς καπνούς, να διαλύονται στη λιπαρή φάση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των βακτηρίων, χωρίς όμως η υψηλότερη διαλυτότητα να μεταφράζεται σε υψηλότερη αποτελεσματικότητα (Holley & Patel, 2005). Η αποτελεσματικότητα της αντιμικροβιακής δράσης των συμπυκνωμάτων υγρού καπνού, οφείλεται σε μια πληθώρα παραγόντων και η περαιτέρω μελέτη της δράσης (mode of action) των ουσιών που περιέχονται στους καπνούς αποτελούν αντικείμενο για μελλοντική μελέτη, ώστε να μπορεί να

γίνει η χρήση τους σε ευρεία κλίμακα για την παραγωγή ασφαλέστερων RTE τροφίμων, επεξεργασμένα χωρίς χημικά πρόσθετα.

Όπως φάνηκε και από τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, για την παραγωγή ασφαλέστερων τροφίμων από τη Βιομηχανία αλιευτικών προϊόντων, θα πρέπει να επιλέγεται η συνδυαστική εφαρμογή δύο ή και περισσότερων αποτελεσματικών τεχνικών επεξεργασίας ικανών να εξαλείψουν και τα πιο ανθεκτικά κύτταρα (πλαγκτονικά και βιοϋμενίων) του *L. monocytogenes*. Η εφαρμογή των σωστών εμποδίων σε χαμηλή ένταση μεταφράζεται, σε χαμηλό κόστος παραγωγής, λιγότερη χρήση χημικών απολυμαντικών ουσιών, που θα μπορούσαν να αντικατασταθούν και από φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες, όπως τα συμπυκνώματα υγρών καπνών για τη Βιομηχανία καπνιστών αλιευτικών προϊόντων, καταλήγοντας στην παραγωγή ελαφρώς μεταποιημένων τροφίμων τα οποία θα είναι ασφαλή με αυξημένη διάρκεια ζωής!

## Βιβλιογραφία

Aarnisalo, K., Salo, S., Miettinen, H., Suihko, M. L., Wirtanen, G. U. N., Autio, T., ... & Sjöberg, A. M. (2000). Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Safety*, 20(4), 237-250.

Abdel, H. K., & Mattar, Z. A. K. A. R. I. A. (2001). Heat resistance and growth of *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* in whole liquid egg. *Acta Microbiologica Polonica*, 50(1), 27-35.

Abe, F. (2007). Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from piezophysiology. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(10), 2347-2357.

Abee, T., & Wouters, J. A. (1999). Microbial stress response in minimal processing. *International journal of food microbiology*, 50(1-2), 65-91.

Acciari, V. A., Torresi, M., Iannetti, L., Scattolini, S., Pomilio, F., Decastelli, L., ... & Montagna, C. (2017). *Listeria monocytogenes* in smoked salmon and other smoked fish at retail in Italy: frequency of contamination and strain characterization in products from different manufacturers. *Journal of food protection*, 80(2), 271-278.

Adams, M. R., & Moss, M. O. (2008). Bacterial agents of foodborne illness—*Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 224-229.



Ahmadova, A., Todorov, S. D., Hadji-Sfaxi, I., Choiset, Y., Rabesona, H., Messaoudi, S., ... & Haertlé, T. (2013). Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. *Anaerobe*, *20*, 42-49.

Albertos, I., Martin-Diana, A. B., Sanz, M. A., Barat, J. M., Diez, A. M., Jaime, I., & Rico, D. (2016). Effect of high-pressure processing or freezing technologies as pretreatment in vacuum fried carrot snacks. *Innovative food science & emerging technologies*, *33*, 115-122.

Allerberger, F., Bagó, Z., Huhulescu, S., & Pietzka, A. (2015). Listeriosis: the dark side of refrigeration and ensiling. In *Zoonoses-Infections Affecting Humans and Animals* (pp. 249-286). Springer, Dordrecht.

Alimentarius, C. (2015). General standards for food additives, codex stan 192–1995. *Pectin; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy*.

Al-Nabulsi, A. A., Osaili, T. M., Shaker, R. R., Olaimat, A. N., Jaradat, Z. W., Elabedeen, N. A. Z., & Holley, R. A. (2015). Effects of osmotic pressure, acid, or cold stresses on antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes*. *Food microbiology*, *46*, 154-160.

Alomirah, H., Al-Zenki, S., Al-Hooti, S., Zaghoul, S., Sawaya, W., Ahmed, N., & Kannan, K. (2011). Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic

hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. *Food control*, 22(12), 2028-2035.

Alpas, H., & Bozoglu, F. (2003). Efficiency of high pressure treatment for destruction of *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(3), 269-273.

Andrews, J. (2012). Poll shows food safety confidence slightly decreased this year. *Food Safety News*. Retrieved July, 10, 2013.

Andrés, A., Rodríguez-Barona, S., Barat, J. M., & Fito, P. (2005). Salted cod manufacturing: influence of salting procedure on process yield and product characteristics. *Journal of Food Engineering*, 69(4), 467-471.

Angelidis, A. S., & Smith, G. M. (2003). Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12), 7492-7498.

AOAC 937.09, 1995 AOAC (1995). Method 937.09—Salt (chlorine as sodium chloride) in seafood. In P. Cunniff, (Ed.), *Official methods of analysis of AOAC international* (16th ed.). 3rd revision, Association of Official Analytical Chemists (AOAC International), Gaithersburg, MD, USA.

Arashisar, Ş., Hisar, O., Kaya, M., & Yanik, T. (2004). Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *International journal of food microbiology*, 97(2), 209-214.

Archer, D. L. (1996). Preservation microbiology and safety: evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. *Trends in Food Science & Technology*, 7(3), 91-95.

Ashie, I. N. A., Smith, J. P., Simpson, B. K., & Haard, N. F. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 36(1-2), 87-121.

Atlas, R. M. (2006). *The handbook of microbiological media for the examination of food*. CRC press.

Aursand, I. G., Gallart-Jornet, L., Erikson, U., Axelson, D. E., & Rustad, T. (2008). Water distribution in brine salted cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*): A low-field <sup>1</sup>H NMR study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(15), 6252-6260.

Bae, D., Liu, C., Zhang, T., Jones, M., Peterson, S. N., & Wang, C. (2012). Global gene expression of *Listeria monocytogenes* to salt stress. *Journal of food protection*, 75(5), 906-912.

Baka, M., Noriega, E., Mertens, L., Van Derlinden, E., & Van Impe, J. F. (2014). Protective role of indigenous *Leuconostoc carnosum* against *Listeria monocytogenes*

on vacuum packed Frankfurter sausages at suboptimal temperatures. *Food research international*, 66, 197-206.

Bannerman, A. McK. (2001). Hot Smoking of Fish. Ministry of agriculture, fisheries and food, Torry research station. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). TORRY ADVISORY NOTE No. 82. Available at: <http://www.fao.org/3/x5953e/x5953e00.htm#Contents>

Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International journal of food microbiology*, 23(3-4), 277-294.

Bayles, D. O., Annous, B. A., & Wilkinson, B. J. (1996). Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(3), 1116-1119.

Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1), 1-20.

Beaufort, A., Bergis, H., Lardeux, A. L., Polet, M., Botteldoorn, N., Papageorgiou, G., ... & Prencipe, V. (2014). Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *EURL Lm Tech. Guid. Doc. European Union Reference Laboratory for Listeria monocytogenes*, 1-47.

Behari, J., & Youngman, P. (1998). Regulation of hly Expression in *Listeria monocytogenes* by Carbon Sources and pH Occurs through Separate Mechanisms Mediated by PrfA. *Infection and immunity*, 66(8), 3635-3642.

Belessi, C. E. A., Gounadaki, A. S., Psomas, A. N., & Skandamis, P. N. (2011a). Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 145, S46-S52.

Belessi, C. I., Le Marc, Y., Merkouri, S. I., Gounadaki, A. S., Schwartzman, S., Jordan, K., ... & Skandamis, P. N. (2011b). Adaptive growth responses of *Listeria monocytogenes* to acid and osmotic shifts above and across the growth boundaries. *Journal of food protection*, 74(1), 78-85.

Bergholz, T. M., den Bakker, H. C., Fortes, E. D., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2010). Salt stress phenotypes in *Listeria monocytogenes* vary by genetic lineage and temperature. *Foodborne pathogens and disease*, 7(12), 1537-1549.

Berk, Z. (2018). Spoilage and preservation of foods. In *Food process engineering and technology* (pp. 395-398). Elsevier. Academic press. London. UK.

Berrang, M. E., Meinersmann, R. J., Frank, J. F., Smith, D. P., & Genzlinger, L. L. (2005). Distribution of *Listeria monocytogenes* subtypes within a poultry further processing plant. *Journal of food protection*, 68(5), 980-985.

Berrang, M. E., Frank, J. F., & Meinersmann, R. J. (2010). *Listeria monocytogenes* biofilm formation on silver ion impregnated cutting boards. *Food protection trends*, 30(3), 168-171.

Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M. R., Haug, M. C., Lawson, P. A., Lacroix, C., & Meile, L. (2013). *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(2), 526-532.

Blackburn, CdeW., 2006. Introduction. In: Blackburn, C. deW. (Ed.), *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead, Cambridge, pp. xvii\_xxiii.

Blackman, I. C., & Frank, J. F. (1996). Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection*, 59(8), 827-831.

Blanco-Lizarazo, C. M., Sotelo-Díaz, I., & Llorente-Bousquets, A. (2016). In vitro modelling of simultaneous interactions of *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sakei*, and *Staphylococcus carnosus*. *Food science and biotechnology*, 25(1), 341-348.

Blickstad, E., Molin, G., 1983. The microbial flora of smoked pork loin and frankfurter sausage stored in different gas atmospheres at 4 °C. *J. Appl. Bacteriol.* 54, 45-56.

Bobori, D. C., & Economidis, P. S. (2006). Freshwater fishes of Greece: their biodiversity, fisheries and habitats. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 9(4), 407-418.

Bolocan, A. S., Nicolau, A. I., Alvarez-Ordóñez, A., Borda, D., Oniciuc, E. A., Stessl, B., ... & Jordan, K. (2016). Dynamics of *Listeria monocytogenes* colonisation in a newly-opened meat processing facility. *Meat science*, 113, 26-34.

Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Júnior, A. F., Júnior, J. A., Tsunemi, M. H., & Rall, V. L. M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food control*, 35(1), 386-391.

Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., & Call, D. R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12), 7336-7342.

Bower, C. K., & Daeschel, M. A. (1999). Resistance responses of microorganisms in food environments. *International journal of food microbiology*, 50(1-2), 33-44.

Bowman, J. P., Bittencourt, C. R., & Ross, T. (2008). Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology*, 154(2), 462-475.

Boyle, D. L., Sofos, J. N., & Maga, J. A. (1988). Inhibition of spoilage and pathogenic microorganisms by liquid smoke from various woods. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 21, 54–58.

Boziaris, I. S., Stamatiou, A. P., & Nychas, G. J. E. (2013). Microbiological aspects and shelf life of processed seafood products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(5), 1184-1190.

Boziaris, I. S., & Parlapani, F. F. (2017). Specific spoilage organisms (SSOs) in fish. In *The microbiological quality of food* (pp. 61-98). Woodhead Publishing.

Brackett, R. E., & Beuchat, L. R. (1989). Methods and media for the isolation and cultivation of *Listeria monocytogenes* from various foods. *International journal of food microbiology*, 8(3), 219-223.

Breidt, F., & Fleming, H. P. (1998). Modeling of the Competitive Growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in Vegetable Broth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(9), 3159-3165.

Bright, J. J., Claydon, M. A., Soufian, M., & Gordon, D. B. (2002). Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *Journal of microbiological methods*, 48(2-3), 127-138.



Brooks, J. D., & Flint, S. H. (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International journal of food science & technology*, 43(12), 2163-2176.

Bryers, J. D., & Biofilms, I. I. (2000). Process analysis and applications. *Biofilms II*.

Buchanan, R. L., & Bagi, L. K. (1997). Microbial competition: effect of culture conditions on the suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A by *Carnobacterium piscicola*. *Journal of food protection*, 60(3), 254-261.

Buchanan, R. L., & Bagi, L. K. (1999). Microbial competition: effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 16(5), 523-529.

Bucur, F. I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C. U., & Nicolau, A. I. (2018). Resistance of *Listeria monocytogenes* to Stress Conditions Encountered in Food and Food Processing Environments. *Frontiers in Microbiology*, 9.

Bulut, S., (2014a). The Effects of High-Pressure Processing at Low and Subzero Temperatures on Inactivation of Microorganisms in Frozen and Unfrozen Beef Mince Inoculated with *Escherichia coli* Strain ATCC 25922. *Food and Bioprocess Technology* 7, 3033-3044.

Bulut, S. (2014b). Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high pressure processing at low and subzero temperatures, *High Pressure Research: An International Journal*, 34:4, 439-446.

Bunning, V. K., Crawford, R. G., Tierney, J. T., Peeler, J. T. (1990). Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat shock. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3216- 3219.

Burgess, G., & Shewan, J. (2016). Torry Research Station, Ministry of Technology, Aberdeen. *Proteins as Human Food: Proceedings of the Sixteenth Easter School in Agricultural Science, University of Nottingham, 1969*, 186.

Burgess, C. M., Gianotti, A., Gruzdev, N., Holah, J., Knöchel, S., Lehner, A., ... & Tresse, O. (2016). The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 221, 37-53.

Busch, S. V., Donnelly, C. W. (1992). Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 14–20.

Bykowski, P., & Dutkiewicz, D. (1996). Freshwater fish processing and equipment in small plants. *FAO Fisheries Circular (FAO)*.

Böhme, K., Fernández-No, I. C., Barros-Velázquez, J., Gallardo, J. M., Calo-Mata, P., & Canas, B. (2010). Species differentiation of seafood spoilage and pathogenic gram-

negative bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Journal of proteome research*, 9(6), 3169-3183.

Böhme, K., Fernández-No, I. C., Barros-Velázquez, J., Gallardo, J. M., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2011). Rapid species identification of seafood spoilage and pathogenic Gram-positive bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 32(21), 2951-2965.

Cacace, G., Mazzeo, M. F., Sorrentino, A., Spada, V., Malorni, A., & Siciliano, R. A. (2010). Proteomics for the elucidation of cold adaptation mechanisms in *Listeria monocytogenes*. *Journal of proteomics*, 73(10), 2021-2030.

Cakli, S., Kilinc, B., Dincer, T., & Tolasa, S. (2006). Comparison of the shelf lives of map and vacuum packaged hot smoked rainbow trout (*Onchoryncus mykiss*). *European Food Research and Technology*, 224(1), 19-26.

Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., de Miguel, T., Pascoal, A., & Barros-Velazquez, J. (2008). Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 43-63.

Campos, C. A., Gliemmo, M. F., & Castro, M. P. (2014). Strategies for Controlling the Growth of Spoilage Yeasts in Foods. In *Microbial Food Safety and Preservation Techniques* (pp. 516-531). CRC Press.

Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., & Alonso-Calleja, C. (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Appl. Environ. Microbiol.*, *80*(4), 1268-1280.

Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International journal of food microbiology*, *145*(1), 1-8.

Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., & Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, *79*(3), 483-499.

Chaitiemwong, N., Hazeleger, W. C., & Beumer, R. R. (2010). Survival of *Listeria monocytogenes* on a conveyor belt material with or without antimicrobial additives. *International journal of food microbiology*, *142*(1-2), 260-263.

Champomier-Vergès, M. C., Chaillou, S., Cornet, M., & Zagorec, M. (2001). *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects. *Research in Microbiology*, *152*(10), 839-848.

Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M. N., & Hebraud, M. (2002). *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Appl. Environ. Microbiol.*, *68*(2), 728-737.

Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., & Hébraud, M. (2004). Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. *FEMS Microbiology Letters*, 236(2), 241-248.

Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1), 22-32.

Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2004). A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on stainless steel. *Journal of food protection*, 67(12), 2712-2718.

Choi, M. J., Min, S. G., & Hong, G. P. (2008). Effect of high-pressure shift freezing process on microbial inactivation in dairy model food system. *International journal of food engineering*, 4(5).

Choi, M. J., Jackson, K. A., Medus, C., Beal, J., Rigdon, C. E., Cloyd, T. C., ... & Cantu, V. (2014). Multistate outbreak of listeriosis linked to soft-ripened cheese—United States, 2013. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 63(13), 294.

Christensen, H., Boye, M., Poulsen, L. K., & Rasmussen, O. F. (1994). Analysis of fluorescent pseudomonads based on 23S ribosomal DNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(6), 2196-2199.

Civera, T., Amerio, G., & Parisi, E. (1993). Shelf-life of sliced smoked-salmon packaged with different modified atmospheres. *Industrie Alimentari (Italy)*.

Codex Standards (1969) Codex standards for methods of analysis and sampling, 'Sampling Plans for Prepackaged Foods (AQL 6.5)', XPT 13-1969, Rome, FAO/WHO Codex Alimentarius.

Codex Standards (1999) Codex standards for fish and fishery product, 'Guidelines for the sensory evaluation of fish and shellfish in laboratories', CAC-GL 31-1999, Rome, FAO/WHO Codex Alimentarius.

Cole, M. B., Davies, K. W., Munro, G., Holyoak, C. D., & Kilsby, D. C. (1993). A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Industrial Microbiology*, 12(3-5), 232-239.

Comi, G., Iacumin, L., 2012. Meat and fish products. In: Gobetti, G., Vincenzini, M., Farris, G.A., Neviani, E. (Eds.), *Food Microbiology*. Ambrosiana Editrice, Milano, Italy, pp. 153-196.

Comi, G. (2017). Spoilage of meat and fish. In *The Microbiological Quality of Food* (pp. 179-210). Woodhead Publishing.

Cordero, N., Maza, F., Navea-Perez, H., Aravena, A., Marquez-Fontt, B., Navarrete, P., ... & Reyes-Jara, A. (2016). Different transcriptional responses from slow and fast

growth rate strains of *Listeria monocytogenes* adapted to low temperature. *Frontiers in microbiology*, 7, 229.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual review of microbiology*, 49(1), 711-745.

Cronan Jr, J. E. (2002). Phospholipid modifications in bacteria. *Current opinion in microbiology*, 5(2), 202-205.

Curtis, G. D. W., Mitchell, R. G., King, A. F., & Griffin, E. J. (1989). A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Letters in applied microbiology*, 8(3), 95-98.

Czaczyk, K., & Myszka, K. (2007). Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(6).

Da Silva, E. P., & De Martinis, E. C. P. (2013). Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), 957-968.

de Oliveira, M. M. M., Brugnera, D. F., das Graças Cardoso, M., Alves, E., & Piccoli, R. H. (2010). Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*, 21(4), 549-553.

de Oliveira, M. M. M., Brugnera, D. F., do Nascimento, J. A., Batista, N. N., & Piccoli, R. H. (2012). Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. *European Food Research and Technology*, 234(5), 821-832.

Das, S., Lalitha, K. V., Joseph, G., Kamalakanth, C. K., & Bindu, J. (2016). High pressure destruction kinetics along with combined effect of potassium sorbate and high pressure against *Listeria monocytogenes* in Indian white prawn muscle. *Annals of microbiology*, 66(1), 245-251.

Dalgaard, P. (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International journal of food microbiology*, 26(3), 319-333.

Dallmier, A.W., Martin, S.E. (1990). Catalase, superoxide dismutase, and hemolysin activities and heat susceptibility of *Listeria monocytogenes* after growth in media containing sodium chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2807-2810.

Dare, D. (2006). Rapid bacterial characterization and identification by MALDI-TOF mass spectrometry. In *Advanced techniques in diagnostic microbiology* (pp. 117-133). Springer, Boston, MA.

Davidson, P. M. (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food technology*, 43, 148-155.



Davidson, P. M., Critzer, F. J., & Taylor, T. M. (2013). Naturally occurring antimicrobials for minimally processed foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 163-190.

Delboni, R. R., & Yang, H. M. (2017). Mathematical model of interaction between bacteriocin-producing lactic acid bacteria and listeria. part 2: Bifurcations and applications. *Bulletin of mathematical biology*, 79(10), 2273-2301.

Delignette-Muller, M. L., Cornu, M., Pouillot, R., & Denis, J. B. (2006). Use of bayesian modelling in risk assessment: application to growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in cold-smoked salmon. *International journal of food microbiology*, 106(2), 195-208.

den Bakker, H. C., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S., ... & Fortes, E. (2014). *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(6), 1882-1889.

Devlieghere, F., Geeraerd, A. H., Versyck, K. J., Vandewaetere, B., Van Impe, J., & Debevere, J. (2001). Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiology*, 18(1), 53-66.

Dimitriadou, D., Zotos, A., Petridis, D., & Taylor, A. K. D. (2008). Improvement in the production of smoked trout fillets (*Salmo gairdnerii*) steamed with liquid smoke. *Food Science and Technology International*, *14*(1), 67-77.

Dorsa, W. J., Cutter, C. N., & Siragusa, G. R. (1997). Effects of acetic acid, lactic acid and trisodium phosphate on the microflora of refrigerated beef carcass surface tissue inoculated with *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria innocua*, and *Clostridium sporogenes*. *Journal of Food Protection*, *60*(6), 619-624.

Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, *42*(8), 3819-3822.

Doyle, M. E., Mazzotta, A. S., Wang, T., Wiseman, D. W., & Scott, V. N. (2001). Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*, *64*(3), 410-429.

Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. (Eds.), 1997. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, *ASM Press*, Washington D.C., p. 94.

Duché, O., Trémoulet, F., Glaser, P., & Labadie, J. (2002). Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *68*(4), 1491-1498.

Durack, J., Ross, T., & Bowman, J. P. (2013). Characterisation of the transcriptomes of genetically diverse *Listeria monocytogenes* exposed to hyperosmotic and low

temperature conditions reveal global stress-adaptation mechanisms. *PLoS One*, 8(9), e73603.

Dykes, G. A. (1999). Physical and metabolic causes of sub-lethal damage in *Listeria monocytogenes* after long-term chilled storage at 4 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 915–922.

El-Kest, S. E., & Marth, E. H. (1991). Strains and suspending menstrua as factors affecting death and injury of *Listeria monocytogenes* during freezing and frozen storage. *Journal of dairy science*, 74(4), 1209-1213.

El-Shenawy, M. A., Yousef, A. E., & Marth, E. H. (1989). Thermal inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* in reconstituted nonfat dry milk. *Milchwissenschaft*, 44(12), 741-745.

Elamin, W. M., Endan, J. B., Yosuf, Y. A., Shamsudin, R., & Ahmedov, A. (2015). High Pressure Processing Technology and Equipment Evolution: A Review. *Journal of Engineering Science & Technology Review*, 8(5).

Ellouze, M., Gauchi, J. P., & Augustin, J. C. (2011). Use of global sensitivity analysis in quantitative microbial risk assessment: Application to the evaluation of a biological time temperature integrator as a quality and safety indicator for cold smoked salmon. *Food microbiology*, 28(4), 755-769.

Ells, T. C., Speers, R. A., & Hansen, L. T. (2009). Insertional mutagenesis of *Listeria monocytogenes* 568 reveals genes that contribute to enhanced thermotolerance. *International journal of food microbiology*, *136*(1), 1-9.

Ercolini, D., Ferrocino, I., Nasi, A., Ndagijimana, M., Vernocchi, P., La Stora, A., ... & Villani, F. (2011). Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored under different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, *77*(20), 7372-7381.

Erkan, N., TOSUN, Ş. Y., Alakavuk, D. U., & ULUSOY, Ş. (2009). Keeping quality of different packaged salted atlantic bonito “lakerda”. *Journal of Food Biochemistry*, *33*(5), 728-744.

Erkan, N., Alpas, H., Üretener, G., Selcuk, A., Buzrul, S. (2010). Changes in the physicochemical properties of high pressure treated rainbow trout. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, *61*(5), 183-188.

Erkan, N., Üretener, G., Alpas, H., Selçuk, A., Özden, Ö., & Buzrul, S. (2011). The effect of different high-pressure conditions on the quality and shelf life of cold smoked fish. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *12*(2), 104-110.

EUMOFA. (2017). EU consumer habits regarding fishery and aquaculture products. Final report. *European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products*.

European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2018). Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IV b, multi-locus sequence type 6, infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables—first update. *EFSA Supporting Publications*, 15(7), 1448E.

European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2012). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 10:2597.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and European Food Safety Authority (EFSA). (2017). Joint ECDC-EFSA Rapid Outbreak Assessment - Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6, infections probably linked to frozen corn. Stockholm: ECDC.

European Centre for Disease Prevention and Control. (ECDC). (2016). Annual Epidemiological Report 2016 – Listeriosis. Stockholm. Διαθέσιμο από: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/listeriosis-annual-epidemiological-report-2016-2014-data>. Πρόσβαση: 17/07/2019.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and European Food Safety Authority (EFSA). (2018). Joint ECDC-EFSA Rapid Outbreak Assessment - Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus

sequence type 6, infections probably linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables – first update.

European Centre for Disease Prevention and Control. (ECDC). (2016). Annual Epidemiological Report 2016 – Listeriosis. Stockholm. Διαθέσιμο από: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/listeriosis-annual-epidemiological-report-2016-2014-data>. Πρόσβαση: 17/07/2019.

European Food Safety Authority (EFSA). (2007). Findings of the efsa data collection on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. *Efsa Journal*, 5(9), 33r.

European Commission (EC) (2014). EURL Lm technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Διαθέσιμο από: [http://www.fsai.ie/uploadedFiles/EURL%20Lm\\_Technical%20Guidance%20Document%20Lm%20shelf-life%20studies\\_V3\\_2014-06-06%20\(2\).pdf](http://www.fsai.ie/uploadedFiles/EURL%20Lm_Technical%20Guidance%20Document%20Lm%20shelf-life%20studies_V3_2014-06-06%20(2).pdf). Πρόσβαση: 30/08/2019.

European Food Safety Authority (EFSA). (2007). Findings of the efsa data collection on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. *EFSA Journal*, 5(9), 33r.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9, 1 – 7.

European Union. (2005). Commission Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 338, 1-26.

Evans, J. A. (Ed.). (2009). *Frozen food science and technology*. John Wiley & Sons.

Evert-Arriagada, K., Trujillo, A. J., Amador-Espejo, G. G., & Hernández-Herrero, M. M. (2018). High pressure processing effect on different *Listeria* spp. in a commercial starter-free fresh cheese. *Food microbiology*, 76, 481-486.

Eylert, E., Schär, J., Mertins, S., Stoll, R., Bacher, A., Goebel, W., & Eisenreich, W. (2008). Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. *Molecular microbiology*, 69(4), 1008-1017.

Farber, J. M., Brown, B. E. (1990). Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1584-1587.

Farber, J. M. (1991). Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology-a review. *Journal of food protection*, 54(1), 58-70.

Fasano, E., Yebra-Pimentel, I., Martínez-Carballo, E., & Simal-Gándara, J. (2016). Profiling, distribution and levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in traditional smoked plant and animal foods. *Food Control*, 59, 581-590.

Fernández-No, I. C., Böhme, K., Gallardo, J. M., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2010). Differential characterization of biogenic amine-producing bacteria involved in food poisoning using MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, *31*(6), 1116-1127.

Fernández, P. P., Sanz, P. D., Molina-García, A. D., Otero, L., Guignon, B., & Vaudagna, S. R. (2007). Conventional freezing plus high pressure–low temperature treatment: Physical properties, microbial quality and storage stability of beef meat. *Meat Science*, *77*(4), 616-625.

Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of food protection*, *77*(1), 150-170.

Fıçıcılar, B. B., & Gencelep, H. (2017). A Characterization Study of Hot Smoked Rainbow Trout for Each Production Stages.

Fleet GH (1990) Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* 68:199–221.

Fleet, G. (2006). The commercial and community significance of yeasts in food and beverage production. In *Yeasts in food and beverages* (pp. 1-12). Springer, Berlin, Heidelberg.



Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAO). (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016 (SOFIA): Contributing to food security and nutrition for all, Rome: Food and Agriculture Organization, pp. 55.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAO). (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018-Meeting the sustainable development goals.

Food and Drug Administration. (FDA). (2000). Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. *FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition report—A report of the IFT for the FDA of the US Department of Health and Human Services. June 2.*

Food and Drug Administration. (FDA). (2001). *Clostridium botulinum* toxin formation. Ch. 13. In *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*, 3rd ed., p. 167-190. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, Washington, DC.

Food and Drug Administration. (FDA). (2013). Recalls, Market Withdrawals, & Safety Alerts. Διαθέσιμο από: <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm333681.htm>. Πρόσβαση 28/07/2019.

Fox, E., Hunt, K., O'Brien, M., & Jordan, K. (2011). *Listeria monocytogenes* in Irish farmhouse cheese processing environments. *International journal of food microbiology*, 145, S39-S45.

Francolini, I., & Donelli, G. (2010). Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3), 227-238.

Frank, J. F., & Koffi, R. A. (1990). Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of food protection*, 53(7), 550-554.

Freiwald, A., & Sauer, S. (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature protocols*, 4(5), 732.

Friedman, M., & Juneja, V. K. (2010). Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food. *Journal of Food Protection*, 73(9), 1737-1761.

Fröhlich-Wyder, M. T. (2003). Yeasts in dairy products. In *Yeasts in food* (pp. 209-237). Woodhead Publishing.

Fuselli, S. R., Casales, M. R., Fritz, R., & Yeannes, M. I. (1998). Isolation and characterization of microorganisms associated with marinated anchovy (*Engraulis anchoitid*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 7(3), 29-38.

Gahan, C. G., & Hill, C. (2014). *Listeria monocytogenes*: survival and adaptation in the gastrointestinal tract. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 9.

Garber, L.L., Jr., Hyatt, E.M., & Starr, R.G., Jr. (2003). Measuring consumer response to food products. *Food Quality and Preference*, 14(1), 3–15.

Garver, K. I., & Muriana, P. M. (1994). Purification and partial amino acid sequence of curvaticin FS47, a heat-stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(6), 2191-2195.

Gedela, S., Escoubas, J. R., & Muriana, P. M. (2007). Effect of inhibitory liquid smoke fractions on *Listeria monocytogenes* during long-term storage of frankfurters. *Journal of Food Protection*, 70, 386–391.

Goerges, S., Aigner, U., Silakowski, B., & Scherer, S. (2006). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(1), 313-318.

Georget, E., Sevenich, R., Reineke, K., Mathys, A., Heinz, V., Callanan, M., ... & Knorr, D. (2015). Inactivation of microorganisms by high isostatic pressure processing in complex matrices: a review. *Innovative food science & emerging technologies*, 27, 1-14.

Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Skandamis, P., & Nychas, G. J. (2012). Attachment and biofilm formation by *Salmonella* in food processing environments. *Salmonella: A dangerous foodborne pathogen*, 157-180.

Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hebraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., ... & Ölmez, H. (2015). Intra-and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*, 6, 841.

Giebel, R., Worden, C., Rust, S. M., Kleinheinz, G. T., Robbins, M., & Sandrin, T. R. (2010). Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): applications and challenges. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 71, pp. 149-184). Academic Press.

Gill, C.D., Molin, G., 1991. Modified atmospheres and vacuum packaging. In: Rusell, N.J., Gould, G.W. (Eds.), *Food Preservatives*. Blackie, Glasgow, pp. 172-199.

Gimenez, B., & Dalgaard, P. (2004). Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. *Journal of applied microbiology*, 96(1), 96-109.

Gökoğlu, N., Cengiz, E., & Yerlikaya, P. (2004). Determination of the shelf life of marinated sardine (*Sardina pilchardus*) stored at 4 C. *Food control*, 15(1), 1-4.

Golden, D. A., Beuchat, L. R., & Brackett, R. E. (1988). Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. *Food Microbiology*, 5(1), 17-23.

Gomaa, E. A., Gray, J. I., Rabie, S., Lopez-Bote, C., & Booren, A. M. (1993). Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings. *Food Additives & Contaminants*, 10(5), 503-521.

Gomez, D., Azon, E., Marco, N., Carraminana, J.J., Rota, C., Arino, A., Yanguela, J., 2014. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiol.* 42, 61–65.

Gram, L., Trolle, G., & Huss, H. H. (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 C) and high (20 C) temperatures. *International journal of food microbiology*, 4(1), 65-72.

Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International journal of food microbiology*, 33(1), 121-137.

Gram, L., & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria—problems and solutions. *Current opinion in biotechnology*, 13(3), 262-266.

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International journal of food microbiology*, 78(1-2), 79-97.

Gram, L. (2005). Microbiological food spoilage, in *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*, ed. by Hui YH. Taylor and Francis/CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 51-1–51-16.

Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y. Y., Gyomai, P., & Vogel, B. F. (2007). Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food control*, *18*(10), 1165-1171.

Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., ... & Wiedmann, M. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *60*(6), 1280-1288.

Griffiths, M. W. (2003). *Listeria*, properties and occurrence. Encyclopedia of food sciences and nutrition, edited by Caballero B, Trugo LC, Finglas, 3562-3581, vol. 6.

Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., & Loessner, M. J. (2009). Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, *75*(1), 93-100.

Guillén, M. D., Errecalde, M. C., Salmerón, J., & Casas, C. (2006). Headspace volatile components of smoked swordfish (*Xiphias gladius*) and cod (*Gadus morhua*) detected by means of solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, *94*(1), 151-156.

Guillier, L., Stahl, V., Hezard, B., Notz, E., & Briandet, R. (2008). Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *International journal of food microbiology*, *128*(1), 51-57.

Gänzle, M. G., Weber, S., & Hammes, W. P. (1999). Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, 46(3), 207-217.

Hadjilouka, A., Andritsos, N. D., Paramithiotis, S., Mataragas, M., & Drosinos, E. H. (2014). *Listeria monocytogenes* serotype prevalence and biodiversity in diverse food products. *Journal of food protection*, 77(12), 2115-2120.

Halter, E. L., Neuhaus, K., & Scherer, S. (2013). *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(2), 641-647.

Hammami, I., Rhouma, A., Jaouadi, B., Rebai, A., & Nesme, X. (2009). Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. *Letters in applied microbiology*, 48(2), 253-260.

Handa, S., Kimura, B., Takahashi, H., Koda, T., Hisa, K., & Fujii, T. (2005). Incidence of *Listeria monocytogenes* in raw seafood products in Japanese retail stores. *Journal of food protection*, 68(2), 411-415.

Handley, P. S., Busscher, H. J., & Rouxhet, P. G. (1991). *Microbial cell surface analysis: structural and physicochemical methods*. N. Mozes (Ed.). New York: Vch.

Hansen, L. T., Gill, T., & Husa, H. H. (1995). Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon. *Food Research International*, 28(2), 123-130.

Hansen, L. T., Røntved, S. D., & Huss, H. H. (1998). Microbiological quality and shelf life of cold-smoked salmon from three different processing plants. *Food Microbiology*, 15(2), 137-150.

Haruta, S., Kato, S., Yamamoto, K., & Igarashi, Y. (2009). Intertwined interspecies relationships: approaches to untangle the microbial network. *Environmental microbiology*, 11(12), 2963-2969.

Harvey, J., Keenan, K. P., & Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24(4), 380-392.

Harwood VJ, Brownell M, Perusek W, Whitlock JE, (2001). Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and chicken feces in the United States. *Appl Environ Microbiol.* 67, 4930-4933.

Hattula, T., Elfving, K., Mroueh, U. M., & Luoma, T. (2001). Use of liquid smoke flavouring as an alternative to traditional flue gas smoking of rainbow trout fillets (*Oncorhynchus mykiss*). *LWT-Food Science and Technology*, 34(8), 521-525.

Hegde, V., Leon-Velarde, C. G., Stam, C. M., Jaykus, L. A., & Odumeru, J. A. (2007). Evaluation of BBL CHROMagar *Listeria* agar for the isolation and



identification of *Listeria monocytogenes* from food and environmental samples. *Journal of microbiological methods*, 68(1), 82-87.

Heir, E., Møretrø, T., Simensen, A., & Langsrud, S. (2018). *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. *International journal of food microbiology*, 275, 46-55.

Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T., & Bover-Cid, S. (2012). Modeling the high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 305-315.

Heymann, D. L. (2008). *Control of communicable diseases manual* (No. Ed. 19). American Public Health Association.

Hilderbrand, K. S. (1997). *Hot Smoked Fish Company HACCP Plan*. OSU Extension Sea Grant Program.

Hill, C., Cotter, P. D., Sleator, R. D., & Gahan, C. G. (2002). Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 273-283.

Hitchins, A.D., Jinneman, K., Chen, Y., 2016. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (Chapter 10).

Hokkanen, M., Luhtasela, U., Kostamo, P., Ritvanen, T., Peltonen, K., & Jestoi, M. (2018). Critical effects of smoking parameters on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in traditionally smoked fish and meat products in Finland. *Journal of Chemistry*, 2018.

Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food microbiology*, 22(4), 273-292.

Howell, K., (2016). Spoilage: yeast spoilage of food and beverages. In: Caballero, B., Finglas, P.M., Toldra', F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*, vol. 5. Academic Press, Oxford, pp. 113117.

Huang, H. W., Lung, H. M., Yang, B. B., & Wang, C. Y. (2014). Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control*, 40, 250-259.

Huang, L. (2004). Thermal resistance of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Heidelberg, and *Escherichia coli* O157: H7 at elevated temperatures. *Journal of food protection*, 67(8), 1666-1670.

Huss, H.H., 1988. Fresh fish - quality and quality changes in. In: Huss, H.H. (Ed.),

Huss, H. H. (Ed.). (1995). *Quality and quality changes in fresh fish* (Vol. 348). Rome: FAO.

Huss, H.H., Reilly, A. & Ben Embarek, P.K. 2000. Prevention and control of hazards in seafoods. *Food Control*, 11, 149-156.

International Organization of the Flavor Industry. IOFI. (2012). IOFI guidelines for the preparation of smoke flavourings. Section 15 of IOFI code of practice. Update version 1.3.

in't Veld, J. H. H. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International journal of food microbiology*, 33(1), 1-18.

Jay, J. M. (1986). Determining microorganisms and their products in foods. *Modern food microbiology*. Van Nostrand Reinhold Co., Inc., New York, 97-127.

Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). Indicators of food microbial quality and safety. *Modern food microbiology*, 473-495.

Jemmi, T., & Keusch, A. (1992). Behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage of experimentally contaminated hot-smoked trout. *International journal of food microbiology*, 15(3-4), 339-346.

Jenkinson, H. F., & Lappin-Scott, H. M. (2001). Biofilms adhere to stay. *TRENDS in Microbiology*, 9(1), 9-10.

Jiang, Z., Neetoo, H., & Chen, H. (2011). Efficacy of freezing, frozen storage and edible antimicrobial coatings used in combination for control of *Listeria monocytogenes* on roasted turkey stored at chiller temperatures. *Food microbiology*, 28(7), 1394-1401.

Joffraud, J. J., Leroi, F., Roy, C., & Berdague, J. L. (2001). Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International journal of food microbiology*, 66(3), 175-184.

Jones, G. S., & D'Orazio, S. E. (2013). *Listeria monocytogenes*: cultivation and laboratory maintenance. *Current protocols in microbiology*, 31(1), 9B-2.

Jordan, K., & McAuliffe, O. (2018). *Listeria monocytogenes* in Foods. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 86, pp. 181-213). Academic Press.

Jorgensen, F. Stephens, P.J. Knochel, S. (1995). The effect of osmotic shock, and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 274-81.

Juneja, V., Novak, J. (2005). Pathogen resistance and adaptation to heat stress. In: Griffiths M. (Ed), *Understanding Pathogen Behaviour*. Woodhead Publishing in Food Science and Technology, CRC Press, New York, Pages 422-441.

Juneja, V. K., & Novak, J. S. (2003). Adaptation of foodborne pathogens to stress from exposure to physical intervention strategies. *Microbial stress adaptation and food safety*, 159-211.

Juneja, V. K., Novak, J. S., & Sapers, G. M. (2002). *Microbial safety of minimally processed foods*. CRC press.

Jung, L. S., Lee, S. H., Kim, S., Cho, Y., & Ahn, J. (2014). Effect of High-Pressure Post-Packaging Pasteurization on Microbiological Quality of Ready-to-Use Vegetables. *Journal of food processing and preservation*, 38(1), 406-412.

Karatzas, K. A., & Bennik, M. H. (2002). Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(7), 3183-3189.

Karaçam, H., Kutlu, S., & Köse, S. (2002). Effect of salt concentrations and temperature on the quality and shelf-life of brined anchovies. *International journal of food science & technology*, 37(1), 19-28.

Karyotis, D., Skandamis, P. N., & Juneja, V. K. (2017). Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in sous-vide processed marinated chicken breast. *Food research international*, 100, 894-898.

Keskinen, L. A., Todd, E. C., & Ryser, E. T. (2008). Impact of bacterial stress and biofilm-forming ability on transfer of surface-dried *Listeria monocytogenes* during

slicing of delicatessen meats. *International journal of food microbiology*, 127(3), 298-304.

Khan, I., Tango, C. N., Miskeen, S., Lee, B. H., & Oh, D. H. (2017). Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety—A review. *Food Control*, 73, 1426-1444.

Kilinc, B., & Cakli, S. (2005). The determination of the shelf-life of pasteurized and non-pasteurized sardine (*Sardina pilchardus*) marinades stored at 4° C. *International journal of food science & technology*, 40(3), 265-271.

Kim, S. P., Kang, M. Y., Park, J. C., Nam, S. H., & Friedman, M. (2012). Rice hull smoke extract inactivates *Salmonella Typhimurium* in laboratory media and protects infected mice against mortality. *Journal of Food Science*, 71, M80–M85.

Kivanç, M., Akgül, A., & Doğan, A. (1991). Inhibitory and stimulatory effects of cumin, oregano and their essential oils on growth and acid production of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. *International journal of food microbiology*, 13(1), 81-85.

Knorr, D., Schlueter, O., Heinz, V. (1998). Impact of high hydrostatic pressure on phase transitions of foods. *Food Technol.* 52, 42-45.

Ko, R., & Smith, L. T. (1999). Identification of an ATP-driven, osmoregulated glycine betaine transport system in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(9), 4040-4048.

Komora, N., Bruschi, C., Magalhães, R., Ferreira, V., Teixeira, P. (2017). Survival of *Listeria monocytogenes* with different antibiotic resistance patterns to food-associated stresses. *International Journal of Food Microbiology*, 245. 79–87.

Korkeala, H., Stengel, G., Hyytiä, E., Vogelsang, B., Bohl, A., Wihlman, H., ... & Hielm, S. (1998). Type E botulism associated with vacuum-packaged hot-smoked whitefish. *International journal of food microbiology*, 43(1-2), 1-5.

Korkeala, H., Alanko, T., Mäkelä, P., & Lindroth, S. (1989). Shelf-life of vacuum-packed cooked ring sausages at different chill temperatures. *International journal of food microbiology*, 9(3), 237-247.

Kostaki, M., Chorianopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G. J., & Giaouris, E. (2012). Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(8), 2586-2595.

Koutchma, T. (2014). Emerged HPP Commercial Applications. In: Koutchma, T. (Ed.), *Adapting High Hydrostatic Pressure (HPP) for Food Processing Operations*. Elsevier, Pages 29-33.

Koutsoumanis, K. P., Sofos, J. N. (2004). Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* after habituation at different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 38(4), 321-326.

Kramer, B., & Thielmann, J. (2016). Monitoring the live to dead transition of bacteria during thermal stress by a multi-method approach. *Journal of microbiological methods*, 123, 24-30.

Krüger, E., Zühlke, D., Witt, E., Ludwig, H., & Hecker, M. (2001). Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. *The EMBO Journal*, 20(4), 852-863.

Lasa, I. (2006). Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development.

Laubacher, M. E., & Ades, S. E. (2008). The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 190(6), 2065–2074.

Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Tessaud-Rita, N., Aguilhon, C., & Lecuit, M. (2019). *Listeria thailandensis* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(1), 74-81.



Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A., Le Fleche-Mateos, A., Roche, S. M., ... & Allerberger, F. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(9), 2210-2214.

Ledford, C. D. (1981). *U.S. Patent No. 4,298,435*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Leistner, L. (1995). Principles and applications of hurdle technology. In *New methods of food preservation* (pp. 1-21). Springer, Boston, MA.

Leong, D., NicAogáin, K., Luque-Sastre, L., McManamon, O., Hunt, K., Alvarez-Ordóñez, A., ... & Jordan, K. (2017). A 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland. *International journal of food microbiology*, 249, 18-26.

Leriche, V., & Carpentier, B. (2000). Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of applied microbiology*, 88(4), 594-605.

Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F., & Cardinal, M. (2001). Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 578-587.

Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F., & Cardinal, M. (1998). Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 C. *International journal of food microbiology*, 39(1-2), 111-121.

Leroi, F., Joffraud, J. J., & Chevalier, F. (2000). Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold-smoked salmon during storage at 5 C as estimated by the factorial design method. *Journal of food protection*, 63(4), 502-508.

Leyer, G. J., Johnson, E. A. (1992). Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2075-2080.

Li, C., Huang, L., & Hwang, C. A. (2017). Effect of temperature and salt on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in salmon roe. *Food control*, 73, 406-410.

Liu, D. (2013). Molecular approaches to the identification of pathogenic and nonpathogenic listeriae. *Microbiology insights*, 6, MBI-S10880.

Liu, S., Graham, J. E., Bigelow, L., Morse, P. D., & Wilkinson, B. J. (2002). Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(4), 1697-1705.

Liao, C. H., & Sapers, G. M. (1999). Influence of soft rot bacteria on growth of *Listeria monocytogenes* on potato tuber slices. *Journal of food protection*, 62(4), 343-348.

Liao, C. H., & Fett, W. F. (2001). Analysis of native microflora and selection of strains antagonistic to human pathogens on fresh produce. *Journal of Food Protection*, *64*(8), 1110-1115.

Liamkaew, R., Thipayarat, A., & Saranak, J. (2014). Listeria detection in microscale solid state inoculation with minimal selective agents. *Food control*, *43*, 183-192.

Lianou, A., & Sofos, J. N. (2007). A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of food protection*, *70*(9), 2172-2198.

Lindström, M., Nevas, M., Hielm, S., Lähteenmäki, L., Peck, M. W., & Korkeala, H. (2003). Thermal inactivation of nonproteolytic *Clostridium botulinum* type E spores in model fish media and in vacuum-packaged hot-smoked fish products. *Appl. Environ. Microbiol.*, *69*(7), 4029-4036.

Lingbeck, J. M., Cordero, P., O'Bryan, C. A., Johnson, M. G., Ricke, S. C., & Crandall, P. G. (2014). Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. *Meat Science*, *97*(2), 197-206.

Lippert, K., & Galinski, E. A. (1992). Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Applied microbiology and biotechnology*, *37*(1), 61-65.

Lou, Y., & Yousef, A. E. (1997). Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(4), 1252-1255.

Lunden, J. M., Miettinen, M. K., Autio, T. J., & Korkeala, H. J. (2000). Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *Journal of food protection*, 63(9), 1204-1207.

Løvdal, T. (2015). The microbiology of cold smoked salmon. *Food Control*, 54, 360-373.

Lücke FK, Hechelmann H (1987) Starter cultures for dry sausages and raw ham. Composition and effect. *Fleischwirtschaft* 67:307–314

Lundén, J., Tolvanen, R., & Korkeala, H. (2008). Acid and heat tolerance of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* food plant strains. *Letters in applied microbiology*, 46(2), 276-280.

Lyhs, U., Björkroth, J., & Korkeala, H. (1999). Characterisation of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout using ribotyping. *International journal of food microbiology*, 52(1-2), 77-84.

Lyhs, U., Korkeala, H., Vandamme, P., & Björkroth, J. (2001a). *Lactobacillus alimentarius*: a specific spoilage organism in marinated herring. *International journal of food microbiology*, 64(3), 355-360.

Lyhs, U., Lahtinen, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Hyytiä-Trees, E., Elfing, K., & Korkeala, H. (2001b). Microbiological quality and shelf-life of vacuum-packaged 'gravad'rainbow trout stored at 3 and 8 C. *International Journal of Food Microbiology*, 70(3), 221-230.

Lyhs, U., Korkeala, H., & Björkroth, J. (2002). Identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged 'gravad'rainbow trout using ribotyping. *International journal of food microbiology*, 72(1-2), 147-153.

Mackey, B. M., Boogard, E., Hayes, C. M., & Baranyi, J. (1994). Recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology*, 22(4), 227-237.

Mai, T. L., & Conner, D. E. (2007). Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *International journal of food microbiology*, 120(3), 282-286.

Makariti, I. P., Printezi, A., Kapetanakou, A. E., Zeaki, N., & Skandamis, P. N. (2015). Investigating boundaries of survival, growth and expression of genes associated with stress and virulence of *Listeria monocytogenes* in response to acid and osmotic stress. *Food microbiology*, 45, 231-244.

Mano, N., & Goto, J. (2003). Biomedical and biological mass spectrometry. *Analytical Sciences*, 19(1), 3-14.

Martins, M. L., Mouriño, J. L. P., Amaral, G. V., Vieira, F. N., Dotta, G., Jatobá, A. M. B., ... & Buglione-Neto, C. C. (2008). Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Brazilian Journal of Biology*, 68(3), 657-661.

Masuda, Y., Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2016). Nutrition-adaptive control of multiple-bacteriocin production by *Weissella hellenica* QU 13. *Journal of applied microbiology*, 120(1), 70-79.

Mataragas, M., Metaxopoulos, J., & Drosinos, E. H. (2002). Characterization of two bacteriocins produced by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442, isolated from dry fermented sausages. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(9), 847-856.

Mazzotta, A. S., & Gombas, D. E. (2001). Heat resistance of an outbreak strain of *Listeria monocytogenes* in hot dog batter. *Journal of food protection*, 64(3), 321-324.

McClain, D., & Lee, W. L. (24). May 1989 revision. FSIS method for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from processed meat and poultry products. Laboratory communication no. 57. *US Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Beltsville, MD*.

McClure, P. J., Roberts, T. A., & Oguru, P. O. (1989). Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. *Letters in Applied Microbiology*, 9(3), 95-99.

McCollum, J. T., Cronquist, A. B., Silk, B. J., Jackson, K. A., O'connor, K. A., Cosgrove, S., ... & Ibraheem, M. (2013). Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe. *New England Journal of Medicine*, 369(10), 944-953.

McDonald, S. T. (2015). Comparison of Health Risks of Smoked Foods as Compared to Smoke Flavorings: Are Smoke Flavors "Healthier"? *Advances in food technology and nutritional sciences*, 1(6), 130-134.

McIntyre, L., Wilcott, L., & Naus, M. (2015). Listeriosis outbreaks in British Columbia, Canada, caused by soft ripened cheese contaminated from environmental sources. *BioMed research international*, 2015.

McLandsborough, L., Rodriguez, A., Pérez-Conesa, D., & Weiss, J. (2006). Biofilms: at the interface between biophysics and microbiology. *Food Biophysics*, 1(2), 94-114.

McLauchlin, J. (1987). *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *Journal of applied bacteriology*, 63(1), 1-11.

McLaughlin, H. P., Casey, P. G., Cotter, J., Gahan, C. G., & Hill, C. (2011). Factors affecting survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in soil samples. *Archives of microbiology*, 193(11), 775-785.

Mejlholm, O., & Dalgaard, P. (2007). Modeling and predicting the growth of lactic acid bacteria in lightly preserved seafood and their inhibiting effect on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 70(11), 2485-2497.

Mejlholm, O., Bøknæs, N., & Dalgaard, P. (2015). Development and validation of a stochastic model for potential growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated lightly preserved seafood. *Food microbiology*, 45, 276-289.

Melero, B., Vinuesa, R., Diez, A. M., Jaime, I., & Rovira, J. (2013). Application of protective cultures against *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni* in chicken products packaged under modified atmosphere. *Poultry science*, 92(4), 1108-1116.

Mellefont, L. A., & Ross, T. (2007). Effect of potassium lactate and a potassium lactate–sodium diacetate blend on *Listeria monocytogenes* growth in modified atmosphere packaged sliced ham. *Journal of food protection*, 70(10), 2297-2305.

Mellefont, L. A., McMeekin, T. A., & Ross, T. (2008). Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *International journal of food microbiology*, 121(2), 157-168.

Milly, P. J., Toledo, R. T., & Ramakrishnan, S. (2005). Determination of minimum inhibitory concentrations of liquid smoke fractions. *Journal of Food Science*, 70, M12–M17.



Milly, P. J., Toledo, R. T., Chen, J. (2008). Evaluation of liquid smoke treated ready-to-eat (RTE) meat products for control of *Listeria innocua* M1. *Journal of Food Science*, 73, 179–183.

Minei, C. C., Gomes, B. C., Ratti, R. P., D'ANGELIS, C. E., & De Martinis, E. C. (2008). Influence of peroxyacetic acid and nisin and coculture with *Enterococcus faecium* on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of food protection*, 71(3), 634-638.

Mizan, M. F. R., Jahid, I. K., & Ha, S. D. (2015). Microbial biofilms in seafood: a food-hygiene challenge. *Food microbiology*, 49, 41-55.

Modi, H.A. (2009). An introduction to microbial spoilage of foods. In: Modi, H.A. (Ed.), *Microbial Spoilage of Foods*. Aavishkar Publishers, Jaipur, India, pp. 4366.

Montazeri, N., Oliveira, A. C. M., Himelbloom, B. H., Leigh, M. B., & Crapo, C. A. (2013). Chemical characterization of commercial liquid smoke products. *Food Science & Nutrition*, 1, 102–115.

Muratore, G., Mazzaglia, A., Lanza, C. M., & Licciardello, F. (2007). Effect of process variables on the quality of swordfish fillets flavored with smoke condensate. *Journal of Food Processing and Preservation*, 31(2), 167-177.

Murphy, R. Y., Martin, E. M., Duncan, L. K., Beard, B. L., & Marcy, J. A. (2004). Thermal process validation for *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Listeria*

monocytogenes in ground turkey and beef products. *Journal of food protection*, 67(7), 1394-1402.

Møretrø, T., & Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1(2), 107-121.

Naitali, M., Dubois-Brissonnet, F., Cuvelier, G., & Bellon-Fontaine, M. N. (2009). Effects of pH and oil-in-water emulsions on growth and physicochemical cell surface properties of *Listeria monocytogenes*: Impact on tolerance to the bactericidal activity of disinfectants. *International journal of food microbiology*, 130(2), 101-107.

Navas, J., Ortiz, S., Lopez, P., Lopez, V., & MARTÍNEZ-SUÁREZ, V. (2007). Different enrichment procedures for recovery of *Listeria monocytogenes* from raw chicken samples can affect the results of detection (by chromogenic plating or real-time PCR) and lineage or strain identification. *Journal of food protection*, 70(12), 2851-2854.

Neunlist, M. R., Federighi, M., Laroche, M., Sohier, D., Delattre, G., Jacquet, C., & Chihib, N. E. (2005). Cellular lipid fatty acid pattern heterogeneity between reference and recent food isolates of *Listeria monocytogenes* as a response to cold stress. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 88(3-4), 199-206.

Nisiotou, A., Parlapani, F. F., Kormas, K., & Boziaris, I. S. (2014). Old targets, new weapons: Food microbial communities revealed with molecular tools. *Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques*, 277.

Niven, G. W., Miles, C. A., & Mackey, B. M. (1999). The effects of hydrostatic pressure on ribosome conformation in *Escherichia coli*: an in vivo study using differential scanning calorimetry. *Microbiology*, *145*(2), 419-425.

Norwood, D. E., & Gilmour, A. (2001). The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Letters in Applied Microbiology*, *33*(4), 320-324.

Norwood, D. E., & Gilmour, A. (2000). The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *Journal of applied microbiology*, *88*(3), 512-520.

Nwodo, U., Green, E., & Okoh, A. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International journal of molecular sciences*, *13*(11), 14002-14015.

Nychas, G.-J.E., Marshall, D., Sofos, J., 2007. Meat poultry and seafood. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, third ed. ASM Press, pp. 105-140.

Núñez-Montero, K., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Peraza, J., Pizarro-Cerdá, J., & Lecuit, M. (2018). *Listeria costaricensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *68*(3), 844-850.

Oosterhuis, J. J. (1981). Double freezing of plaice. *Voedingsmiddelentechnologie*, *14*(2), 11-15.

Osaili, T., Griffis, C. L., Martin, E. M., Beard, B. L., Keener, A., & Marcy, J. A. (2006). Thermal inactivation studies of Escherichia coli O157: H7, Salmonella, and Listeria monocytogenes in ready-to-eat chicken-fried beef patties. *Journal of food protection*, *69*(5), 1080-1086.

Ottaviani, F., Ottaviani, M., & Agosti, M. (1997). Differential agar medium for Listeria monocytogenes [foods]. *Industrie Alimentari (Italy)*.

Ottaviani, F., Ottaviani, M., & Agosti, M. (1997). Quimper Froid Symposium Proceedings. *P6 ADRIA Quimper (F)*, 16-18.

Painter, T. J. (1998). Carbohydrate polymers in food preservation: an integrated view of the Maillard reaction with special reference to discoveries of preserved foods in Sphagnum-dominated peat bogs. *Carbohydrate polymers*, *36*(4), 335-347.

Paludan-Müller, C., Dalgaard, P., Huss, H. H., & Gram, L. (1998). Evaluation of the role of Carnobacterium piscicola in spoilage of vacuum-and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5 C. *International Journal of Food Microbiology*, *39*(3), 155-166.

Pan, Y., Breidt, F., & Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(12), 7711-7717.

Papaioannou, E., Giaouris, E. D., Berillis, P., & Boziaris, I. S. (2018). Dynamics of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species and mixed-culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection challenges. *International journal of food microbiology*, 267, 9-19.

Paramythiotis, S., & Skandamis, P. N. (2015, January). Adaptive response of bacteria: Multiple hurdles, cross-tolerance and tools to illustrate underlying mechanisms. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1642, No. 1, pp. 282-284). American Institute of Physics.

Paranjpye, R. N., Peterson, M. E., Poysky, F. T., Pelroy, G. A., & Eklund, M. W. (2005). Control of bacterial pathogens by liquid smoke and sodium lactate during processing of cold-smoked and dried salmon strips. *Journal of aquatic food product technology*, 13(4), 29-39.

Park, S. H., Hong, G. P., Min, S. G., & Choi, M. J. (2008). Combined high pressure and subzero temperature phase transition on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 10536. *International journal of food engineering*, 4(4).

Park, S. H., Chang, P. S., Ryu, S., & Kang, D. H. (2014). Development of a novel selective and differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *80*(3), 1020-1025.

Parlapani, F. F., Kormas, K. A., & Boziaris, I. S. (2015a). Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(12), 2386-2394.

Parlapani, F. F., Verdos, G. I., Haroutounian, S. A., & Boziaris, I. S. (2015b). The dynamics of *Pseudomonas* and volatiles during the spoilage of gutted sea bream stored at 2 °C. *Food Control*, *55*, 257-265.

Parlapani, F. F., & Boziaris, I. S. (2016). Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures. *LWT-Food Science and Technology*, *66*, 553-559.

Parlapani, F. F., Mallouchos, A., Haroutounian, S. A., & Boziaris, I. S. (2017). Volatile organic compounds of microbial and non-microbial origin produced on model fish substrate un-inoculated and inoculated with gilt-head sea bream spoilage bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, *78*, 54-62.

Parlapani, F. F., Kyritsi, M., Sakka, M., Chatzinikolaou, K., Donos, S., Boziaris, I. S., ... & Athanassiou, C. G. (2019a). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of

flight mass spectrometry reveals *Enterococcus* and *Enterobacter* spp. in major insect species involved in food security with resistance to common antibiotics. *Journal of Pest Science*, 1-12.

Parlapani, F. F., Boziaris, I. S. & DeWitt, C. M. (2019b, July). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in frozen cooked shrimps by High Pressure Processing. IAFP, Louisville, Kentucky, USA.

Parlapani, F. F., Syropoulou, F., Tsiartsafis, A., Ekonomou, S., Madesis, P., Exadactylos, A., & Boziaris, I. S. (2020). HRM analysis as a tool to facilitate identification of bacteria from mussels during storage at 4° C. *Food microbiology*, 85, 103304.

Pietzka, A. T., Stöger, A., Huhulescu, S., Allerberger, F., & Ruppitsch, W. (2011). Gene scanning of an internalin B gene fragment using high-resolution melting curve analysis as a tool for rapid typing of *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 13(1), 57-63.

Pilchová, T., Hernould, M., Prévost, H., Demnerová, K., Pazlarová, J., & Tresse, O. (2014). Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 35(1), 366-372.

Pinto, B., Pierotti, R., Canale, G., & Reali, D. (1999). Characterization of 'faecal streptococci' as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. *Letters in Applied Microbiology*, 29(4), 258-263.

Poimenidou, S., Belessi, C. A., Giaouris, E. D., Gounadaki, A. S., Nychas, G. J. E., & Skandamis, P. N. (2009). *Listeria monocytogenes* attachment to and detachment from stainless steel surfaces in a simulated dairy processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7182-7188.

Poimenidou, S. V., Chatzithoma, D. N., Nychas, G. J., & Skandamis, P. N. (2016). Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat, salinity and low pH, after habituation on cherry tomatoes and lettuce leaves. *PloS one*, 11(10), e0165746.

Poulsen, L. V. (1999). Microbial biofilm in food processing. *LWT-Food Science and Technology*, 32(6), 321-326.

Premaratne, R. J., Lin, W. J., & Johnson, E. A. (1991). Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(10), 3046-3048.

Rahman, M., Rahman, M. M., Deb, S. C., Alam, M. S., Alam, M. J., & Islam, M. T. (2017). Molecular identification of multiple antibiotic resistant fish pathogenic *Enterococcus faecalis* and their control by medicinal herbs. *Scientific reports*, 7(1), 3747.

Rajkovic, A., Smigic, N., Uyttendaele, M., Medic, H., De Zutter, L., & Devlieghere, F. (2009). Resistance of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 and



Campylobacter jejuni after exposure to repetitive cycles of mild bactericidal treatments. *Food microbiology*, 26(8), 889-895.

Ramakrishnan, S., & Moeller, P. (2002). Liquid smoke: product of hardwood pyrolysis. *Fuel Chemistry Division Preprints*, 47(1), 366.

Ramaswamy, H. S., Zaman, S. U., & Smith, J. P. (2008). High pressure destruction kinetics of Escherichia coli (O157: H7) and Listeria monocytogenes (Scott A) in a fish slurry. *Journal of Food Engineering*, 87(1), 99-106.

Rantsiou, K., Greppi, A., Garosi, M., Acquadro, A., Mataragas, M., & Cocolin, L. (2012). Strain dependent expression of stress response and virulence genes of Listeria monocytogenes in meat juices as determined by microarray. *International journal of food microbiology*, 152(3), 116-122.

Redmond, G. A., Gormley, T. R., & Butler, F. (2003). The effect of short-and long-term freeze-chilling on the quality of mashed potato. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(1), 85-97.

Ren, D., Madsen, J. S., Sørensen, S. J., & Burmølle, M. (2015). High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *The ISME journal*, 9(1), 81.

Renier, S., Hébraud, M., & Desvaux, M. (2011). Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environmental Microbiology*, *13*(4), 835-850.

Riedo, F. X., Pinner, R. W., Tosca, M. D. L., Cartter, M. L., Graves, L. M., Reeves, M. W., ... & Broome, C. (1994). A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. *Journal of Infectious diseases*, *170*(3), 693-696.

Rizo, A., Fuentes, A., Fernández-Segovia, I., Masot, R., Alcañiz, M., & Barat, J. M. (2013). Development of a new salmon salting–smoking method and process monitoring by impedance spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology*, *51*(1), 218-224.

Roboz, J. (2002). *Mass spectrometry in cancer research*. CRC Press.

Rocourt, J. R., & World Health Organization. (1991). *Human listeriosis: 1989* (No. WHO/HPP/FOS/91.3. Unpublished). Geneva: World Health Organization.

Rocourt, J., & Brosch, R. (1992). *Human listeriosis 1990*. Document WHO/HPP/FOS/92.4. Geneva: World Health Organization.

Rocourt, J., Jacquet, C., Bille, J., & World Health Organization. (1997). *Human listeriosis: 1991-1992* (No. WHO/FNU/FOS/97.1). Geneva: World Health Organization.

Rocourt, J., Jacquet, C., & Reilly, A. (2000). Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 62(3), 197-209.

Rozum, J. J. (2009). Smoke flavor. In R. Tarté (Ed.), *Ingredients in meat products, properties, functionality and applications* (pp. 211–226). New York, New York: Springer Science LLC.

Rodríguez-Romo, L., Yousef, A., & Griffiths, M. (2005). Cross-protective effects of bacterial stress. *Understanding Pathogen Behaviour. Boca Raton Boston, New York, Washington DC: Woodhead Publishing Ltd*, 128-9.

Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., & Capita, R. (2019). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride. *Food microbiology*, 82, 533-540.

Rollet, C., Gal, L., & Guzzo, J. (2009). Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters*, 290(2), 135-142.

Rosnes, J. T., Skåra, T., & Skipnes, D. (2011). Recent advances in minimal heat processing of fish: effects on microbiological activity and safety. *Food and bioprocess technology*, 4(6), 833-848.

Ross, T., Rasmussen, S., Fazil, A., Paoli, G., & Sumner, J. (2009). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meats in Australia. *International journal of food microbiology*, *131*(2-3), 128-137.

Ruiz-Capillas, C., & Moral, A. (2001). Residual effect of CO<sub>2</sub> on hake (*Merluccius merluccius* L.) stored in modified and controlled atmospheres. *European Food Research and Technology*, *212*(4), 413-420.

Russell, N. J., Evans, R. I., Ter Steeg, P. F., Hellemons, J., Verheul, A., & Abee, T. (1995). Membranes as a target for stress adaptation. *International journal of food microbiology*, *28*(2), 255-261.

Ryan, S., Hill, C., & Gahan, C. G. (2008). Acid stress responses in *Listeria monocytogenes*. *Adv Appl Microbiol*, *65*, 67-91.

Røder, H. L., Raghupathi, P. K., Herschend, J., Brejnrod, A., Knøchel, S., Sørensen, S. J., & Burmølle, M. (2015). Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment. *Food microbiology*, *51*, 18-24.

Sabanadesan, S., Lammerding, A. M., & Griffiths, M. W. (2000). Survival of *Listeria innocua* in salmon following cold-smoke application. *Journal of food protection*, *63*(6), 715-720.

Sallam, K. I. (2008). Effect of marinating process on the microbiological quality of Pacific saury (*Cololabis saira*) during vacuum-packaged storage at 4° C. *International journal of food science & technology*, 43(2), 220-228.

Samelis, J., Aggelis, G., & Metaxopoulos, J. (1993). Lipolytic and microbial changes during the natural fermentation and ripening of Greek dry sausages. *Meat science*, 35(3), 371-385.

Sanz, P. D., & Otero, L. (2014). High-pressure freezing. In Sun, D. W. (Ed.), *Emerging technologies for food processing* (pp. 515-538). London: Academic Press.

Savaşan, S., Kırkan, Ş., Erbaş, G., Parın, U., & Çiftci, A. (2016). The determination of virulence factors among fish originated enterococci. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 27(2), 98-103.

Su, G., Yu, Y., Ramaswamy, H. S., Hu, F., Xu, M., & Zhu, S. (2014). Kinetics of *Escherichia coli* inactivation in frozen aqueous suspensions by high pressure and its application to frozen chicken meat. *Journal of food engineering*, 142, 23-30.

Sanchez-Vizueté, P., Orgaz, B., Aymerich, S., Le Coq, D., & Briandet, R. (2015). Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Frontiers in microbiology*, 6, 705.

Saraoui, T., Fall, P. A., Leroi, F., Antignac, J. P., Chereau, S., & Pilet, M. F. (2016). Inhibition mechanism of *Listeria monocytogenes* by a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Food microbiology*, 53, 70-78.

Sauders, B. D., Overdeest, J., Fortes, E., Windham, K., Schukken, Y., Lembo, A., & Wiedmann, M. (2012). Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(12), 4420-4433.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., ... & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging infectious diseases*, 17(1), 7.

Schlech III, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., ... & Broome, C. V. (1983). Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *New england journal of medicine*, 308(4), 203-206.

Seeliger, H. P., Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Grimont, P. A., & Jones, D. (1985). *Listeria ivanovii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 35(1), 126-126.

Sheard, P. R. (2010). Bacon. In: Toldra, F. (Ed.), *Handbook of meat processing*. Wiley-Blackwell, Iowa, 327-336.

Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 407-413.

Shimasaki, T., Miake, K., Tsukamasa, Y., Sugiyama, M. A., Minegishi, Y., & Shinano, H. (1994). Effect of water activity and storage temperature on the quality and microflora of smoked salmon. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.

Shin, J. H., Kang, D. H., & Rasco, B. (2008). Effect of different packaging methods and storage temperatures on the growth of *Listeria monocytogenes* in raw and hot smoked rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 17(2), 137-155.

Sibanda, T., Buys, E. M. (2017). Resuscitation and growth kinetics of sub-lethally injured *Listeria monocytogenes* strains following fluorescence activated cell sorting (FACS). *Food Research International* 100, 150–158

Sikorski, Z. E., & Kołodziejaska, I. (2002). Microbial risks in mild hot smoking of fish. *Critical reviews in food science and nutrition*, 42(1), 35-51.

Silk, T. M., Roth, T. M., & Donnelly, C. W. (2002). Comparison of growth kinetics for healthy and heat-injured *Listeria monocytogenes* in eight enrichment broths. *Journal of food protection*, 65(8), 1333-1337.

Silva, S., Teixeira, P., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2008). Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *Journal of food protection*, 71(7), 1379-1385.

Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 573-583.

Skandamis, P. N., Yoon, Y., Stopforth, J. D., Kendall, P. A., & Sofos, J. N. (2008). Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food microbiology*, 25(2), 294-303.

Skandamis, P. N., Stopforth, J. D., Yoon, Y., Kendall, P. A., & Sofos, J. N. (2009). Heat and acid tolerance responses of *Listeria monocytogenes* as affected by sequential exposure to hurdles during growth. *Journal of food protection*, 72(7), 1412-1418.

Sleator, R. D., Gahan, C. G., & Hill, C. (2003). A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(1), 1-9.

Smith, B., Larsson, J. T., Lisby, M., Müller, L., Madsen, S. B., Engberg, J., ... & Kemp, M. (2011). Outbreak of listeriosis caused by infected beef meat from a meals-on-wheels delivery in Denmark 2009. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(1), 50-52.

Smoot, L. M., & Pierson, M. D. (1998). Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 61(10), 1293-1298.



Soares, J. M., da Silva, P. F., Puton, B. M. S., Brustolin, A. P., Cansian, R. L., Dallago, R. M., Valduga, E. (2016). Antimicrobial and antioxidant activity of liquid smoke and its potential application to bacon. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 38, 189–197.

Soni, K. A., Nannapaneni, R., & Hagens, S. (2010). Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage Listex P100. *Foodborne pathogens and disease*, 7(4), 427-434.

Sofos, J. N. (2009). Biofilms: our constant enemies. *Foodsafety magazine*.

Sofos, J. N. (2002). Microbial control in foods: needs and concerns. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 1-12.

Sofos, J. N., Maga, J. A., & Boyle, D. L. (1988). Effect of ether extracts from condensed wood smokes on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*, 53, 1840–1843.

Spanu, C., Scarano, C., Ibba, M., Pala, C., Spanu, V., & De Santis, E. P. L. (2014). Microbiological challenge testing for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food: a practical approach. *Italian journal of food safety*, 3(4).

Stopforth, J. D., Yoon, Y., Barmपालia, I. M., Samelis, J., Skandamis, P. N., & Sofos, J. N. (2005). Reduction of *Listeria monocytogenes* populations during exposure to a simulated gastric fluid following storage of inoculated frankfurters formulated and

treated with preservatives. *International journal of food microbiology*, 99(3), 309-319.

Stratakos, A. C., Inguglia, E. S., Linton, M., Tollerton, J., Murphy, L., Corcionivoschi, N., ... & Tiwari, B. K. (2019). Effect of high pressure processing on the safety, shelf life and quality of raw milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52, 325-333.

Stratford, M. (2006). Food and beverage spoilage yeasts. In *Yeasts in food and beverages* (pp. 335-379). Springer, Berlin, Heidelberg.

Strawn, L. K., Fortes, E. D., Bihn, E. A., Nightingale, K. K., Gröhn, Y. T., Worobo, R. W., ... & Bergholz, P. W. (2013). Landscape and meteorological factors affecting prevalence of three food-borne pathogens in fruit and vegetable farms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(2), 588-600.

Stephens, P. J., Cole, M. B., & Jones, M. V. (1994). Effect of heating rate on the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(6), 702-708.

Stringer, S. C., George, S. M., & Peck, M. W. (2000). Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Applied Microbiology*, 88(S1), 79S-89S.

Sudirman, I., Mathieu, F., Michel, M., & Lefebvre, G. (1993). Detection and properties of curvaticin 13, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus curvatus* SB13. *Current Microbiology*, 27(1), 35-40.

Suñen, E., Aristimuño, C., & Fernandez-Galian, B. (2003). Activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout stored at 4 °C. *Food Research International*, 36(2), 111-116.

Suñen, E., Fernandez-Galian, B., & Aristimuno, C. (2001). Antibacterial activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* at low temperature. *Food microbiology*, 18(4), 387-393.

Suñen, E. (1998). Minimum inhibitory concentration of smoke wood extracts against spoilage and pathogenic micro-organisms associated with foods. *Letters in Applied Microbiology*, 27(1), 45-48.

Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and infection*, 9(10), 1236-1243.

Syed, Q. A., Buffa, M., Guamis, B., & Saldo, J. (2016). Factors affecting bacterial inactivation during high hydrostatic pressure processing of foods: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(3), 474-483.

Taguchi, M., Kanki, M., Yamaguchi, Y., Inamura, H., Koganei, Y., Sano, T., ... & Asakura, H. (2017). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in retail lightly pickled vegetables and its successful control at processing plants. *Journal of food protection*, 80(3), 467-475.

Tapia, N. C., Dorey, A. L., Gahan, C. G., den Besten, H. M., O'Byrne, C. P., & Abee, T. (2020). Different carbon sources result in differential activation of sigma B and stress resistance in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 320, 108504.

Thakur, M., Asrani, R. K., & Patial, V. (2018). *Listeria monocytogenes*: A Food-Borne Pathogen. In *Foodborne Diseases* (pp. 157-192). Academic Press.

Theobald, A., Arcella, D., Carere, A., Croera, C., Engel, K. H., Gott, D., ... & Simon, R. (2012). Safety assessment of smoke flavouring primary products by the European Food Safety Authority. *Trends in food science & technology*, 27(2), 97-108.

Thompson, R. L., Carpenter, C. E., Martini, S., & Broadbent, J. R. (2008). Control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meats containing sodium levulinate, sodium lactate, or a combination of sodium lactate and sodium diacetate. *Journal of food science*, 73(5), M239-M244.

Tichaczek, P. S., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Vogel, R. F., & Hammes, W. P. (1992). Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174

and sakacin P from *L. sake* LTH673. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(3), 460-468.

Tinh, N. T. N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2008). A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Marine Biotechnology*, 10(1), 1-12.

Todorov SD, Dicks LMT (2009) Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *Enterococcus mundtii*. *Anaerobe* 15(3):65–73

Todorov, S. D., Oliveirab, R. P., & Vaz-Velhoc, M. (2012). Media optimization of bacteriocin ST22CH production by *Lactobacillus sakei* ST22CH isolated from salpicão, a traditional meat-product from Portugal. *CHEMICAL ENGINEERING*, 27.

Tokur, B. (2007). The effect of different cooking methods on proximate composition and lipid quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International journal of food science & technology*, 42(7), 874-879.

Tomasula, P. M., Renye, J. A., Van Hekken, D. L., Tunick, M. H., Kwoczak, R., Toht, M., ... & Phillips, J. G. (2014). Effect of high-pressure processing on reduction of *Listeria monocytogenes* in packaged Queso Fresco. *Journal of dairy science*, 97(3), 1281-1295.

Tosun, Ş. Y., & Özden, Ö. (2014). Survey of Inhibition of *Listeria Monocytogenes* in Hot-Smoked Rainbow Trout Fillets for Food Safety. *Journal of food processing and preservation*, 38(1), 338-346.

Tresse, O., Shannon, K., Pinon, A., Malle, P., Vialette, M., & Midelet-Bourdin, G. (2007). Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food-processing facilities and clinical cases to inert surfaces. *Journal of food protection*, 70(7), 1569-1578.

Tsigarida, E., Skandamis, P., & Nychas, G. J. (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 C. *Journal of applied microbiology*, 89(6), 901-909.

Turgis, M., Vu, K. D., Millette, M., Dupont, C., & Lacroix, M. (2016). Influence of environmental factors on bacteriocin production by human isolates of *Lactococcus lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 8(1), 53-59.

van Boekel, M., Fogliano, V., Pellegrini, N., Stanton, C., Scholz, G., Lalljie, S., ... & Eisenbrand, G. (2010). A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(9), 1215-1247.

Van Loo, E. J., Babu, D., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. (2012). Screening of commercial and pecan shell-extracted liquid smoke agents as natural antimicrobials against foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, *75*, 1148–1152.

Van Netten, P., Perales, I., Van de Moosdijk, A., Curtis, G. D. W., & Mossel, D. A. A. (1989). Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. *International journal of food microbiology*, *8*(4), 299-316.

Van Nevel, S., Koetzsch, S., Proctor, C. R., Besmer, M. D., Prest, E. I., Vrouwenvelder, J. S., ... & Hammes, F. (2017). Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring. *Water Research*, *113*, 191-206.

Varlet, V., Serot, T., Monteau, F., Bizec, B. L., & Prost, C. (2007). Determination of PAH profiles by GC–MS/MS in salmon processed by four cold-smoking techniques. *Food additives and contaminants*, *24*(7), 744-757.

Vaudagna, S. R., González, C. B., Guignon, B., Aparicio, C., Otero, L., & Sanz, P. D. (2012). The effects of high hydrostatic pressure at subzero temperature on the quality of ready-to-eat cured beef carpaccio. *Meat science*, *92*(4), 575-581.

Vermeulen, A., Devlieghere, F., De Loy-Hendrickx, A., & Uyttendaele, M. (2011). Critical evaluation of the EU-technical guidance on shelf-life studies for *L.*

monocytogenes on RTE-foods: A case study for smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 176-185.

Vitt, S. M., Himelbloom, B. H., Crapo, C. A. (2001). Inhibition of *Listeria innocua* and *L. monocytogenes* in a laboratory medium and cold-smoked salmon containing liquid smoke. *Journal of Food Safety*, 21, 111–125.

Viuda-Martos, M., El Gendy, A. E. N. G., Sendra, E., Fernandez-Lopez, J., Abd El Razik, K. A., Omer, E. A., & Perez-Alvarez, J. A. (2010). Chemical composition and antioxidant and anti-*Listeria* activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(16), 9063-9070.

Vogeleer, P., Tremblay, Y. D., Mafu, A. A., Jacques, M., & Harel, J. (2014). Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 5, 317.

Vorob'eva, L. I. (2004). Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: a review. *Applied biochemistry and microbiology*, 40(3), 217-224.

Walker, S. J., Archer, P., & Banks, J. G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 68(2), 157-162.

Wang, X., Devlieghere, F., Geeraerd, A., Uyttendaele, M. (2017). Thermal inactivation and sublethal injury kinetics of *Salmonella enterica* and *Listeria*



*monocytogenes* in broth versus agar surface. *International Journal of Food Microbiology*, 243, 70-77.

Wang, J., Ray, A. J., Hammons, S. R., & Oliver, H. F. (2015). Persistent and transient *Listeria monocytogenes* strains from retail deli environments vary in their ability to adhere and form biofilms and rarely have *inlA* premature stop codons. *Foodborne pathogens and disease*, 12(2), 151-158.

Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., & den Bakker, H. C. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(1), 286-292.

Wesche, M. A., Ryser, T. E. (2013). Stress adaptation, survival and recovery of foodborne pathogens. In: Barbara, L., Peck, W. M. (Eds), *Guide to Foodborne Pathogens*, Second Edition, Wiley-Blackwell, Pages 422-437.

Whitehead, K. A., & Verran, J. (2015). Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Current Opinion in Food Science*, 2, 84-91.

Willis, C., Baalham, T., Greenwood, M., & Presland, F. (2006). Evaluation of a new chromogenic agar for the detection of *Listeria* in food. *Journal of applied microbiology*, 101(3), 711-717.

Winkelströter, L. K., Gomes, B. C., Thomaz, M. R., Souza, V. M., & De Martinis, E. C. (2011). *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*, 22(8), 1404-1407.

Wirtanen, G., Raulio, M., & Salo, S. (2014). Food Safety Assurance Systems: Management of Biofilm Risk. In *Encyclopedia of Food Safety: Food Safety Management* (pp. 240-243). Elsevier.

Wirtanen, G. (1995). Biofilm formation and its elimination from food processing equipment.

World Health Organization. (1994). Phenol: health and safety guide.

Xu, K. D., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, C. T., & McFeters, G. A. (1998). Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), 4035-4039.

Yang, H., Kendall, P. A., Medeiros, L. C., & Sofos, J. N. (2009). Efficacy of sanitizing agents against *Listeria monocytogenes* biofilms on high-density polyethylene cutting board surfaces. *Journal of food protection*, 72(5), 990-998.

Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 8(1), 10.

Ye, K., Wang, H., Jiang, Y., Xu, X., Cao, J., & Zhou, G. (2014). Development of interspecific competition models for the growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus* on vacuum-packaged chilled pork by quantitative real-time PCR. *Food Research International*, *64*, 626-633.

Yousef, A. E. & Courtney, P. D. (2002). Basics of stress adaptation and implications in new-generation food. In: Juneja, V. K., & Yousef, A. E. (Eds.), *Microbial stress adaptation and food safety*. CRC Press. Pages 10-11.

Zhang, J., Zhang, Y., Liu, S. N., Han, Y., & Zhou, Z. J. (2012). Modelling growth and bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici* PA003 as a function of temperature and pH value. *Applied biochemistry and biotechnology*, *166*(6), 1388-1400.

Zhang, J., Song, S., Li, D., & Luo, Y. (2017). Microbial communities and biogenic amines of crucian carp (*Carassius auratus*) fillets during partial freezing and chilled storage. *International journal of food properties*, *20*(sup1), S1053-S1064.

Zhao, T., Podtburg, T. C., Zhao, P., Chen, D., Baker, D. A., Cords, B., & Doyle, M. P. (2013). Reduction by competitive bacteria of *Listeria monocytogenes* in biofilms and *Listeria* bacteria in floor drains in a ready-to-eat poultry processing plant. *Journal of food protection*, *76*(4), 601-607.

Zhou, K., Zeng, Y. T., Han, X. F., & Liu, S. L. (2015). Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* BC-25 in response to temperature

and pH in batch fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176(6), 1627-1637.

Zilelidou, E. A., & Skandamis, P. N. (2018). Growth, detection and virulence of *Listeria monocytogenes* in the presence of other microorganisms: microbial interactions from species to strain level. *International journal of food microbiology*, 277, 10-25.

## Ελληνική βιβλιογραφία

Γ.Δ. Αλιείας ΥΠΑΑΤ. (2014). Πολυετές Εθνικό Στρατηγικό Σχέδιο για την ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών στην Ελλάδα, 2014-2020.

Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων. (ΕΦΕΤ). (2014). Διαθέσιμο από: [http://www.efet.gr/portal/page/efetnew/news/view\\_new?ID=1153](http://www.efet.gr/portal/page/efetnew/news/view_new?ID=1153). Πρόσβαση 12/06/2019.

## Abstract

Fishery products represent one of the most important agricultural products that Greece produces. Seafood is perishable due to their high nutritional value and can be contaminated with pathogenic micro-organisms at various stages of their production chain, from the environment, humans, equipment and treatment areas, making them dangerous for consumption. *L. monocytogenes* is a ubiquitous Gram-positive, foodborne pathogenic bacterium that can be found in a wide range of foods and can survive under various treatments (freezing, salting, heat treatment). It is estimated that the main source of contamination is mildly processed ready-to-eat foods (RTE). Many categories of food and fishery products have been epidemiologically associated with sporadic cases of listeriosis. Hot smoked trout fillets belong to mild heat-treated ready-to-eat foods that can support the growth of *L. monocytogenes* and have been the main subject of study of the current PhD thesis. In particular, the present PhD thesis focuses on the fate and inhibition of *L. monocytogenes* during processing and storage of hot smoked trout fillets.

Initially, it was investigated the antimicrobial effect of nine (9) water-soluble liquid smoke condensates against *L. monocytogenes*. An assessment of the minimum inhibitory (MIC) and bactericidal concentration (MBC) of liquid smoke performed against control cells, biofilm cells, and osmotically adapted cells of *L. monocytogenes*. The most effective liquid smoke, coded as L9, had a strong inhibitory (MIC) and bactericidal effect (MBC) of 0.25 % and 0.50 % (v/v), respectively for both studied temperatures (7.9 and 37 °C), with slight differences between the different cells studied. The MIC value for the second most effective liquid smoke G6, was 0.25 % (v/v) at 7.9 °C, while in all other cases it was more than 2.00 % (v/v), against control, osmotically adapted and biofilm cells of *L. monocytogenes*.

Subsequently, it was investigated the thermotolerance of healthy (control) and osmotically adapted (10.00 %, w/v, NaCl) *L. monocytogenes* cells, which were subjected to thermal stress at 60 °C for 20 min. To appraise the osmotic adaptation, the cells inoculated in preheated TSB<sub>y.e.</sub> (60 °C) as heating menstruum, containing: i) 0.50 % NaCl ii) 5.00 % NaCl and iii) 10.00 % (w/v) NaCl, in combination with heating at 60 °C for 20 min, in a water bath. Results showed that the thermal resistance of *L. monocytogenes* was significantly affected by previous osmotic adaptation of the cells. D<sub>60°C</sub> values determined by linear regression of osmotically adapted *L. monocytogenes* cells, were 10.08 ± 1.41, 14.27 ± 1.66, and 8.28 ± 1.89 min after heating in TSB<sub>y.e.</sub> with 0.50 %, 5.00 % and 10.00 % (w/v) NaCl. Furthermore, we assessed the heat stress of biofilm cells. To assess the heat sensitivity and sublethal injury, inoculums of *L. monocytogenes* planktonic and biofilm cells were challenged in preheated TSB<sub>y.e.</sub>, immersed in a water bath with constant temperature at 60 °C. D<sub>60°C</sub> values for *L. monocytogenes* biofilm and planktonic cells, were 6.21 and 4.85 min, respectively, showing that biofilm cells were more heat resistant in contrasted to planktonic cells. The surviving *L. monocytogenes* cells were enumerated by surface plating on Tryptone Soy Agar with 0.6 % (w/v) Yeast Extract (TSA<sub>y.e.</sub>). *L. monocytogenes* cells were also plated on PALCAM agar and TSA<sub>y.e.</sub> supplemented with 5.00 % NaCl (w/v), as another selective medium, to assess the injury. The counts of the osmotically adapted cells of *L. monocytogenes* were higher than healthy cells in all cases after enumeration on the selective media, while this difference increased as the time of exposure of the cells to the thermal treatment (60 °C) increased. Generally, biofilm cells enumerated on TSA<sub>y.e.</sub> + NaCl, exhibited higher heat resistance than planktonic cells, while the opposite was found for the cells enumerated on PALCAM agar.

Following, it was investigated the effectiveness of liquid smoke fractions (L9 or G6), embedded in TSA y.e. 0.6 % in concentrations ranging from 0.25 % to 1.00 % in 0.25 % increments, to investigate the sensitivity of *L. monocytogenes* in liquid smokes after stresses such as a) thermal stress of planktonic and biofilm cells and b) subsequent osmotic (10.00 %, w/v NaCl) and thermal stress (60 °C). After heat treatment, a small amount ( $\geq 0.50$  %, v/v) of the most effective liquid smoke L9, resulted in a reduction under the detection limit of 2.00 log CFU/mL for the osmotically adapted and healthy (no stress) cells with or without heat treatment (60 °C). Interestingly, the resistance of *L. monocytogenes* biofilm cells after heat treatment at 60 °C, increased significantly against 0.25 % and 0.50 % (v/v) L9, showing a reduction of 0.09 and 0.51 log CFU/mL, respectively. *L. monocytogenes* cells did not reveal different resistance against liquid smoke G6 in all concentrations used. Overall, heat-treated biofilm cells showed higher resistance to the antimicrobial effect of liquid smoke.

In the next stage, the exploration of dominant spoilage microorganisms of hot smoked vacuum-packed rainbow trout fillets from two fish processing industries (regions A and B) in Greece during storage at 2.0 and 7.9 °C was carried out. The results of the organoleptic examination of the fillets showed that at 7.9 °C, the fillets were spoiled after 70 and 63 days from region A and B, respectively, while at 2.0 °C even after 150 days of storage the total viable counts (TVC) of the fillets from both regions did not exceeded the microbiological limit of 7.00 log CFU/g but rejected after 135 days due to sensory changes. The most dominant spoilage group of microorganisms that prevailed (based on cultivation techniques) at both temperatures and regions were the Gram-positive lactic acid bacteria (LAB). After the enumeration of the microorganisms in several culture media, the colonies (>50% from each plate), from



five-time point interval, grown on MRS culture medium of pH 5.4, 6.4 and 7.4 were obtained and identified using MALDI-TOF MS. *Candida zeylanoides* (particularly at 2 °C) and *Lactobacillus sakei* (particularly at 7.9 °C) were the most abundant microorganisms in fish from the industry A, while other bacteria of the genera *Candida* (*C. famata*, *C. guilliermondii*), *Lactobacillus* (*L. curvatus*) and *Enterococcus* (*E. faecalis*) were also found in fish from the industry B. Differences in abundances and/or bacterial species were observed among MRS media of pH 5.4, 6.4 and 7.4.

Subsequently, we studied the interactions that may occur between the dominant spoilage microflora of hot smoked trout fillets and the planktonic and biofilm cells of *L. monocytogenes*. The competition of planktonic and biofilm *L. monocytogenes* cells was tested on the surface of a model fish substrate and real hot smoked trout fillets, stored at 4.0 and 7.9 °C. The LAB dominated on the surface of the fillets and surpassed on growth the planktonic *L. monocytogenes* cells, reaching in population 7.57 και 7.54 log CFU/g, after 60 days of storage at 4.0 and 7.9 °C, respectively. The same results observed on the presence of biofilm cells on the surface of the fillets, stored at 4.0 and 7.9 °C.

In all cases, when *L. monocytogenes* (planktonic and biofilm) cells cultivated on multi-cultures with the mix of the four dominant microorganisms on fish models, the growth of the pathogen was limited. Thus, it appeared that the co-culture of planktonic *L. monocytogenes* cells with each dominant bacterium separately, at 4.0 °C on fish models, showed a symbiotic interaction, while at 7.9 °C co-cultured microorganisms, limited from the presence of *L. monocytogenes*. The opposite effect observed in the co-culture of *L. monocytogenes* biofilm cells with the dominant spoilage microorganisms, with the only exception at 7.9 °C, where the growth of the biofilm cells restricted in the presence of *C. famata* or *C. zeylanoides*.

Finally, High Hydrostatic Pressure (HHP; 200 MPa for 15 min), liquid smoke (0.50 %, v/v), and freezing (-80 °C) was used to eliminate *Listeria monocytogenes* in BHI broth, raw and smoked trout. The bactericidal effect of liquid smoke (L9 and G6) solutions, HHP, and their combinations were evaluated against *L. monocytogenes* LO28, EGD-e and 10403S and further continued with the most resistant strain (10403S) to the combined treatment and G6 was the most effective liquid smoke extract. For the first time, a synergistic effect of liquid smoke, and HHP was observed and further enhanced by freezing prior to HHP. *Listeria monocytogenes* population in BHI broth (without the addition of NaCl), exposed to L9 or G6 was reduced about 3.23 and 2.90 log CFU/mL, respectively. The effect of HHP and liquid smoke on *L. monocytogenes* 10403S, prior to freezing was highest in BHI compared to raw and smoked trout. However, a major synergistic effect of HHP, liquid smoke and freezing was observed, reaching a 5.48 log CFU/g reduction when smoked trout was used. High levels of injury also occurred, among the treatments on *L. monocytogenes* 10403S.

Overall, the results of the current PhD thesis showed that the osmotically adapted *L. monocytogenes* cells revealed increased resistance to heat treatment, as did biofilm cells, compared to planktonic cells. However, following the subsequent hurdle of liquid smoke only the biofilm cells of the pathogen showed resistance (after heat treatment) against the most effective liquid smoke (L9). In the presence of possible specific spoilage organisms isolated from smoked trout fillets, *L. monocytogenes* cells (planktonic or biofilm) in some cases were prevailed while in others were not, or exhibited symbiotic behavior. The above shows the importance to investigate the behavior of the physically presented microflora. Finally, a significant synergistic effect was observed of HHP, liquid smoke extracts (L9 or G6) and freezing at -80 °C,

when applied on smoked trout fillets, resulting in a significant reduction of the more resistant strain of *L. monocytogenes*.

**Scientific field:** Food Microbiology

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, hot smoked trout, , osmotic stress, heat stress, high hydrostatic pressure, liquid smoke, biofilm, microbial interaction, MALDI-Tof MS

### **Δημοσιεύσεις σε Διεθνή περιοδικά με κριτές**

**Ekonomou, S. I.**, Bulut, S., Karatzas, K. A. G., & Boziaris, I. S. (2020). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw and hot smoked trout fillets by high hydrostatic pressure processing combined with liquid smoke and freezing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 102427.

Kritikos, A., Aska, I., **Ekonomou, S.**, Mallouchos, A., Parlapani, F. F., Haroutounian, S. A., & Boziaris, I. S. (2020). Volatilome of Chill-Stored European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) Fillets and Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Slices under Modified Atmosphere Packaging. *Molecules*, 25(8), 1981.

Parlapani, F. F., Syropoulou, F., Tsiartsafis, A., **Ekonomou, S.**, Madesis, P., Exadactylos, A., & Boziaris, I. S. (2020). HRM analysis as a tool to facilitate identification of bacteria from mussels during storage at 4 C. *Food microbiology*, 85, 103304.

### **Δημοσιεύσεις σε πρακτικά διεθνών συνεδρίων**

**Ekonomou S.I.**, Boziaris I.S., Kiritsi M., Hadjichristodoulou C., Parlapani F.F. (2020). Microbiota of hot smoked vacuum-packed rainbow trout fillets **under chill storage conditions** using MALDI Tof MS. FoodMicro 2020. 7-10 September, Athens, Greece. (Postponed, 2021)

**Ekonomou S.I.** & Boziaris I. S. (2020). Heat and liquid smoke resistance of *Listeria monocytogenes* biofilm cells. FoodMicro 2020. 7-10 September, Athens, Greece. (Postponed, 2021)

**Ekonomou S.I.**, Wivert P.A. & Boziaris I. S. (2018). Minimum inhibitory and bactericidal concentrations of liquid smoke fractions against seafood bacterial

pathogens. 3<sup>rd</sup> International Congress on Applied Ichthyology & Aquatic Environment, 8–11 November, Volos, Greece.

Parlapani F.F., **Ekonomou S.I.**, Kiritsi M., Hadjichristodoulou C., Boziaris I.S. (2017). Rapid determination of spoilage bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry of Greek mussels stored at 4°C, 6<sup>th</sup> International Congress on Food Technology, 18-19 March, Athens, Greece.

#### **Δημοσιεύσεις υπό συγγραφή**

**Ekonomou S.I.**, Kyritsi M., Boziaris I.S., Hadjichristodoulou C., Parlapani F.F. Effect of storage temperature on microbiological and sensory changes in hot smoked vacuum-packed rainbow trout fillets (*Oncorhynchus mykiss*) and investigation of their microbial composition using MALDI ToF MS.

**Ekonomou S.I.** & Boziaris I.S. Inactivation of osmotically adapted and biofilm *Listeria monocytogenes* cells, by heat treatment and liquid smoke, simulating the real stresses induced during the processing of hot smoked trout fillets.