



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Αδρανοποίηση *Listeria monocytogenes* κατά την θερμική
επεξεργασία τσιπούρας (*Sparus aurata*)»**

ΚΙΣΣΑ ΕΛΕΝΗ

ΒΟΛΟΣ, 2020

«Inactivation of *Listeria monocytogenes* during heat treatment of gilt-head sea bream
(*Sparus aurata*)»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

- 2) **Κλαουδάτος Δημήτριος**, Επίκουρος Καθηγητής (Γνωστικό αντικείμενο «Αλιεία»), Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας αυτής Καθηγητή κ. Ιωάννη Μποζιάρη για την πολύτιμη βοήθειά του, την υποστήριξη και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Γεώργιο Βέρδο, για την υπομονή και την πολύτιμη βοήθεια του, κατά τη διεξαγωγή του πειράματος.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κλαουδάτο Δημήτριο καθώς και την Διδάσκουσα Φωτεινή Παρλαπάνη για την καλή διάθεση, το χρόνο που διέθεσαν και τις πολύτιμες συμβουλές.

Τέλος, η εργασία αυτή είναι αφιερωμένη στην οικογένειά μου, η οποία με στήριζε και με στηρίζει σε κάθε βήμα μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως η *Listeria monocytogenes* αποτελούν σημαντικούς κινδύνους στα αλιευτικά προϊόντα και για το λόγο αυτό η μελέτη τους σε συνθήκες θερμικής αδρανοποίησης είναι ένα σπουδαίο αντικείμενο μελέτης έτσι ώστε ένα τρόφιμο να καταστεί κατάλληλο για κατανάλωση. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η θερμική αδρανοποίηση της *Listeria monocytogenes* κατά την ψήση σε θερμό αέρα θερμοκρασίας 180 °C. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό της καμπύλης θερμικού θανάτου του μικροοργανισμού. Τα πειράματα απέδειξαν την πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ της μείωσης του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού σε σχέση με το χρόνο θερμικής επεξεργασίας.

Λέξεις-κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, θερμική επεξεργασία τροφίμων

ABSTRACT

Pathogenic micro-organisms such as *Listeria monocytogenes* play an important role in the safety of fisheries products and therefore their study in heat stress conditions is an important study subject contributing in making a food suitable for consumption. In the present work, the heat resistance of *Listeria monocytogenes* at 180 ° C was studied. Experiments were performed to determine the thermal death curve of the microorganism. Experiments showed a very good correlation between the reduction of the pathogen population in relation to the heat treatment time.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, Thermal treatment.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Τροφιμογενείς ασθένειες και κατανάλωση ιχθύων.....	8
1.2 Παθογόνο βακτήριο <i>Listeria monocytogenes</i>	13
1.3 Θερμική επεξεργασία τροφίμων.....	16
1.4 Καταμέτρηση θερμικώς τραυματισμένων κυττάρων.....	22
1.5 Σκοπός εργασίας.....	23
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	24
2.1 Προμήθεια ιχθύων.....	24
2.2 Προετοιμασία θρεπτικών υλικών.....	24
2.3 Βακτηριακά στελέχη και προετοιμασία εμβολίου.....	29
2.4 Προετοιμασία δειγμάτων.....	29
2.5 Διαδικασία θερμικής επεξεργασίας.....	30
2.6 Προετοιμασία δειγμάτων για απαρίθμηση μικροοργανισμού.....	30
2.7 Επώαση δειγμάτων και απαρίθμηση μικροοργανισμού.....	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
3.1 Προσδιορισμός χρόνου δεκαδικής μείωσης πληθυσμού.....	33
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
4.1 Αποτελέσματα.....	37
4.2 Συμπεράσματα εργασίας.....	38
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	40
5.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.....	40
5.2 Ελληνική βιβλιογραφία.....	42

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τροφιμογενείς ασθένειες και κατανάλωση ιχθύων

Με την έννοια τροφιμογενείς ασθένειες νοούνται όλες οι ασθένειες οι οποίες μπορεί να προκληθούν από την κατανάλωση τροφίμων. Οι τροφιμογενείς ασθένειες μπορεί να προκληθούν είτε από χημικούς είτε από μικροβιολογικούς παράγοντες (Tauxe et al. 2010). Οι τροφιμογενείς ασθένειες έχουν προκαλέσει την αδιαθεσία σε μερικά εκατομμύρια ανθρώπους ετησίως ανά τον κόσμο και για το λόγο αυτό απαιτούν τη δέουσα προσοχή (Mead et al. 1999). Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζονται οι πιο συχνοί παθογόνοι μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τις τροφιμογενείς ασθένειες (Chemburu et al. 2005, ΕΦΕΤ 2004, Alocilja & Radke 2003).

Η κατανάλωση μολυσμένων ιχθύων μπορεί να προκαλέσει τροφική δηλητηρίαση, ασθένεια με έντονα συμπτώματα, η εκδήλωση των οποίων μπορεί να γίνει από μισή ώρα μετά την κατανάλωση της τροφής έως τρεις ημέρες. Οι πιο επικίνδυνες ομάδες πληθυσμού όπως βρέφη, ηλικιωμένοι, ασθενείς, άτομα σε ανάρρωση, έγκυες γυναίκες κλπ. παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στις τροφικές δηλητηριάσεις.

Οι τροφικές δηλητηριάσεις στα ιχθυρά προκαλούνται κυρίως από:

- **Μικροοργανισμούς**, όπως τα βακτήρια, οι ιοί και οι μύκητες. Οι μικροοργανισμοί παράγουν πολλές φορές τοξίνες οι οποίες προκαλούν και αυτές τροφικές δηλητηριάσεις. Οι περισσότερες τροφικές δηλητηριάσεις προκαλούνται από **παθογόνα βακτήρια**. Αυτός είναι ο πιο συνηθισμένος και σημαντικός τύπος τροφικών δηλητηριάσεων και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει στον θάνατο. Συνήθως απαιτείται μεγάλος αριθμός βακτηρίων για να προκληθεί μια τροφική δηλητηρίαση, αλλά πολλές φορές και ένα μόνο κύτταρο μπορεί να προκαλέσει ασθένεια. Εκτός από τα βακτήρια ασθένειες μπορούν να προκαλέσουν

και οι ιοί, τα παράσιτα και οι μύκητες (ΕΦΕΤ 2004, ΦΕΚ 1219Β-04.10.2000, Οδηγία 93/43/ΕΟΚ).

Για να προκληθεί τροφική δηλητηρίαση από ιχθυρά θα πρέπει να συνυπάρχουν τρία στοιχεία (ΕΦΕΤ 2004, Trickett 1997, Trickett 1992):

- ✓ Το τρόφιμο να έχει επιμολυνθεί από παθογόνους μικροοργανισμούς.
- ✓ Το μολυσμένο τρόφιμο να παραμείνει για αρκετό διάστημα σε κατάλληλες, για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.
- ✓ Κατανάλωση αρκετής ποσότητας τροφίμου ώστε να υπάρχει σ' αυτήν τέτοιος πληθυσμός μικροοργανισμών που θα είναι ικανός να προκαλέσει τροφική δηλητηρίαση.

Τα συμπτώματα μιας τροφικής δηλητηρίασης είναι συνήθως:

- Ναυτία
- Εμετός
- Διάρροια
- Πυρετός, πονοκέφαλος
- Στομαχικός και κοιλιακός πόνος

Ο αριθμός αναφορών για τροφικές δηλητηριάσεις από ιχθυρά δείχνει μια τάση αύξησης τα τελευταία χρόνια, παρ' ότι εφαρμόζονται υψηλότερα πρότυπα υγιεινής και υπάρχει συνειδητοποίηση για τις αιτίες που προκαλούν αυτές τις δηλητηριάσεις. Ορισμένοι από τους λόγους που εξηγούν αυτό το φαινόμενο είναι οι παρακάτω (ΕΦΕΤ 2004, Harringan and Park 1991, Chilled Food Association 1989)

- Η αύξηση των ρυθμών εκτροφής με ζωοτροφές που μπορεί να είναι μολυσμένες με βακτήρια.
- Κακός χειρισμός τροφίμων, είτε κατά την αποθήκευση είτε κατά τη θερμική επεξεργασία

- Παρατεταμένος χρόνος φύλαξης μαγειρεμένων τροφίμων.

Οι τροφικές δηλητηριάσεις που προκαλούνται από μικροοργανισμούς διακρίνονται σε τροφολοιμώξεις και σε τροφοτοξινώσεις. Οι **τροφολοιμώξεις** προκαλούνται από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν ζωντανούς παθογόνους μικροοργανισμούς. Αντίθετα, οι **τροφοτοξινώσεις** προκαλούνται από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν τοξίνες μικροοργανισμών, οι οποίες δημιουργούνται καθώς οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται στα μολυσμένα τρόφιμα. Τα συμπτώματα μίας τροφοτοξίνωσης εμφανίζονται σχεδόν μετά από 30 λεπτά έως δύο ώρες από την κατανάλωση των μολυσμένων τροφίμων, ενώ της τροφολοιμώξης μετά από δύο ώρες έως τρεις ημέρες (Πιν. 1.1). Ανάμεσα σε αυτά, το παθογόνο μικρόβιο *Listeria monocytogenes* αποτελεί έναν από τους πλέον σημαντικούς διατροφικούς παθογόνους παράγοντες λόγω της ψυχοτροφικής συμπεριφοράς του (έχει τη δυνατότητα ανάπτυξης κάτω από τους 7 °C) (Walker et al 1990, Junttila et al. 1988) καθώς και τη δυνατότητα ανάπτυξης της τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες, αλλά και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Επιπλέον, αυτό το βακτήριο είναι σε θέση να αναπτυχθεί σε ευρεία περιοχή τιμών pH (4.0-9.6) και σε χαμηλή ενεργότητα νερού (Nolan et al. 1992, Farber & Peterkin 1991).

Πίνακας 1.1: Συμπτώματα και χρόνοι εμφάνισης τροφικών δηλητηριάσεων (ΕΦΕΤ 2004).

Αιτιολογικός παράγοντας	Είδος τροφοδηλητηρίασης	Χρόνος εμφάνισης συμπτωμάτων
<i>Staphylococcus aureus</i> (Σταφυλόκοκκος)	Τροφοτοξίνωση	1 - 7 ώρες, συνήθως 2 - 4 ώρες
<i>Escherichia coli</i> (Κολοβακτηρίδιο)	Τροφολοίμωξη	2 – 8 ώρες
<i>Salmonella</i>	Τροφολοίμωξη	6 – 48 ώρες, συνήθως 12 – 36 ώρες
<i>Listeria monocytogenes</i>	Τροφολοίμωξη	3 – 70 ημέρες, συνήθως 3 εβδομάδες

Τα αλιεύματα είναι ιδιαίτερα ευπαθή προϊόντα λόγω της πλούσιας σύστασής τους, η οποία ποικίλει ανάλογα το είδος, την ηλικία, το φύλο, το περιβάλλον διαβίωσής τους αλλά και την εποχή αλίευσής τους (Πιν. 1.2).

Πίνακας 1.2: Κύρια συστατικά (ποσοστό) στους μυς των ψαριών (www.fao.org).

Συστατικά (% κ.β)	Ψάρι (φιλέτο)		
	Min. (%κ.β)	Φυσική διακύμανση (%κ.β)	Max. (%κ.β)
Πρωτεΐνες	6	16-21	28
Λιπίδια	0.1	0.2-25	67
Υδατάνθρακες		<0.5	
Τέφρα	0.4	1.2-1.5	105
Νερό	28	66-81	96

Πρόκειται για τροφή υψηλής βιολογικής αξίας λόγω κυρίως των ακόρεστων λιπαρών οξέων που περιέχουν (λινολεϊκό, λινολενικό, EPA, DHA) και βοηθούν στην καλή λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος του ανθρώπου (Γεωργάκης κ.ά. 2002). Με την αλίευση και μετά το θάνατο των αλιευμάτων, πραγματοποιούνται μεταθανάτιες μεταβολές ιδιαίτερα στη σάρκα των ψαριών. Οι κυριότερες είναι: η

νεκρική ακαμψία, η αυτόλυση/πρωτεόλυση, και η αποσύνθεση της σάρκας από τη δράση των βακτηρίων. Η ταχεία προσβολή της σάρκας από διάφορους μικροοργανισμούς και η οξείδωση των λιπών αποτελούν τις κυριότερες αιτίες που συντελούν στην υποβάθμιση της ποιότητας των ψαριών (Tryfinopoulou et al. 2002; Gram and Dalgaard 2002).

Κατά τη διάρκεια του σταδίου της νεκρικής ακαμψίας υφίσταται μια πολύπλοκη μεταβολή των νεκρών μυών στην διάρκεια της οποίας αυτοί γίνονται θολεροί, συμπαγείς και φαίνονται σα διογκωμένοι. Κατ' αυτήν, η σύσπαση των μυών είναι μη αντιστρεπτή και οφείλεται στο σχηματισμό της ακτομυοσίνης. Δεν ακολουθεί χάλαση των μυών για να συσπαστούν εκ νέου, αλλά οδεύει με την μεσολάβηση πολύπλοκων βιοχημικών και ενζυματικών αντιδράσεων στην ωρίμανση του κρέατος και αργότερα στη σήψη του. Με την θανάτωση των αλιευμάτων και την παύση της κυκλοφορίας του αίματος δεν προσκομίζεται πλέον οξυγόνο στους μυς, ούτε απάγονται τα προϊόντα του μεταβολισμού. Έτσι αυξάνεται η ποσότητα του CO₂ και προκαλείται η σταδιακή ελάττωση του δυναμικού οξειδοαναγωγής και πτώση της τιμής του pH. Η νεκρική ακαμψία είναι δείκτης υγείας των ζώων και μπορεί να θεωρηθεί ως ένας φυσικός παρεμποδιστής της ανάπτυξης των βακτηρίων. Η παραγωγή ινοσίνης (σε μερικά ψάρια) και υποξανθίνης (σε άλλα) από την μεταθανάτια αποικοδόμηση του ATP προχωρά ανάλογα με την απώλεια της νωπότητας.

Κατά το στάδιο της αυτόλυσης/πρωτεόλυσης παρατηρείται διάσπαση των πρωτεϊνών και των λιπών της σάρκας από πρωτεάσες και εστεράσες σε αμινοξέα, ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερίνη. Τα παράγωγα αυτά προσδίδουν στη σάρκα των ιχθυρών δυσάρεστη οσμή και γεύση.

Κατά το τελευταίο στάδιο λαμβάνει χώρα η βακτηριακή αλλοίωση, δηλαδή η τελική αποσύνθεση της σάρκας των ψαριών που επέρχεται από την δράση διαφόρων βακτηρίων. Αυτά βρίσκονται στην επιφάνεια του σώματος, στα βράγχια, και στον πεπτικό τους σωλήνα. Μετά το θάνατο, βαθμιαία τα βακτήρια αυτά προκαλούν αλκαλική ζύμωση της σάρκας με αποτέλεσμα την πλήρη αποσύνθεσή της (σήψη) (Γεωργάκης κ.ά. 2002, Tryfinopoulou et al. 2002).

1.2 Παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα Gram θετικό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο σχήματος ραβδιού με στρογγυλεμένα άκρα και διαστάσεις 0.5-2.0 μm μήκος και 0.4-0.5 μm διάμετρο (Τσαλούμη 2019, Adams & Moss 2008). Τα κύτταρα του μικροοργανισμού βρίσκονται χωριστά ή σε μικρές αλυσίδες, σε V και Y σχηματισμούς ή σε παράλληλη διάταξη μεταξύ τους και δε σχηματίζουν σπόρια ή καψύλια (Lou & Yousef 1999). Είναι θετική στη δοκιμή καταλάσης (αφρισμός) και αρνητική στην οξειδάση (δεν υπάρχει ανάπτυξη χρώματος), ενώ διαθέτει το γονίδιο που ελέγχει τη σύνθεση της β-αιμολυσίνης (λιστεριολυσίνη O), η οποία είναι υπεύθυνη για τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και δρά στην κυτταρική μεμβράνη αυτών δημιουργώντας ζώνες σε αιματούχο άγαρ. Τα είδη που ανήκουν στο γένος *Listeria* και καλλιεργούνται σε θερμοκρασία από 20 °C έως 25 °C, έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν φλατζελίνη, με τη βοήθεια της οποίας δημιουργούν περίτριχα μαστίγια κίνησης (εικ. 1.1). Ωστόσο, ο ρυθμός σχηματισμού της ουσίας στους 37°C είναι πολύ χαμηλός με αποτέλεσμα το βακτήριο να μη φέρει μαστίγια (Τσαλούμη 2019, Peel, et al. 1988).



Εικόνα 1.1: *Listeria monocytogenes* με μαστίγιο από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (CreativeDiagnostics) (Τσαλούμη 2019).

Η *Listeria* μπορεί να αναπτυχθεί τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες με κύρια πηγή ενέργειας τη γλυκόζη. Πιο συγκεκριμένα, σε αερόβιες συνθήκες ο μικροοργανισμός μπορεί να αναπτυχθεί παρουσία γλυκόζης, ραμνόζης, λακτόζης και μαλτόζης, ενώ σε αναερόβιες συνθήκες υποστηρίζουν την ανάπτυξη του οι πεντόζες και οι εξόζες (Τσαλούμη 2019, Pine et al. 1989). Σχηματίζει αποικίες λείες, σχεδόν επίπεδες, χρώματος κρεμ-λευκού (Gray and Kilinger 1966), ενώ αν φωτιστούν πλαγίως αποκτούν ένα χαρακτηριστικό μπλε πράσινο-χρώμα (Henry 1933). Η *L. monocytogenes* είναι ένα ανθεκτικό βακτήριο, με την ανάπτυξή του να είναι δυνατή σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ενώ στη φύση βρίσκεται σε χαμηλούς σχετικά πληθυσμούς, έχει αυξημένη ικανότητα διασποράς, πολλαπλασιασμού, και μακροχρόνιας επιβίωσης τόσο στον περιβάλλοντα χώρο των μονάδων παραγωγής τροφίμων όσο και στις επιφάνειες των μηχανημάτων και στον εξοπλισμό των μεταποιητικών μονάδων (Τσαλούμη 2019, Wang et al. 2019). Επιβιώνει ή/και αναπτύσσεται σε pH από 4,0 έως 9,6 με βέλτιστο από 6,0 μέχρι 8,0, σε ενεργότητα νερού (a_w) από 0,90 με βέλτιστη 0,97 και θερμοκρασία από $-1,5^{\circ}\text{C}$ έως 45°C με βέλτιστη από 30°C έως 37°C (Lado & Yousef 2007). Μάλιστα η ικανότητά της αυτή, να επιβιώνει και κυρίως να αναπτύσσεται σε χαμηλές

θερμοκρασίες σε τρόφιμα με χαμηλές τιμές pH και aw που συντηρούνται με ψύξη, δημιουργεί σημαντικά προβλήματα στους διάφορους μεταποιητές τροφίμων καθότι η ψύξη αποτελεί τη βασικότερη, και πολλές φορές τη μοναδική εφαρμοζόμενη μέθοδο συντήρησης των περισσότερων ευαλλοίωτων τροφίμων (Koutsoumanis & Sofos 2005). Σε καταστάσεις περιβαλλοντικής καταπόνησης, η ύπαρξη διαστελεχιακών διαφορών και η επίδραση της προϊστορίας των κυττάρων της *L. monocytogenes*, είναι παράμετροι που δυσκολεύουν την πρόβλεψη της συμπεριφοράς του παθογόνου σε περιπτώσεις επιμόλυνσης έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων. Για παράδειγμα, προηγούμενη έκθεση της *L. monocytogenes* σε συνθήκες καταπόνησης καθιστούν συνήθως τα κύτταρα πιο ανθεκτικά σε μετέπειτα εντονότερες καταπονήσεις ίδιου ή διαφορετικού τύπου (Τσαλούμη 2019, Gandhi & Chikindas 2007).

Η *L. monocytogenes* προκαλεί μια ασθένεια, γνωστή ως λιστερίωση (Listeriosis). Είναι μια σπάνια, σποραδική, αλλά βαριάς μορφής ασθένεια σε καλά προσδιορισμένες ομάδες υψηλού κινδύνου. Σε αυτές ανήκουν οι έγκυες γυναίκες, τα νεογνά, οι ανοσοκατασταλμένοι ενήλικες με HIV / AIDS και οι ηλικιωμένοι (Gandhi & Chikindas, 2007). Προκαλεί αποβολή εμβρύων, μηνιγγίτιδα, σηψαιμία, εμφανή περιγεννητική μόλυνση, εγκεφαλίτιδα, ψύχωση, μολυσματική μονοπυρήνωση. Επίσης, προκαλεί εμπύρετη γαστρεντερίτιδα, με την μολυσματική δόση να κυμαίνεται από $1.9 \times 10^5 - 10^9$ cfu / ml, με τα συμπτώματα να εμφανίζονται μετά από 18 - 27 h από την προσβολή. Τέλος, οι παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση της λιστερίωσης είναι (Βέρδος 2017, Montville & Matthews 2005):

- Η αδρανοποίηση αλλοιωγόνων βακτηρίων που προλαμβάνουν την αύξηση της *L. monocytogenes* κάτω από συνθήκες ψύξης,

- Η αλλαγή στο δημογραφικό, με όλο και περισσότερους ανθρώπους να βρίσκονται σε ομάδες υψηλού κινδύνου, λόγω μεγάλης ηλικίας, ανοσοκαταστολής, μεταμόσχευσης οργάνων, κτλ
- Η μεταβολή στις πρακτικές παραγωγής τροφίμων, συγκεκριμένα ο συγκεντρωτισμός και η ενοποίηση βιομηχανιών τροφίμων, αλλά και κουζινών ιδρυμάτων, γεγονός που κάνει δύσκολη την εφαρμογή ορθών πρακτικών υγιεινής (GHP),
- Η αυξημένη χρήση του ψυγείου,
- Οι αλλαγές στις συνήθειες του φαγητού (νωπά τρόφιμα, ελάχιστα επεξεργασμένα, φυσικά προϊόντα) που απαιτούν ελάχιστο μαγείρεμα.

1.3 Θερμική επεξεργασία τροφίμων

Η θερμική επεξεργασία είναι μία από τις βασικότερες διαδικασίες η οποία εφαρμόζεται στην κατανάλωση ψαριών. Συνήθως, για την αντιμετώπιση του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes* απαιτείται υψηλή θερμοκρασία καθώς θεωρείται ότι είναι από τα πιο θερμοανθεκτικά παθογόνα. Η ανθεκτικότητα της εξαρτάται σημαντικά από το είδος του τροφίμου και για αυτό το λόγο έχουν γίνει πολλές έρευνες γύρω από την ανθεκτικότητα του βακτηρίου σε διαφορετικά τρόφιμα (Lou & Yousef, 1999, Doyle et al., 2002, Mackey & Bratcell, 1989, Sorqvist, 1994). Σήμερα, η θερμότητα χρησιμοποιείται στο μαγείρεμα, στο ζεμάτισμα, στην παστερίωση και στην αποστείρωση. Η επεξεργασία των τροφίμων σε λάθος θερμοκρασία καθώς και το ατελές μαγείρεμα ή ψήσιμο, επιτρέπουν την επιβίωση των μικροοργανισμών ή ακόμα και τον πολλαπλασιασμό τους όταν πραγματοποιούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η θέρμανση είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τη θανάτωση των μικροοργανισμών. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο και οι ιδιότητες του αλιεύματος

επηρεάζουν τη διαδικασία της αποστείρωσης. Τα βακτηριακά σπόρια είναι αυτά που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη θέρμανση. Η θέρμανση πετυχαίνει την αδρανοποίηση των ενζύμων και την καταστροφή των βλαστικών κυττάρων των μικροοργανισμών. Η επιτυχία της θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων εξαρτάται από τους εξής παράγοντες:

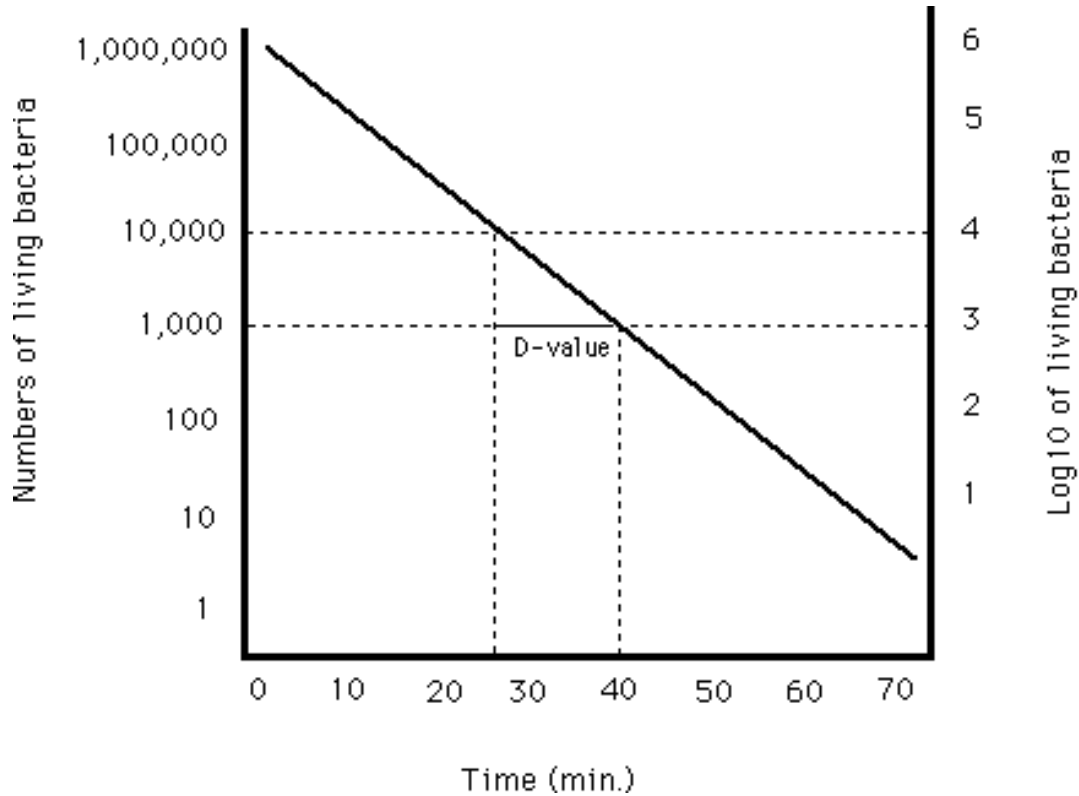
- Χρόνο και θερμοκρασία θέρμανσης
- Αρχικό αριθμό μικροοργανισμών
- Είδος μικροοργανισμών
- Θερμοκρασία επώασης
- Φάση ανάπτυξης μικροοργανισμού
- pH
- Ενεργότητα νερού
- Σύνθεση του τροφίμου
- Ανασταλτικές ουσίες
- Βακτηριοσίνες

Γενικά, όσο αυξάνεται ο χρόνος θέρμανσης σε μία ορισμένη θερμοκρασία τόσο αυξάνεται το ποσοστό καταστροφής των μικροοργανισμών, ενώ όσο αυξάνεται η θερμοκρασία τόσο μειώνεται ο χρόνος που απαιτείται για την καταστροφή ενός ορισμένου πληθυσμού μικροοργανισμών. Ο μηχανισμός της θερμικής καταστροφής των βακτηρίων περιλαμβάνει την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών (ονομάζεται και μετουσίωση ή αποδιάταξη), τη διάσπαση των νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης.

Η συνήθης μέθοδος που χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση των θερμικών τραυματισμένων κυττάρων και συνεπώς της επιτυχία της θερμικής επεξεργασίας είναι ο χρόνος δεκαδικής μείωσης (D-value). Ο χρόνος δεκαδικής μείωσης είναι ο χρόνος

(min) που απαιτείται για να ελαττωθεί ο πληθυσμός ενός μικροοργανισμού μετά από θέρμανση σε μία ορισμένη θερμοκρασία κατά 90% ή κατά ένα λογαριθμικό κύκλο.

- μείωση κατά 1 λογαριθμικό κύκλο σημαίνει πχ μείωση από 10.000 (10^4) μικροοργανισμούς σε 1.000 (10^3).



Εικόνα 1.2: Τρόπος εκτίμησης θερμικής καταστροφής μικροοργανισμών.

Η τιμή D διαφέρει ανάλογα με το είδος και το στέλεχος του μικροοργανισμού και συγκεκριμένα όσο πιο θερμοανθεκτικός είναι ο μικροοργανισμός τόσο μεγαλύτερη είναι η τιμή D. Η θερμική αντίσταση των μικροοργανισμών είναι ένας παράγοντας πολύ σημαντικός για το σχεδιασμό των θερμικών διεργασιών. Η τιμή D μπορεί να επηρεαστεί από τα χαρακτηριστικά του αλιεύματος καθώς και από τα χαρακτηριστικά του ίδιου του μικροοργανισμού, συμπεριλαμβανομένων της θερμοκρασίας, της φάσης ανάπτυξης του μικροοργανισμού, του γένους και του

χρόνου έκθεσης θέρμανσης. Οι τιμές D πρέπει να καθορίζονται για συγκεκριμένο μικροοργανισμό και ποικίλουν βάσει της ποιότητας των μικροοργανισμών, της θερμοκρασίας, του μέσου θέρμανσης, του τρόπου παραγωγής των σπορίων και της μεθόδου ελέγχου.

Οι δυο πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για αξιολόγηση των θερμικών διεργασιών είναι η *in situ* προσέγγιση και η φυσικομαθηματική μέθοδος (Hendrickx et al, 1993). Στην *in situ* μέθοδο, το επίπεδο της ποιότητας ή της ασφάλειας που μας ενδιαφέρει υπολογίζεται πριν και μετά τη θερμική κατεργασία, παρέχοντας έτσι άμεσες και αξιόπιστες πληροφορίες για την επίδραση της διεργασίας με μέτρηση μικροβιακών πληθυσμών σε τρυβλία. Από την άλλη πλευρά, οι φυσικομαθηματικές μέθοδοι, αξιολογούν τη θερμική διεργασία βασιζόμενες στο χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό του προϊόντος είτε αυτό έχει καταγραφεί είτε προσομοιωθεί, σε συνδυασμό με απαραίτητες πληροφορίες για την κινητική καταστροφής του χαρακτηριστικού που μας ενδιαφέρει. Όμως, η ανάγκη για λήψη χρονοθερμοκρασιακών δεδομένων περιορίζει σημαντικά την εφαρμογή της μεθόδου. Πολλές φορές δεν είναι κατάλληλη η απευθείας λήψη του χρονοθερμοκρασιακού προφίλ σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες, καθώς π.χ. θερμοστοιχεία θα εμποδίζουν την ελεύθερη κίνηση ενός μίγματος στερεού-υγρού και κατά συνέπεια θα οδηγούσαν σε σφάλματα. Επίσης, όσον αφορά τη χρήση μοντέλων για υπολογιστική αναπαράσταση του χρονοθερμοκρασιακού προφίλ, αυτή περιορίζεται από την ακρίβεια που χαρακτηρίζει τις φυσικές παραμέτρους που απαιτούνται. Η έλλειψη ακριβών υπολογισμών αυτών των παραμέτρων (π.χ. δεδομένα για το ιζώδες ή την αγωγιμότητα σε υψηλές θερμοκρασίες) περιορίζει την προσομοίωση των τεχνικών θέρμανσης.

Η θερμική επεξεργασία παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα. Παράλληλα με την καταστροφή των μικροοργανισμών που επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια των

θερμικών επεξεργασιών, συντελούνται μεταβολές στην υφή του τροφίμου, απενεργοποίηση δραστικών ενζύμων και υποβάθμιση ποιοτικών χαρακτηριστικών του προϊόντος, όπως θρεπτικά συστατικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως το άρωμα. Συγκεκριμένα, η θερμική επεξεργασία επιφέρει μεταβολή στη δομή των πρωτεϊνών χωρίς όμως να ελαττώνεται η θρεπτική τους αξία. Στους υδατάνθρακες επέρχονται αλλοιώσεις που αφορούν στη διαλυτότητα, στην υδρόλυση και στη ζελατινοποίηση του αμύλου. Μαζί με τις πρωτεΐνες δίνουν αντιδράσεις καστανώσης με αντίστοιχα προϊόντα τις μελανίνες, τα οποία έχουν επιβλαβή δράση στον οργανισμό. Λόγω της καραμελοποίησης των υδατανθράκων και των σακχάρων κατά τη θερμική επεξεργασία προκαλούνται μεταβολές στο χρώμα των προϊόντων. Ευαίσθησια στη θερμική επεξεργασία παρουσιάζουν οι βιταμίνες B1 και C, ενώ η B2 είναι σταθερή. Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες A, D και E παρουσιάζουν αρκετή σταθερότητα. Πολλές φορές το άρωμα και η φυσική σύσταση του τροφίμου αλλάζει μετά την επεξεργασία, όμως αυτό δεν είναι πάντα ανεπιθύμητο γιατί έτσι μπορούμε να βελτιώσουμε κάποια από τα χαρακτηριστικά του (Raptopoulou et al. 2015).

1.4 Καταμέτρηση θερμικώς τραυματισμένων κυττάρων

Τα θερμικώς καταπονημένα κύτταρα έχουν την ικανότητα να επιδιορθώνουν τις βλάβες, να ανανήπτουν και να επιστρέφουν στη φυσιολογική τους κατάσταση, όπου ακολουθεί έναρξη της κυτταρικής διαίρεσης και κατά συνέπεια της αύξησης τους. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ένα τραυματισμένο κύτταρο είναι εκείνο που μπορεί να επιδιορθώσει την κυτταρική βλάβη και ανακτήσει την ικανότητά του να σχηματίσει μια αποικία σε μη-επιλεκτικά μέσα, σε αντίθεση με το νεκρό κύτταρο που δεν μπορεί να σχηματίσει καμία αποικία κάτω από οποιαδήποτε κατάσταση (Wu et al. 2001). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί των τροφίμων μπορούν να τραυματιστούν μετά από διάφορες διαδικασίες επεξεργασίας και χειρισμού τροφίμων, όπως π.χ. την

θερμική επεξεργασία, ψύξη, κατάψυξη, ξήρανση, ακτινοβόληση καθώς και από την έκθεση σε συντηρητικά, οξύτητα και χαμηλή ενεργότητα του νερού (Wu 2008). Όταν οι μικροοργανισμοί υφίστανται τραυματισμό, τότε εμφανίζονται αρκετές αλλαγές σε πολλά δομικά και λειτουργικά στοιχεία τους, όπως στο κυτταρικό τοίχωμα, την κυτταροπλασματική μεμβράνη, τα ριβοσώματα, καθώς και πολλά ένζυμα. Γενικά, τα περισσότερα τραυματισμένα κύτταρα υφίστανται αποκατάσταση εντός 2-4 ωρών σε κατάλληλη θερμοκρασία επώασης και με τα κατάλληλα μη-επιλεκτικά θρεπτικά υλικά. Επομένως, είναι επιθυμητό να επιτραπεί στα τραυματισμένα κύτταρα να αποκαταστήσουν οποιαδήποτε ζημία πριν την απομόνωση ή απαρίθμηση με τις συνήθεις διαδικασίες (Wu 2008).

Τα μη επιλεκτικά υλικά επιτρέπουν την ανάπτυξη των τραυματισμένων και προφανώς μη τραυματισμένων κυττάρων. Πολλές από τις αποδεκτές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και απαρίθμηση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα με χρήση επιλεκτικών μέσων δεν επιτρέπουν την επιδιόρθωση τραυματισμένων μικροοργανισμών και έτσι δεν μπορούν να ανιχνευθούν. Επιλεκτικές ενώσεις όπως επιφανειοδραστικά, άλατα, αντιβιοτικά, σουλφοναμιδία, οξέα και χρωστικές ουσίες μπορεί να εμποδίσουν την επιδιόρθωση και ανάνηψη των τραυματισμένων μικροοργανισμών. Έτσι, όταν χρησιμοποιούνται τέτοια μέσα, οι τραυματισμένοι μικροοργανισμοί στα δείγματα πρέπει να επιτρέπεται να ανανήπτουν σε κατάλληλο περιβάλλον πριν από την έκθεση σε επιλεκτικούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι που επιτρέπουν την ανάνηψη των τραυματισμένων μικροοργανισμών πριν από την έκθεση σε ένα επιλεκτικό μέσο (Wu 2008). Οι αρχές που πρέπει να ληφθούν υπόψη στην ανάπτυξη μεθόδων για την ανίχνευση ή απαρίθμηση τραυματισμένων μικροοργανισμών περιλαμβάνουν τα εξής (α) τα τραυματισμένα κύτταρα είναι δυνατόν να γίνονται

προσωρινά ευαίσθητα σε πολλές ενώσεις του θρεπτικού μέσου, (β) αυτή η ευαισθησία μπορεί να οφείλεται στη βλάβη των κυτταροπλασματικών μεμβρανών, (γ) ο τραυματισμός είναι αναστρέψιμος και μπορεί να αποκατασταθεί σε διατροφικά πλούσια μη μέσα και τα επιδιορθωμένα κύτταρα ανακτούν την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται, (δ) τα τραυματισμένα κύτταρα δεν επιδιορθώνονται ή πολλαπλασιάζονται παρουσία επιλεκτικού μέσου (ε) τα τραυματισμένα κύτταρα θα μπορούσαν να απαριθμηθούν και να απομονωθούν στα επιλεκτικά μέσα, εάν πρώτα αφεθούν σε κατάλληλο περιβάλλον πριν από την έκθεση τους σε αυτά τα μέσα στ) ο επιζώντας πληθυσμός αποτελεί ένα σύνολο τόσο τραυματισμένων όσο και μη τραυματισμένων κυττάρων (Wu 2008).

Γενικά, οι μέθοδοι ανάνηψης των κυττάρων μπορούν να ταξινομηθούν σε αυτές που χρησιμοποιούν υγρά και σε αυτές που χρησιμοποιούνται στερεά μέσα (Ray, 1979, Ray and Adams, 1984). Η μέθοδος ανάνηψης με χρήση υγρών μέσω είναι αποτελεσματική για την απαρίθμηση και απομόνωση των παθογόνων βακτηρίων σε διαφορετικούς τύπους τροφίμων. Από την άλλη η μέθοδος ανάνηψης με χρήση στερεών μέσων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άμεση απαρίθμηση των οργανισμών με την κλασική διαδικασία της επώασης σε τρυβλία.

Στην μέθοδο με χρήση υγρών μέσων, ένα δείγμα αναμεμιγμένης τροφής επωάζεται κανονικά σε μη επιλεκτικό ζωμό για να διευκολύνει την επισκευή. Ο χρόνος και η θερμοκρασία της επώασης κατά τη διάρκεια της φάσης της ανάνηψης ποικίλλουν με τη μέθοδο ανίχνευσης που θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια. Στις παραδοσιακές μεθόδους στερεάς αποκατάστασης, το αναμεμιγμένο δείγμα τοποθετείται πάνω σε τρυβλίο που περιέχει ένα μη επιλεκτικό μέσο και επωάζονται για κατάλληλο χρόνο (1-4 ώρες) και θερμοκρασία (25 - 37 °C) για να διευκολυνθεί η ανάνηψη. Μετά την ανάνηψη οι πλάκες επικαλύπτονται με 7-12 ml ενός επιλεκτικού

μέσου άγαρ, το οποίο είναι ειδικό για τον τύπο του μικροοργανισμού, αφήνεται να στερεοποιηθεί και κατόπιν επώάζεται. Κατά την επώαση, τα συστατικά περιλαμβάνουν τις επιλεκτικές εκείνες ενώσεις που απαιτούνται. Κατά τη μέθοδο αυτή, επειδή τα κύτταρα έχουν ήδη επιδιορθωθεί δεν εμφανίζεται κάποιο φαινόμενο αναστολής και επομένως πολλαπλασιάζονται και σχηματίζονται αποικίες. Επομένως, μόνο οι οργανισμοί-στόχοι μπορούν να αντισταθούν στο επιλεκτικό περιβάλλον και απαριθμούνται (Wu 2008).

1.5 Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας ήταν ο προσδιορισμός του ρυθμού θανάτου του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε σάρκα ιχθύος κατά την ψήση του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

2.1 Προμήθεια ιχθύων

Ολόκληροι, απεντερωμένοι ιχθύες τσιπούρας βάρους 350 - 400 g ελήφθησαν από την τοπική υπεραγορά της πόλης του Βόλου και μεταφέρθηκαν, σε ισοθερμικά κιβώτια με πάγο, στον εργαστηριακό χώρο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

2.2 Προετοιμασία θρεπτικών υλικών

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

Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

A. Maximum Recovery Diluent, MRD

Το συγκεκριμένο υλικό είναι ισοτονικό, ωσμωρυθμιστικό διάλυμα παρασκευής διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων για μικροβιολογική ανάλυση τροφίμων. Περιέχει τα συστατικά που παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Συστατικά υλικού Maximum Recovery Diluent

Συστατικά	g/L
Sodium Chloride	8.5
Bacteriological Peptone	1.0

Η διαδικασία παρασκευής περιλαμβάνει τα εξής στάδια: σε μια φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 8.5 g χλωριούχου νατρίου και 1.0 g πεπτόνης και στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.

B. Tryptone SoyBroth, TSB

Το TSB είναι θρεπτικός ζωμός γενικής χρήσης ο οποίος επιτρέπει την ανάπτυξη σχεδόν όλων των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά. Είναι κατάλληλος για την καλλιέργεια τόσο αερόβιων όσο και αναερόβιων βακτηρίων. Οι πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας παρέχουν άζωτο, βιταμίνες και μέταλλα. Τα φυσικά σάκχαρα της πεπτόνης σόγιας προάγουν την ανάπτυξη. Το χλωριούχο νάτριο χρησιμεύει ως ρυθμιστής της ωσμωτικής πίεσης. Η σύνθεση του θρεπτικού φαίνεται στον πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Συστατικά υλικού Tryptone Soy Broth

Συστατικά	g/L
Tryptone	17.0
Soy Peptone	3.0
Sodium Chloride	5.0
Dextrose	2.5
Dipotassium Phosphate	2.5

Η διαδικασία παρασκευής του περιλαμβάνει τα εξής στάδια: σε μια φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 30g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min. Το τελικό pH του θρεπτικού υλικού ήταν 7.3 ± 0.2 .

Γ. Tryptone Soy Agar, TSA

Το TSA είναι ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης το οποίο επιτρέπει την αύξηση σχεδόν όλων των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά. Είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια τόσο αερόβιων όσο και αναερόβιων βακτηρίων. Οι πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας παρέχουν άζωτο, βιταμίνες και μέταλλα. Τα φυσικά σάκχαρα της πεπτόνης σόγιας προάγουν την ανάπτυξη. Το

χλωριούχο νάτριο χρησιμεύει ως ρυθμιστής της ωσμωτικής πίεσης. Η σύνθεση του θρεπτικού φαίνεται στον πίνακα 2.3:

Πίνακας 2.3: Συστατικά υλικού Tryptone Soy Agar

Συστατικά	g/L
Tryptone	15.0
Soy Peptone	5.0
Sodium Chloride	5.0
Agar	12.0

Η διαδικασία παρασκευής περιλαμβάνει τα εξής στάδια: σε μια φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 37 g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min και στη συνέχεια η διαδικασία της ενσωμάτωσης του θρεπτικού, όπου μικρή ποσότητα μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Το τελικό pH του θρεπτικού ήταν 7.3 ± 0.2 .

Δ. Tryptone Soy Agar + 0.6 % w/v yeast extract

Το συγκεκριμένο θρεπτικό ενδείκνυται για την καλλιέργεια των στελεχών της *Listeriamonocytogenes*. Το εκχύλισμα ζύμης παρασκευάζεται από την αυτόλυση του *Saccharomyces cerevisiae* κάτω από θερμοστατικές ελεγχόμενες συνθήκες για να προστατευτεί η βιταμίνη B. Τα συστατικά του παρουσιάζονται στον πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4: Συστατικά υλικού Tryptone Soy Agar + 0.6 % w/v yeast extract

Συστατικά	g/L
Tryptone	15.0
Soy Peptone	5.0
Sodium Chloride	5.0
Agar	12.0
Yeast Extract	6.0

Η διαδικασία παρασκευής περιλαμβάνει τα εξής στάδια: σε μια φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 37 g θρεπτικού υλικού και 6.0 γεκχυλίσματος ζύμης και στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min. Το τελικό pH του θρεπτικού ήταν 7.3 ± 0.2 .

E. PALCAM Agar

Είναι θρεπτικό επιλεκτικής χρήσης για απαρίθμηση και ανίχνευση στελεχών της *Listeria monocytogenes* σε τρόφιμα. Η πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης, καθώς και το άμυλο παρέχουν άζωτο, βιταμίνες, μέταλλα. Η δεξτρόζη παρέχει ενέργεια. Η διαφοροποίηση στο συγκεκριμένο θρεπτικό βασίζεται στην υδρόλυση της εσκουλίνης σε εσκουλετίνη και της δεξτρόζης. Η *Listeria spp.* υδρολύει την εσκουλίνη η οποία αντίδραση εμφανίζεται ως μαύρισμα στο θρεπτικό και είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού της 6,7-διύδροξυκουμαρίνης, η οποία αντιδρά με τα ιόντα σιδήρου που είναι παρόντα ως κιτρικό άλας σιδηρούχου αμμωνίου. Η μαννιτόλη και το ουδέτερο κόκκινο είναι δείκτης pH. Η *Listeria spp.* δεν ζυμώνει την μαννιτόλη, ενώ είδη όπως *Enterococci* και *Staphylococci* ζυμώνουν την μαννιτόλη και η αντίδραση εμφανίζεται με αλλαγή χρώματος από κόκκινο σε κίτρινο ανάλογα με το τελικό προϊόν οξέος. Τα συστατικά Polymyxin B, Acriflavin, Ceftazidime, και γλωριούχο λίθιο είναι επιλεκτικοί παράγοντες που καταστέλλουν τα Gram⁻ βακτήρια και ορισμένα Gram⁺. Τα συστατικά του συγκεκριμένου θρεπτικού υλικού παρουσιάζονται στον πίνακα 2.5.

Πίνακας 2.5: Συστατικά υλικού PALCAM Agar

Συστατικά	g/L
Columbia Peptone Mix	23.0
Sodium Chloride	5.0
Corn Starch	1.0
Yeast Extract	3.0
Glucose	0.5
Mannitol	10.0
Aesculin	0.8
Lithium Chloride	15.0
Ferric Ammonium Citrate	0.5
Phenol Red	0.08
Agar	12.0

Σε ότι αφορά τα συστατικά του επιλεκτικού μέσου X144 P.A.C. (κάθε φιαλίδιο περιέχει την εξής ποσότητα σε mg/L κάθε θρεπτικού συστατικού) (Πιν. 2.6).

Πίνακας 2.6: Συστατικά υλικού PALCAM Agar

Polymyxin B	5.0 mg / vial	10.0
Acriflavin	2.5 mg / vial	5.0
Ceftazidime	10.0 mg / vial	20.0

Η διαδικασία παρασκευής περιλαμβάνει τα εξής στάδια: σε μια φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 71.0g θρεπτικού υλικού στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min. Τη στιγμή που το υλικό απέκτησε τη θερμοκρασία των 47 °C περίπου (σε υδατόλουτρο) ακολούθησε υπό ασηπτικές συνθήκες η προσθήκη ενός φιαλιδίου με ενυδατωμένο επιλεκτικό μέσο X144 P.A.C. Το τελικό pH του θρεπτικού ήταν 7.2 ± 0.2 .

2.3 Βακτηριακό στέλεχος και προετοιμασία εμβολίου

Το βακτηριακό στέλεχος *L. monocytogenes* που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή είχε κωδικό B-127 και είχε παρόμοιο PFGE με το αντίστοιχο πρότυπο B-128. Το συγκεκριμένο στέλεχος προμηθεύτηκε από την Τράπεζα Μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων, του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πριν από τη χρήση, ο μικροοργανισμός φυλασσόταν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε ειδικά φιαλίδια με σφαιρίδια τύπου Protect. Για την αναγέννησή του μικροοργανισμού, μικρή ποσότητα μεταφέρθηκε, με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου, σε 10 ml θρεπτικού ζωμού TSB και ακολούθησε επώαση στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 24 h. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με τη μέθοδο της φυγοκέντρισης ($5000\text{ g} / 10\text{ min} / 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) και επαναιωρήθηκαν σε 10 ml διαλύματος MRD (0.85 % w/v NaCl, 0.1 % w/v repton) ως καθαρή καλλιέργεια ($10^8 - 10^9\text{ CFU} / \text{ml}$) με σκοπό να χρησιμοποιηθεί ως εμβόλιο για τις διαδικασίες θερμικής αδρανοποίησης.

2.4 Προετοιμασία δειγμάτων

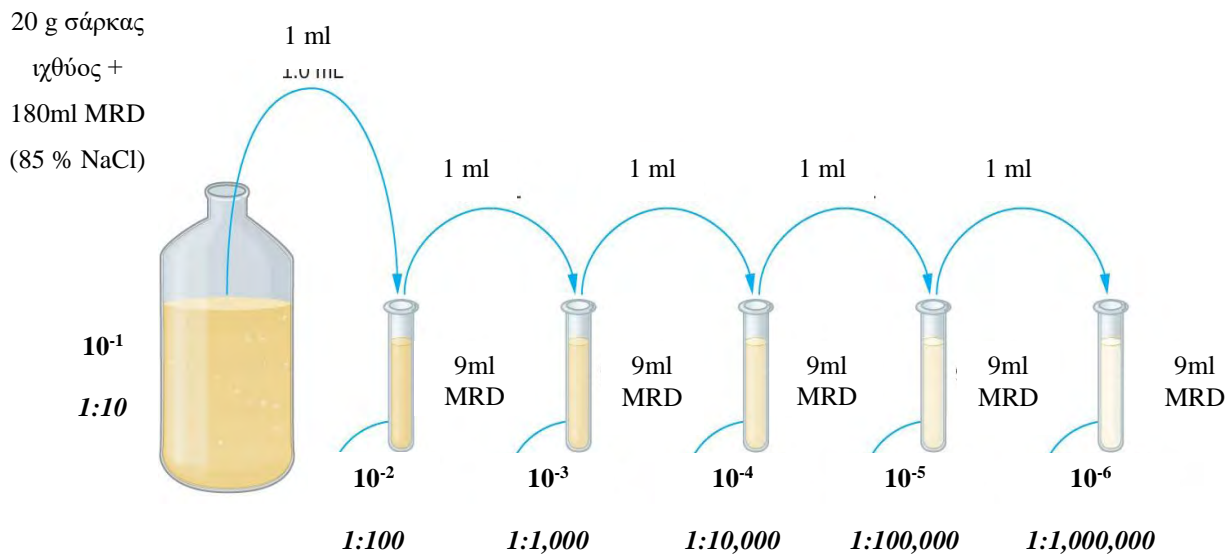
Κατά την πειραματική διαδικασία 20 g σάρκας ιχθύων τσιπούρας ελήφθησαν ασηπτικά εις τριπλούν ($n = 3$) σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (2, 4, 6, 8 και 10) και τεμαχίστηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε μικρά κομμάτια. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε PCS φόρμες αλουμινίου ψησίματος, εμβολιάστηκαν με 0.2 ml βακτηριακού εναιωρήματος *L. monocytogenes*, και αναμείχθηκαν με αποστειρωμένη λαβίδα έτσι ώστε το εμβόλιο να κατανεμηθεί σε όλη τη σάρκα. Τέλος, καλύφθηκαν με αλουμινοχαρτό και αφέθησαν για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό να απορροφηθεί το εμβόλιο.

2.5 Διαδικασία θερμικής επεξεργασίας

Οι μελέτες θερμικής αδρανοποίησης πραγματοποιήθηκαν σε εμπορικό φούρνο ψησίματος σε σταθερή θερμοκρασία 180 °C έτσι ώστε να γίνει προσομοίωση των πραγματικών συνθηκών ψησίματος του τροφίμου. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον προθερμασμένο φούρνο για 2, 4, 6, 8 και 10 min. Επιπλέον, τα δείγματα-μάρτυρες δεν υπέστησαν θερμική επεξεργασία, με σκοπό να καταμετρηθεί ο πληθυσμός του μικροοργανισμού.

2.6 Προετοιμασία δειγμάτων για απαρίθμηση μικροοργανισμού

Σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (2, 4, 6, 8 και 10 min) ελήφθησαν ασηπτικά τα 20 g σάρκας ιχθύων τσιπούρας, εις τριπλούν ($n = 3$), και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένη σακούλα Stomacher που περιείχε 180 ml αραιωτικού διαλύματος MRD (0.85 % w/v NaCl, 0.1 % w/v peptone) θερμοκρασίας 5 °C, με σκοπό να σταματήσει αμέσως η θερμική επεξεργασία και στη συνέχεια η σακούλα οδηγήθηκε σε συσκευή ομογενοποίησης, όπου τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν για 60 sec. Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων (εικ. 2.1) με μεταφορά 1 ml από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου.

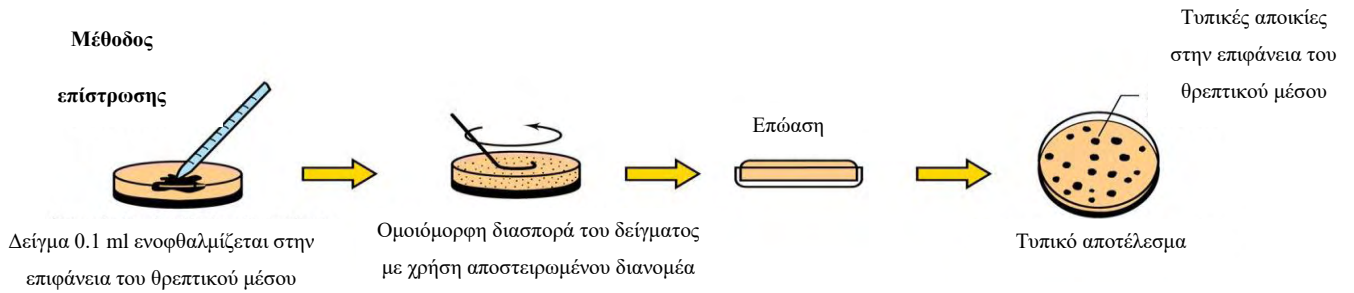


Εικόνα 2.1: Διαδικασία μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας των βακτηρίων, με την εφαρμογή σειράς διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός βακτηριακού εναιωρήματος γνωστού όγκου (0.1 ml) από κάθε αραιώση σε θρεπτικό υπόστρωμα με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (εικ. 2.2).

2.7 Επώαση δειγμάτων και απαρίθμηση μικροοργανισμού

Ο μικροοργανισμός που απαριθμήθηκε ήταν: *Listeria monocytogenes* σε PALCAM Agar με επικάλυμμα TSA + 0.6 % w/v yeast extract μετά από επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για 48 h, με καταμέτρηση των γκρι/πράσινων αποικιών με μαύρο δακτύλιο (Εικ. 2.2).



Εικόνα 2.2: Μέθοδοι μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας βακτηρίων με καταμέτρηση αποικιών επί τρυβλίο.

Ως μέτρο απαρίθμησης των θερμικά κατεστραμμένων μικροοργανισμών ορίστηκε ο συνολικός χρόνος θερμικού θανάτου, δηλαδή ο χρόνος διατήρησης σε σταθερή θερμοκρασία που απαιτείται για την επίτευξη προκαθορισμένης μείωσης της συγκέντρωσης. Η τιμή υπολογίστηκε από την αρνητική γραμμική συσχέτιση των επιζώντων πληθυσμών σε σχέση με τον χρόνο θέρμανσης. Η τιμή του F συνήθως αποδίδεται ως πολλαπλάσιο του χρόνου υποδεκαπλασιασμού D. Εάν π.χ. είναι επιθυμητή η μείωση του πληθυσμού κατά 99.9999 % ή 10^{-6} του αρχικού απαιτείται χρόνος $F = 6D$. Υψηλή τιμή σημαίνει χαμηλός ρυθμός θανάτου και αντίστροφα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Προσδιορισμός χρόνου δεκαδικής μείωσης πληθυσμού

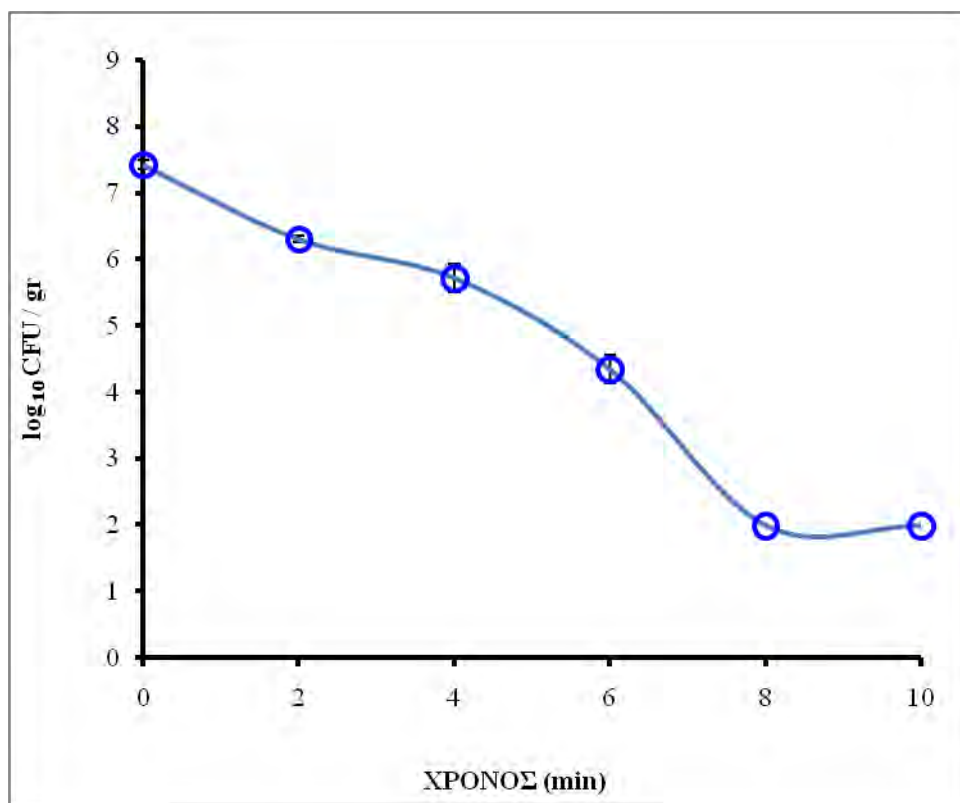
Στο σχήμα 3.1 παρουσιάζεται η μεταβολή (\log_{10} CFU / g) του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε ταρτάρ σάρκας τσιπούρας μετά από θερμική επεξεργασία στους 180 °C για χρονικό διάστημα 2, 4, 6, 8 και 10 min (Πιν. 3.1). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου κατά μία λογαριθμική μονάδα συνέβη τάχιστα και μάλιστα σε χρόνο μικρότερο από 2 min. Πιο συγκεκριμένα, ο αρχικός πληθυσμός των βακτηρίων ήταν ίσος με $7.43 \pm 0.06 \log_{10}$ CFU / g, δηλαδή στα δείγματα που δεν υπέστησαν θερμική επεξεργασία, ενώ μόλις μετά από 2 min ψησίματος ο πληθυσμός μειώθηκε στους $6.31 \pm 0.05 \log_{10}$ CFU / g. Παρόμοια συμπεριφορά αποδείχτηκε με την περαιτέρω αύξηση του χρόνου ψησίματος. Πιο συγκεκριμένα, μετά από 4 min ψησίματος ο πληθυσμός άγγιξε τους $5.72 \pm 0.22 \log_{10}$ CFU / g και τελικά έπεσε στους $4.35 \pm 0.21 \log_{10}$ CFU / g μετά από 6 min ψησίματος. Τέλος, μετά τα 8 min ψησίματος ο πληθυσμός παρέμεινε κάτω από το όριο ανίχνευσης των $2.00 \log_{10}$ CFU / g, Αυτό πρακτικά σημαίνει πως η αύξηση του χρόνου ψησίματος οδηγεί σε σημαντική μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου.

Πίνακας 3.1: Μεταβολή του πληθυσμού του βακτηριακού στελέχους σε σχέση με το χρόνο ψησίματος στους 180 °C.

Χρόνος θερμικής επεξεργασίας (min)	log CFU/g	Τυπική απόκλιση
0	7.43	0.06
2	6.31	0.05
4	5.72	0.22
6	4.35	0.21
8	<2.00	-
10	<2.00	-

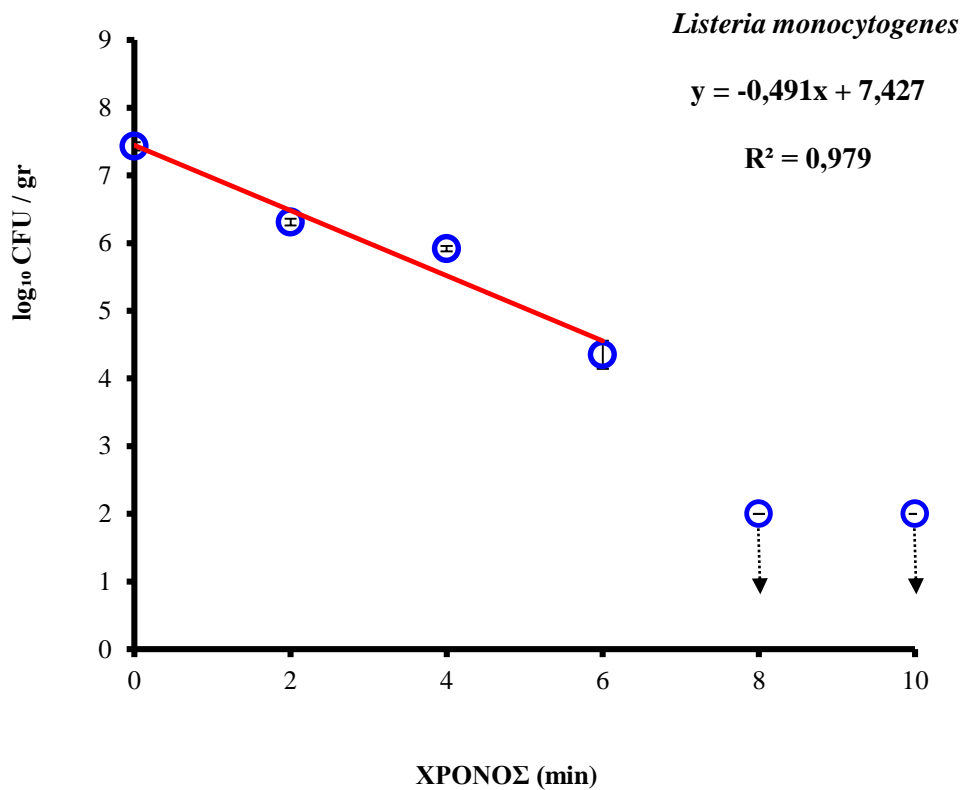
Η μείωση του πληθυσμού σε σχέση με το χρόνο παρουσιάζεται στο σχήμα 3.1. Ειδικότερα, μέσα στα πρώτα δύο λεπτά παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes*, η οποία μετά από 8 λεπτά σταμάτησε πλέον να παρατηρείται. Στο διάγραμμα τούριο ανίχνευσης ήταν η τιμή 2.0 log CFU/g. Τιμές κάτω από αυτή την τιμή δεν παρατηρήθηκαν.

Σχήμα 3.1. Λογαριθμική μείωση (\log_{10} CFU / g) του πληθυσμού του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes* σε ταρτάρ σάρκας τσιπούρας μετά την θερμική επεξεργασία στους 180 °C σε εμπορικό φούρνο ψησίματος.



Στο σχήμα 3.2 σημαντικές είναι δύο παράμετροι: α) ο συντελεστής συσχέτισης R^2 και η κλίση. Ο συντελεστής συσχέτισης εκφράζει τη συσχέτιση μεταξύ του χρόνου ψησίματος και του πληθυσμού του βακτηρίου και ιδανικά σε γραμμικά μοντέλα μείωσης του πληθυσμού με το χρόνο θα έπρεπε να ισούται με τη μονάδα. Από την άλλη η κλίση εκφράζει το ρυθμό μείωσης του πληθυσμού του

μικροοργανισμού και επομένως το μέγιστο ρυθμό θανάτωσής του. Επομένως, η τιμή R^2 δείχνει το κατά πόσο καλή είναι η προσαρμογή των δεδομένων στην καμπύλη ενώ η τιμή κλίσης (rate) χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του χρόνος θερμικού θανάτου ($=1/\text{rate}$). Έτσι, ο χρόνος δεκαδικής μείωσης του πληθυσμού ήταν ίσος με την τιμή $\left(-\frac{1}{-a}\right) = \left(-\frac{1}{-0.491}\right) = 2,04 \text{ min.}$



Σχήμα 3.2: Διάγραμμα υπολογισμού ρυθμού θανάτου του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes* σε ταρτάρ σάρκας τσιπούρας μετά την θερμική επεξεργασία στους 180 °C σε εμπορικό φούρνο ψησίματος.

Σύμφωνα με το σχήμα 3.2 όπου παρουσιάζεται η γραμμική συσχέτιση του επιζώντος πληθυσμού σε σχέση με το χρόνο, η εξίσωση που περιγράφει τη σχέση αυτή, καθώς αποτυπώνεται και ο ρυθμός θανάτου του πληθυσμού του συγκεκριμένου παθογόνου βακτηρίου, αποδεικνύεται ότι το μοντέλο έχει πολύ καλή προσαρμοστικότητα με το συντελεστή συσχέτισης να βρίσκεται κοντά στην μονάδα.

Επομένως, φαίνεται ότι η μέθοδος θερμικής επεξεργασίας σε αλιεύματα (για το παθογόνου μικροοργανισμό *L. monocytogenes*) ενδείκνυται για εφαρμογές στον τομέα της επεξεργασίας τροφίμων. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων όπως εκφράζεται από τη διασπορά είναι ιδιαίτερα ικανοποιητική γεγονός που αποδεικνύει την πιστότητα του μοντέλου. Ιδιαίτερα ενθαρρυντική είναι και η τιμή του θερμικού ρυθμού θανάτου που αποδεικνύει πως μόλις σε ελάχιστο χρόνο επέρχεται απενεργοποίηση του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας συμφωνούν με παρόμοιες εργασίες που αφορούν τη θερμική επεξεργασία για την καταστροφή του συγκεκριμένου παθογόνου μικροοργανισμού (Awuah et al., 2007; Hassani et al., 2005; Soysal & Söylemez, 2005; Tajchakavit & Ramaswamy, 1997; Tajchakavit et al., 1998; Zheng & Hongfei, 2011). Σε μερικές εργασίες βέβαια έχει αποδειχτεί μη καλή γραμμική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου θέρμανσης και του πληθυσμού του μικροοργανισμού (Fernández et al., 2007; Peleg, Pechina, & Col, 2001; Valdramidis et al., 2006). Γενικά, όπως αναμενόταν η αύξηση του χρόνου παραμονής στους 180 °C οδήγησε σε σημαντική μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes*. Ο ρυθμός θερμικού θανάτου ήταν ιδιαίτερα συγκρίσιμος με αντίστοιχες τιμές που απαντώνται στη διεθνή βιβλιογραφία και αφορούν διάφορα τρόφιμα (Hassanietal., 2005; Tajchakavit et al., 1998; Van Asselt & Zwietering, 2006). Για την καλύτερη συγκριτική μελέτη της τιμής του ρυθμού θανάτου πολύ σημαντικό ρόλο παίζει και η σύσταση του τροφίμου σε λίπος. Γενικά, η *L. monocytogenes* έχει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε τρόφιμα με υψηλό περιεχόμενο σε λίπος, όπως η τσιπούρα (Doyle et al., 2001).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η σύγκριση των αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης εργασίας με τα αποτελέσματα από τη μελέτη της ομάδας Wood και συνεργατών του (2015), οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση του θερμικού στρες της *L. monocytogenes* σε έτοιμα προς κατανάλωση γεύματα θαλασσινών. Από την εργασία τους προσδιορίστηκε η τιμή D70 (τιμή D σε 70°C), δηλαδή ένα ήπιο θερμικό σοκ σε συνθήκες θέρμανσης έτοιμων προς κατανάλωση γευμάτων. Η τιμή προσδιορίστηκε

συγκρίνοντας δείγματα τα οποία υπέστησαν θερμική επεξεργασία και σε δείγματα που δεν υπέστησαν θερμική επεξεργασία. Από τα αποτελέσματα αποδείχτηκε ότι τα δείγματα που υπέστησαν θερμικό στρες εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερες τιμές D σε σύγκριση με τα μη θερμασμένα δείγματα. Παρόλα αυτά μετά από 48 ώρες, οι τιμές επέστρεψαν στα επίπεδα των μη θερμασμένων δειγμάτων. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας γίνεται φανερό πως η ήπια θέρμανση δεν επιφέρει πλήρη καταστροφή του βακτηρίου καθώς υπάρχουν φαινόμενα ανάνηψης. Αντίθετα, στην περίπτωση της θέρμανσης σε υψηλή θερμοκρασία όπως έγινε στην παρούσα μελέτη η καταστροφή του βακτηρίου είναι πλήρης και σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα.

4.2 Συμπεράσματα εργασίας

Τα βασικότερα συμπεράσματα της εργασίας συνοψίζονται παρακάτω:

- ✓ Σημαντική μείωση του πληθυσμού κατά τουλάχιστον μία λογαριθμική μονάδα επήλθε σε μόλις δύο λεπτά θερμικής επεξεργασίας. Ο χρόνος θερμικής επεξεργασίας και η θερμοκρασία επαρκεί για την ασφαλή κατανάλωση ιχθυρών.
- ✓ Προτείνεται η περαιτέρω μελέτη της θερμικής επεξεργασίας του τροφίμου σε μικρότερες θερμοκρασίες αλλά και με διαφορετικούς τρόπους θερμικής επεξεργασίας ώστε να επιτευχθεί ο καλύτερος τρόπος μαγειρέματος χωρίς την απώλεια θρεπτικών συστατικών.

Επιπλέον,

- ✓ η θερμοκρασία των 180 °C είναι ικανή να αδρανοποιήσει τη *Listeria monocytogenes* σε μικρό χρονικό διάστημα,
- ✓ χρόνος επεξεργασίας 8 λεπτών ήταν επαρκής για να μειώσει τον πληθυσμό πάνω από 5 λογάριθμους (από την αρχική τιμή 7 σε κάτω από 2 cfu/g),
- ✓ η τιμή του χρόνου θερμικού θανάτου (2.04 min) είναι ιδιαίτερα ικανοποιητική συγκρινόμενη με τη διεθνή βιβλιογραφία,
- ✓ το μοντέλο είχε καλή γραμμική απόκριση με βάση το συντελεστή συσχέτισης,
- ✓ η διασπορά των πειραματικών τιμών ήταν μικρή

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Adams M. R., Moss M. O. (2008). Food Microbiology. 3rd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Alocilja E. C., Radke S. M. (2003). Market analysis of biosensors for food safety. *Biosensors & Bioelectronics*, 18:841-846.
- Awuah G. B., Ramaswamy H. S., Economides A. (2007). Thermal processing and quality: Principles and overview. *Chemical Engineering and Processing*, 46: 584-602.
- Chemburu S., Wilkins E., Abdel-Hamid I. (2005). Detection of pathogenic bacteria in food samples using highly-dispersed carbon particles. *Biosensors and Bioelectronics*, 21:491-499.
- Chilled Food Association: Cuidelines for Good Hygiene Practice in the Manufacture, Distribution and retail Sale of Chilled Foods, London, 1989.
- Doyle M.E., Mazzotta A.S., Wang T., Wiseman D.W., Scott V.N. (2002) Heat-resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 64:410-429.
- Doyle M. E., Mazzotta A. S., Wang T., Wiseman D. M., Scott. V. N. (2001). Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 64:419-429.
- Farber J. M., Peterkin P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55:476-511.
- Fernández A., López M., Bernardo A., Condó S., Raso J. (2007). Modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. *Food Microbiology*, 24:372-379.
- Gandhi M., Chikindas M.L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113:1-15.
- Gram L., Dalgaard P. (2002). Fish spoilage bacteria--problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:262-266.
- Gray M. L., Killinger A. H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological Reviews*, 30:309-382.
- Harrigan W.F., Park R.W.A. Making safe food, A management guide for microbiological quality, Academic press, New York, 1991.
- Hassani M., Álvarez I., Raso J., Condón S., Pagán R. (2005). Comparing predicting models for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* at different pH. *International Journal of Food Microbiology*, 100:213-222.
- Henry B.S. (1933). Dissociation in the genus *Brucella*. *Journal of Infectious Diseases*, 52: 374-402.
- Junttila J. R., Niemela S. I., Hirn J. (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 65:321-327.
- Koutsoumanis K., Sofos N.J. (2005). Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 104:83-91.
- Lado B.H., Yousef A.E. (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* Important to Food Processors. In "*Listeria, Listeriosis and Food Safety*", edited by E.T. Ryser and E.H. Marth. 3rd edition. CRC Press. Boca Raton. (pp 190-192).
- Lou Y., Yousef A.E. (1999). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors, p. 131-224. In E.T. Ryser and E.H. Marth. Eds. *Listeria, listeriosis and food safety*. 2nd edition Marcel Dekker, New York.

- Lou Y., Yousef A.E. (1997). Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:1252-1255.
- Mackey B.M., Bratcell N. (1989) A review: the heat-resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 9:89-94.
- Mead P. S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L. F., Bresee J. S., Shapiro C., Griffin P. M., Tauxe R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5:607-625.
- Montville T.J., Matthews K. (2005) *Food Microbiology: An Introduction*. ASM Press, Washington DC.
- Nolan D. A., Chamblin D. C., Troller J. A. (1992). Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology*, 16:323-335.
- Peel M., Donachie W., Shaw A. (1988). Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *Journal of general microbiology*, 134:2171–2178.
- Peleg M., Penchina C. M., Col M. B. (2001). Estimation of the survival curve of *Listeria monocytogenes* during non-isothermal treatments. *Food Research International*, 34:383-388.
- Pine L., Malcolm G. B., Brooks J. B., Daneshvar M. I. (1989). Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 35:245–254.
- Raptopoulou K., Pasiadis I.N., Thomaidis N.S., Proestos C., *The Effects of Food Processing and Canning Technologies on the Nutritional Value of Foods in Agricultural Research Updates*, Volume 11, Nova Science Publishers, 2015, pp 117-131 (ISBN: 978-1-63482-968-7).
- Sorqvist S. (1994). Heat-resistance of different serovars of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 76:383-388.
- Soysal Ç., Söylemez Z. (2005). Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. *Journal of Food Engineering*, 68:349-356.
- Tajchakavit S., Ramaswamy H. S. (1997). Thermal vs. microwave inactivation kinetic of pectin methylesterase in orange juice under batch mode heating conditions. *LWT —Food Science and Technology*, 30:85-93.
- Tajchakavit S., Ramaswamy H. S., Fustier P. (1998). Enhanced destruction of spoilage microorganisms in apple juice during continuous flow microwave heating. *Food Research International*, 31:713-722.
- Tauxe R. V., Doyle M. P., Kuchenmüller T., Schlundt J., Stein C. E. (2010). Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, 139:S16-S28.
- Trickett J. *The Prevention of Food Poisoning*, 3rd Edition, Stanley Thornes (Publishers) Ltd., London, 1992.
- Trickett J. *Food Hygiene for Food Handlers*, 2nd Edition, MacMillan Press Ltd., London, 1997.
- Tryfinopoulou P., Tsakalidou E., Nychas G.-J. E. (2020). Characterization of *Pseudomonas* spp. Associated with Spoilage of Gilt-Head Sea Bream Stored under Various Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 65–72.
- Valdramidis V.P., Geeraerd A.H., Gaze J.E., Kondjoyan A., Boyd A.R., Shaw VanAsselt E. D., et al. (2006). A systematic approach to determine global

- thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 107:73-82.
- Walker S. J., Archer P., Banks J.G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *The Journal of Applied Bacteriology*, 68:157-162.
- Wang Y., Qin Y., Zhang Y., Wu R., Li P. (2019). Antibacterial mechanism of plantaricin LPL-1, a novel class IIa bacteriocin against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 97:87-93.
- Wood M.V., Sreedharan A., Silverberg R., Balaguero A.N., Schneider K.R. (2015). The Effects of Heat Shock on the D-Values of *Listeria monocytogenes* on Selected Seafood Matrices. *Advances in Microbiology*, 5:580-585.
- Wu V.C.H. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*, 25:735–744.
- Wu V.C.H., Fung D.Y.C., Kang D.H. (2001). Evaluation of thin agar layer method for recovery of cold-injured foodborne pathogens. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 9:11–25.
- Zheng H., Hongfei L. (2011). Effect of microwave pretreatment on the kinetics of ascorbic acid degradation and peroxidase inactivation in different parts of green asparagus (*Asparagus officinalis* L.) during water blanching. *Food Chemistry*, 128:1087-1093.

Ελληνική βιβλιογραφία

- Βέρδος Ι. Γ (2017). Αξιολόγηση της αντιβιοϋμενικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes*. Μεταπτυχιακή-Διπλωματική εργασία. Εργαστήριο μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας τροφίμων. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Γεωργάκης Σ.Α., Βαρελτζής Κ.Π., Αμβροσιάδης Ι.Α., (2002) Τεχνολογία Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, 2^η έκδοση, 531-533.
- ΕΦΕΤ (2004). Εγχειρίδιο Βασικής Εκπαίδευσης αναθ.13.
- Εφημερίδα της κυβερνήσεως της Ελληνικής Δημοκρατίας, Κοινή Υπουργική Απόφαση 487 (ΦΕΚ 1219B-04.10.2000) Υγιεινή των τροφίμων σε συμμόρφωση με την Οδηγία 93/43/ΕΟΚ του Συμβουλίου
- Τσαλούμη Κ. Σ. (2019). Πρόβλεψη της ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε θερμικά επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος που κόβονται σε φέτες στα σημεία λιανικής πώλησης. Μεταπτυχιακή διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Διαδικτυακή αναζήτηση

www.fao.org (τελευταία επίσκεψη 05/01/2020)