

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ :

**Επιδράσεις του οξονοποιημένου νερού στο μικροβιολογικό φορτίο
και τις οργανοληπτικές ιδιότητες φρέσκων οπωροκηπευτικών**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ:

ΓΩΓΟΣ ΠΕΤΡΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2014

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΜΑΥΡΟΜΑΤΗΣ (Επιβλέπων)
Επίκουρος Καθηγητής
2. ΑΡΒΑΝΙΤΟΓΙΑΝΝΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ (Μέλος)
Καθηγητής
3. ΤΣΑΚΑΛΩΦ ΑΝΔΡΕΑΣ (Μέλος)
Επίκουρος Καθηγητής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υγιεινή και ασφάλεια των τροφίμων σε συνδυασμό με την ποιότητα είναι τα σημαντικότερα κριτήρια επιλογής για τη διατροφή του ανθρώπου. Τα λαχανικά αποτελούν βασικό μέρος της διατροφής και για το λόγο αυτό, πρέπει να είναι απαλλαγμένα από μικρόβια και επιβλαβείς μικροοργανισμούς. Η απαλλαγή των νωπών λαχανικών από επιβλαβείς μικροοργανισμούς μπορεί να επιτευχθεί με την εφαρμογή τεχνικών απολύμανσης, οι οποίες θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από απλότητα, οικονομία και αποτελεσματικότητα. Το ξέπλυμα με τρεχούμενο νερό βρύσης, η χρήση χλωριούχων σκευασμάτων και η εφαρμογή ακτινοβολιών, εφαρμόζονται με επιτυχία για μια μακρά σειρά ετών ενώ άλλες μέθοδοι όπως η χρήση του όζοντος προτείνονται από οργανισμούς υγείας ορισμένων χωρών ως μια πολύ καλή, απλή και οικονομική τεχνική απολύμανσης των λαχανικών, αναγνωρισμένη για την ασφάλεια χρήσης της σε οικιακό και βιομηχανικό επίπεδο.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης συνθετικής εργασίας παρουσιάζονται πληροφορίες για το όζον, καθώς και τα πλεονεκτήματα, τα μειονεκτήματα και τις προοπτικές χρήσης του σε σχέση με το χλώριο. Ακολουθώντας, αναλύεται η ασφάλεια, ο μηχανισμός αντίδρασης και η μικροβιακή δράση του όζοντος. Στη συνέχεια παρουσιάζονται στοιχεία ανασκόπησης των απολυμαντικών μέσων και περιγράφονται οι μικροοργανισμοί (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella Spp.* και *Enterobacteriaceae*) που συναντώνται συνήθως στα νωπά λαχανικά καθώς και οι συνέπειές τους στην υγεία των καταναλωτών. Επίσης αναφέρονται οι ορισμοί και η νομοθεσία που αφορούν την αντιμετώπιση των συγκεκριμένων τεσσάρων μικροοργανισμών. Όσον αφορά την ποιότητα και την αντίληψη της γεύσης από τους καταναλωτές, παρουσιάζονται οι παράμετροι των οργανοληπτικών ελέγχων βάσει διαφόρων προτύπων ISO.

Όσον αφορά το πειραματικό μέρος, αναφέρεται ο πειραματικός σχεδιασμός, οι στόχοι και ο τελικός σκοπός της εργασίας, τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν, το φυτικό είδος και οι τύποι νωπών λαχανικών που αναλύθηκαν, ο

τόπος και ο τρόπος δειγματοληψίας, καθώς και η διαδικασία του οργανοληπτικού ελέγχου που εφαρμόστηκε. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων και όσον αφορά τον μικροβιολογικό έλεγχο βρέθηκε ότι τα λαχανικά είναι απαλλαγμένα από *E. coli*, *L. monocytogenes* και *Salmonella spp.* σε όλα τα δείγματα και για όλες τις μεταχειρίσεις (*Control*, *H2O*, *Cl*, *O3*). Αντίθετα *Enterobacteriaceae* βρέθηκαν στα τέσσερα από τα έξι δείγματα μαρουλιών ενώ η απολύμανση με το όζον φάνηκε περισσότερο αποτελεσματική για τα συγκεκριμένα μικρόβια σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις (*Control*, *H2O*, *Cl*) που εφαρμόστηκαν. Επίσης και στα έξι δείγματα μπρόκολου που εξετάστηκαν βρέθηκαν *Enterobacteriaceae* ενώ και σε αυτή την περίπτωση η μεταχείριση με όζον έδωσε και πάλι τα καλύτερα αποτελέσματα. Η μείωση του φορτίου των εντεροβακτηριακών είναι παντού κλιμακωτή, *Control* > *H2O* > *Cl* > *O3*. Τα μαρούλια που πλύθηκαν με οζονοποιημένο νερό έχουν μεγαλύτερη φωτεινότητα, λιγότερο πικρή και περισσότερο γλυκιά γεύση και καλύτερη συνολική εντύπωση. Επίσης έχουν πιο έντονο πράσινο χρώμα, είναι περισσότερο χυμώδης και τρυφερά, ενώ παράλληλα είναι και λιγότερο στυφά. Τα μπρόκολα που πλύθηκαν με οζονοποιημένο νερό έχουν την καλύτερη βελτίωση στο χρώμα, την φωτεινότητα, την γλυκιά γεύση, την τρυφερότητα και την συνολική εντύπωση.

“Effect of Ozonated Water in Microbiological load and Sensory Analysis to Fresh Vegetables”

Abstract

Hygiene and food safety combined with quality is the most important selection criteria for human consumption. Vegetables are an essential part of the diet and for this reason must be free from germs and harmful microorganisms. The discharge of fresh vegetables from harmful microorganisms can be achieved by applying techniques of disinfection, which should be characterized by simplicity, economy and efficiency. The rinsing with tap water, the use of chloride formulation and implementation of radiation, applied successfully for years while other methods such using ozone recommended by health organizations in some countries as a good, simple and economic technique disinfecting vegetables, recognized for safety of use in domestic and industrial level.

This work presents information about ozone and its advantages and disadvantages related to chlorine. Afterwards, is analyzed the ozone security, the mechanism of reaction and the microbial activity of ozone. In the following chapters, are presented evidence review of disinfectants and described microorganisms (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella Spp.*, and *Enterobacteriaceae*) which are commonly found in fresh vegetables and their impact on consumer health. Also, the terms and the law relating to the treatment of these four microorganisms. Regarding the quality and taste perception by consumers, presented the organoleptic parameters based controls various standards ISO.

Regarding the experimental part, indicating the experimental design, the targets and the ultimate purpose of the work, the materials and the methods used, the plant species and types of fresh vegetables analyzed, the place and method of sampling, and the organoleptic procedure was applied. The results of experiments during the microbiological examination conclude that vegetables are free of *E. coli*, *L. monocytogenes* and *Salmonella spp.* in all samples for all treatments (Control, H₂O, Cl, O₃). Instead *Enterobacteriaceae* found in four of the six samples of lettuce while disinfection with ozone appeared more effective for specific microbes compared to the

other treatments (Control, H₂O, Cl) applied. Also, in all six samples tested broccoli Enterobacteriaceae was found while in this case the treatment with ozone again gave the best results. The load reduction of Enterobacteriaceae is banded , Control> H₂O> Cl> O₃. The lettuce washed with ozonated water have higher brightness, less bitter and more sweet taste and better overall impression. We also have more intense green color, is more juicy and tender , while being less astringent . Broccoli washed with ozonated water have better improvement in color, brightness, sweetness, tenderness and overall impression.

Περιεχόμενα

A. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	11
B. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	12
Γ. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	13
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	14
2. ΟΖΟΝ.....	19
2.1 Ασφάλεια του όζοντος.....	19
2.2 Μηχανισμός αντίδρασης του όζοντος.....	20
2.3 Μικροβιακή δράση του_όζοντος.....	21
3.ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ.....	23
4. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ & ΤΡΟΦΙΜΑ.....	34
4.1 ESCHERICHIA COLI.....	34
4.1 Μορφολογία.....	34
4.2 Καλλιέργεια.....	34
4.3 Βιοχημικές ιδιότητες.....	35
4.4 Οικολογία.....	36
4.5 Νόσοι από <i>E. coli</i>	36
5. LISTERIA MONOCYTOGENES.....	37
5.1 Μορφολογία.....	37
5.2 Καλλιέργεια.....	37

5.3 Βιοχημικές Ιδιότητες.....	38
5.4 Αντοχή.....	39
5.5 Οικολογία.....	39
5.6 Νόσοι από <i>Listeria monocytogenes</i>	40
6. SALMONELLA SPP.....	42
6.1 Μορφολογία.....	42
6.2 Καλλιέργεια.....	43
6.3 Βιοχημικές ιδιότητες.....	43
6.4 Αντοχή.....	44
6.5 Νόσοι από <i>Salmonella Spp</i>	44
7. ENTEROBACTERIACEAE.....	45
7.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	45
7.2 Ταξινόμηση.....	46
7.3 Καλλιέργεια.....	47
7.4 Βιοχημικές ιδιότητες.....	48
7.5 Νόσοι από Εντεροβακτηριακά.....	50
8. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗΣ.....	51
8.1 Μέθοδος καταμέτρησης <i>E. coli</i> - ΕΛΟΤ EN ISO 9038-1:2000.....	51
8.2 Μέθοδος καταμέτρησης <i>Listeria monocytogenes</i> ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004.....	52

8.3 Μέθοδος καταμέτρησης <i>Salmonella spp.</i> ΕΛΟΤ EN ISO 6579:2003 / TC1:2004.....	53
8.4 Μέθοδος καταμέτρησης Εντεροβακτηριακών - Statutory Instrument SI 2383,1989 και BS 4285:3.7.....	54
9. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ.....	55
9.1 Ορισμοί.....	55
9.2 Νομοθεσία.....	56
10. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	57
10.1 Οργανοληπτικός έλεγχος τροφίμων.....	57
10.2 Βασικές αισθήσεις.....	57
10.2.1 Γεύση.....	59
10.2.2 Όσφρηση.....	60
10.2.3 Όραση.....	61
10.2.4 Υφή.....	61
10.2.5 Ακοή.....	62
10.3 Βασικές αρχές οργανοληπτικού ελέγχου.....	63
10.3.1 Οργάνωση και σχεδίαση οργανοληπτικής μελέτης.....	63
10.3.2 Διαδικασία δοκιμής.....	64
10.3.3 Απόδοση δοκιμαστών.....	65

10.3.4 Εγκαταστάσεις.....	66
10.4 Βασικές μέθοδοι στην Οργανοληπτική Αξιολόγηση Τροφίμων.....	68
10.4.1 Αξιολογητές – Δοκιμαστές.....	69
10.4.2 Κλασικές Μέθοδοι Οργανοληπτικού Ελέγχου.....	70
10.5 Αξία οργανοληπτικού ελέγχου.....	73
11. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	74
12. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	75
12.1 ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ.....	75
12.1.1 Θρεπτικά υποστρώματα.....	75
12.1.2 Οργανικά χημικά.....	75
12.2 ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	76
12.2.1 Σκεύη.....	76
12.2.2 Όργανα και συσκευές.....	76
12.3 Μικροοργανισμοί που θα εξεταστούν και οι μέθοδοι καταμέτρησης τους.....	78
12.3.1 Δειγματοληψία.....	79
12.3.2 Μεταχειρίσεις.....	80
12.3.3 Χλώριο.....	81
12.3.4 Όζον.....	81
12.3.5 Μεταχειρίσεις του δείγματος.....	82
12.3.5.1 Διαδοχικές αραιώσεις.....	82

12.3.5.2	Ενοφθαλμισμός θρεπτικών υποστρωμάτων για <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> και <i>Salmonella</i> Spp.....	83
12.3.5.3	Ενοφθαλμισμός θρεπτικών υποστρωμάτων για Enterobacteriaceae.....	84
12.3.5.4	Επώαση θρεπτικών υποστρωμάτων.....	85
12.3.5.5	Καταμέτρηση αποικιών.....	85
12.3.5.6	Καλλιέργεια σε TSA άγαρ.....	86
12.3.5.7	Δοκιμή Οξειδάσης.....	87
12.3.5.8	Ταυτοποίηση Σύστημα Microgen Listeria – ID και Σύστημα GN-ID A+B PANEL. για <i>Salmonella</i> spp.....	87
13.	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ.....	89
14.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	91
14.1	Αποτελέσματα μικροβιολογικού ελέγχου στο μαρούλι (Control, H ₂ O, Cl, O ₃).....	93
14.2	Αποτελέσματα μικροβιολογικού ελέγχου στο μπρόκολο (Control, H ₂ O, Cl, O ₃).....	98
14.3	Στατιστική ανάλυση οργανοληπτικού ελέγχου.....	103
14.3.1	Στατιστική ανάλυση οργανοληπτικού ελέγχου στο μαρούλι.....	104
14.3.2.	Στατιστική ανάλυση οργανοληπτικού ελέγχου στο.....	113
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	123
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	124
	ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	126
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	127

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα αυτής της συνδυαστικής μελέτης, ανασκόπησης και πειραματικής εφαρμογής κ. Μαυρομάτη Αθανάσιο Επίκουρο Καθηγητή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για την πολύτιμη βοήθεια ώστε να διεκπεραιωθεί άρτια η συγκεκριμένη μελέτη. Επίσης ευχαριστώ τον κ. Αρβανιτογιάννη Ιωάννη Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών για τις συμβουλές και την βοήθεια που μου προσέφερε, την κα. Κατσαφλιάκα Άννα (Μικροβιολόγος και υπεύθυνη του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας) και το προσωπικό του εργαστηρίου. Τέλος ευχαριστώ την ομάδα των οργανοληπτών που συνέβαλε στο πείραμα και την οικογένεια μου που με στηρίζει σε κάθε μου βήμα.

Κατάσταση πινάκων

Πίνακας 1. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα / περιορισμοί της χρήσης του όζοντος και του χλωρίου ως μέσα απολύμανσης στα φρεσκοκομμένα λαχανικά

Πίνακας 2. Πίνακας ανασκόπησης απολυμαντικών μέσων

Πίνακας 3. Βιοχημικές ιδιότητες των κυριοτέρων εντεροβακτηριακών

Πίνακας 4. Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν

Πίνακας 5. Θρεπτικά υποστρώματα, θερμοκρασία και χρόνος επώασης

Πίνακας 6. Φόρμα αξιολόγησης

Πίνακας 7. Συνολικά μικροβιολογικά αποτελέσματα για μαρούλι

Πίνακας 8. Συνολικά μικροβιολογικά αποτελέσματα για μπρόκολο

Πίνακας 9. Variables Entered/Removed^{a,b,c,d}

Πίνακας 10. Classification Function Coefficients

Πίνακας 11. Classification Results^{a,c}

Πίνακας 12. Wilks Lambda

Πίνακας 13. Standardized Canonical Discriminant Function

Πίνακας 14. Function at Group Centroids

Πίνακας 15. Variables Entered/Removed^{a,b,c,d}

Πίνακας 16. Classification Function Coefficients

Πίνακας 17. Classification Results^{a,c}

Πίνακας 18. Wilks Lambda

Πίνακας 19. Standardized Canonical Discriminant Function

Πίνακας 20. Function at Group Centroids

Κατάσταση διαγραμμμάτων

Διάγραμμα 1. Οξειδωτικές αντιδράσεις των ενώσεων κατά την οζονοποίηση του νερού

Διάγραμμα 2. Οργάνωση για την διεξαγωγή της οργανοληπτικής μελέτης

Διάγραμμα 3. Μαρούλι 1A, 1B, 1Γ, 1Δ

Διάγραμμα 4. Μαρούλι 2A, 2B, 2Γ, 2Δ

Διάγραμμα 5. Μαρούλι 3A, 3B, 3Γ, 3Δ

Διάγραμμα 6. Μαρούλι 6A, 6B, 6Γ, 6Δ

Διάγραμμα 7. Μπρόκολο 1A, 1B, 1Γ, 1Δ

Διάγραμμα 8. Μπρόκολο 2A, 2B, 2Γ, 2Δ

Διάγραμμα 9. Μπρόκολο 3A, 3B, 3Γ, 3Δ

Διάγραμμα 10. Μπρόκολο 4A, 4B, 4Γ, 4Δ

Διάγραμμα 11. Μπρόκολο 5A, 5B, 5Γ, 5Δ

Διάγραμμα 12. Μπρόκολο 6A, 6B, 6Γ, 6Δ

Διάγραμμα 13. 14. 15. 16. Canonical Discriminant Functions

Διάγραμμα 17. 18. Discriminat Scores from Function 1 for Analysis 1

Διάγραμμα 19. Cluster διάγραμμα

Διάγραμμα 20. Διάγραμμα μεταχείρισης – επανάληψης.

Διάγραμμα 21. 22 23. 24. Canonical Discriminant Functions

Διάγραμμα 25. 26. Discriminat Scores from Function 1 for Analysis 1

Διάγραμμα 27. Cluster διάγραμμα

Διάγραμμα 28. Διάγραμμα μεταχείρισης – επανάληψης.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φρούτα και τα λαχανικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην καθημερινή διατροφή του ανθρώπου. Όλοι θέλουν ποιοτικά και ασφαλή προϊόντα, απαλλαγμένα όσο το δυνατόν από επιβλαβείς μικροοργανισμούς. Η ποιότητα και η ασφάλεια των οπωροκηπευτικών προσδιορίζει την αξία του προϊόντος για τον καταναλωτή και είναι αποτέλεσμα τόσο της παραγωγής όσο και ένας συνδυασμός από παραμέτρους που περιλαμβάνουν την εμφάνιση, την υφή, την γεύση και την θρεπτική αξία. Το κριτήριο των καταναλωτών όσον αφορά την ποιότητα των φρούτων και των λαχανικών βασίζεται στην εμφάνιση και την φρεσκάδα του προϊόντος κατά τη διάρκεια της αγοράς τους. Κάποιοι καταναλωτές βασίζουν την επιλογή τους στην γεύση και την υφή. Κάποιοι άλλοι στην ποιότητα και την ασφάλεια των οπωροκηπευτικών **(Rico et al. 2007)**. Μια απλή, οικονομική και γρήγορη μέθοδος για τη βελτίωση των φρούτων και των λαχανικών σε διάφορους τομείς είναι η οζονοποίηση όπου κάθε καταναλωτής μπορεί να τη χρησιμοποιεί ακόμη και στο σπίτι του.

Η οζονοποίηση χρησιμοποιείται εδώ και αρκετά χρόνια ως μέσο απολύμανσης του πόσιμου νερού στην Ευρώπη. Χώρες όπως η Ιαπωνία, η Γαλλία και η Αυστραλία έχουν εγκρίνει την χρήση του όζοντος στην επεξεργασία των τροφίμων. Η Αμερική είναι ακόμη μια χώρα που έχει εγκρίνει το όζον ως τεχνική απολύμανσης κατά την διάρκεια της παραγωγής και επεξεργασίας των τροφίμων **(Smilanick et al., 1999)**. Παρά ταύτα, οποιαδήποτε χρήση του όζοντος δεν έχει εγκριθεί σε κάποιες χώρες όπως η Τουρκία ακόμη και σήμερα **(Karaka and Velioglu 2007)**.

Το 1997 μια ομάδα ειδικών δήλωσε το όζον “γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές”(GRAS-Generally Recognized as Safe) για άμεση επαφή με τρόφιμα. Στις 26 Ιουνίου 2001 η US Food and Drug Administration (FDA) ανακοίνωσε τη χρήση του όζοντος ως επίσημα επιτρεπόμενο αντιμικροβιακό μέσο για την επεξεργασία, την αποθήκευση και την παραγωγή των τροφίμων **(Habibi Najafi and Haddad Khodaparast 2009, Tzortzakis et al., 2007)**. Από τότε το ενδιαφέρον για τις εφαρμογές της οζονοποίησης στη βιομηχανία των τροφίμων έχει αυξηθεί **(Ozkan et al., 2011)**. Δια μέσου της οξειδωτικής του δράσης αδρανοποιεί τους μικρο-οργανισμούς, καθιστώντας το έναν εκμεταλλεύσιμο αντιμικροβιακό παράγοντα για χρήση στη βιομηχανία των

τροφίμων (**Fan et al., 2002, Das et al., 2006**). Το όζον χρησιμοποιείται είτε σε αέρια, είτε σε υγρή φάση και επιτρέπεται να έρχεται σε άμεση επαφή με τα τρόφιμα, συμπεριλαμβάνοντας τα ωμά φρούτα και λαχανικά (**Guzel-Sedim et al., 2004**). Η χρήση του και ο έλεγχος πρέπει να είναι σύμφωνοι με τους κανόνες της ορθής βιομηχανικής πρακτικής (Good Manufacturing Practice-GMP) (**Venta et al., 2010**). Για ιδανικά αποτελέσματα, τα φρούτα και τα λαχανικά θα πρέπει να δέχονται την ελάχιστη δόση όζοντος, η οποία θα είναι ικανή και να παρέχει τα κατάλληλα αντιμικροβιακά πλεονεκτήματα στα συγκεκριμένα βρώσιμα αγαθά.

Ο βασικός σκοπός της οζονοποίησης στα στάδια μετά την συγκομιδή είναι:

- Αδρανοποίηση των βακτηρίων (**Habibi Najafi and Haddad Khodaparast 2009**).
- Πρόληψη της φθοράς από μύκητες (**Perez et al., 1999**).
- Καταστροφή των παρασιτοκτόνων και των χημικών υπολειμμάτων (**Ong et al., 1996**).
- Έλεγχος της αποθήκευσης των παρασίτων (**Kells et al., 2001**).

Το όζον λειτουργεί ως αποτελεσματικό μέσο μεταχείρισης για την απολύμανση του πόσιμου νερού, όπου αποσυντίθεται ελεύθερα σε μη τοξικά προϊόντα (**Selma et al. 2007**). Επιπλέον το οζονοποιημένο νερό εφαρμόζεται στα φρεσκοκομμένα λαχανικά έχοντας ως στόχο την απολύμανση τους, μειώνοντας παράλληλα το μικροβιακό φορτίο και παρατείνοντας την διάρκεια ζωής μερικών εξ' αυτών των προϊόντων (**Beltran et al., 2005a, b**).

Εκτός από το όζον ως μέθοδοι και τεχνικές απολύμανσης για τα τρόφιμα και κυρίως για τα φρούτα και τα λαχανικά προτείνονται το οξικό οξύ, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το διοξειδίο του χλωρίου και το χλώριο (**Tiwari and Muthukumarappan 2012**). Το χλώριο είναι το συνηθέστερο μέσο που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των παθογόνων στα φρούτα και τα λαχανικά. Ωστόσο αρκετές έρευνες έχουν δείξει πως το χλώριο έχει περιορισμένη δυνατότητα στην καταστροφή των βακτηρίων που βρίσκονται στα φρούτα και τα λαχανικά (A).

Οργανισμοί Υγείας και Περιβάλλοντος έχουν εκδηλώσει την ανησυχία τους σχετικά με τη διαμόρφωση υποπροϊόντων, όπως τα τριαλογονομένα μεθάνια (THMs) και άλλα χημικά υπόλοιπα υγρών αποβλήτων που πιθανόν να επιστρέψουν στο περιβάλλον. Οι βιομηχανίες παραγωγής ανησυχούν σχετικά με την πιθανότητα ρυθμιστικών περιορισμών στην χρήση του χλωρίου ως μέσο απολύμανσης των τροφίμων.

Ετησίως χρησιμοποιείται μια μεγάλη ποσότητα παρασιτοκτόνων για τον έλεγχο των εντόμων στα φρούτα και τα λαχανικά. Οι τρέχουσες τεχνολογίες, όπως το χλώριο δεν μπορούν να καταστρέψουν ολοκληρωτικά τα χημικά υπόλοιπα που μένουν στην επιφάνεια των φρούτων και των λαχανικών, με αποτέλεσμα τα χημικά υπόλοιπα να αντιδρούν με τα παρασιτοκτόνα με την μορφή χημικών υποπροϊόντων. Τα υπόλοιπα αυτά εν τέλει καταναλώνονται από τους πελάτες και άμεσα ή έμμεσα επηρεάζουν την δημόσια υγεία. Η συσσώρευση των τοξικών χημικών στο περιβάλλον έχει αυξήσει την ζήτηση για ασφαλή απολυμαντικά μέσα, μέσα εξυγίανσης και άλλα χημικά στην βιομηχανία παραγωγής τροφίμων (Xu 1999).

Πίνακας 1. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα / περιορισμοί της χρήσης του όζοντος και του χλωρίου ως μέσα απολύμανσης στα φρεσκοκομμένα λαχανικά.

Απολυμαντικός Παράγοντας	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα / Περιορισμοί
<i>Χλώριο</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Χαμηλό κόστος - Εύκολα διαθέσιμο 	<ul style="list-style-type: none"> - Αντιδρά με την οργανική ύλη, σε μερικές περιπτώσεις επηρεάζει την παραγωγή τοξικών ενώσεων - Η αποτελεσματικότητα επηρεάζεται από την παρουσία της οργανικής - Διαβρωτικότητα - Εξαρτώμενη δραστηριότητα pH - Μη επιτρεπόμενο για οργανικά προϊόντα
<i>Όζον</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Υψηλή αντιμικροβιακή δραστηριότητα - Μικρός χρόνος επαφής - Γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές για άμεση επαφή - Δεν δημιουργεί υπολειμματικά προβλήματα - Δεν χρειάζεται να αποθηκευτούν επικίνδυνες ουσίες - Χαμηλό κόστος - Απαιτεί απ' ευθείας παραγωγή 	<ul style="list-style-type: none"> - Τοξικό όταν εισπνέεται - Απαιτεί παρακολούθηση της λειτουργίας όταν δημιουργείται - Διαβρωτικό πάνω από 4ppm - Υψηλό αρχικό επενδυτικό κόστος

(Tiwari and Muthukumarappan 2012)

Η δυνατότητα εκμετάλλευσης του όζοντος στην βιομηχανία οφείλεται στο γεγονός ότι σαν οξειδωτικός παράγοντας είναι 1,5 φορές πιο δυνατός από το χλώριο και πιο αποτελεσματικός σε ένα ευρύ φάσμα μικρο-οργανισμών, όχι μόνο του χλωρίου αλλά και άλλων απολυμαντικών μέσων. Το όζον σκοτώνει βακτήρια όπως η *Escherichia Coli*, η *Listeria* και άλλα παθογόνα που βρίσκονται στα τρόφιμα γρηγορότερα από τις παραδοσιακές τεχνικές, όπως το χλώριο, έχοντας παράλληλα την δυνατότητα να απομακρύνει και τα έντομα. Μπορεί να εξαλείψει από μια ανεπιθύμητη παρτίδα παραγωγής τα βακτήρια και να αφαιρέσει χημικώς το αιθυλένιο, επιβραδύνοντας με αυτόν τον τρόπο την διαδικασία ωρίμανσης, έτσι ώστε να επιτραπεί η παράταση της διανομής των προϊόντων (Xu 1999).

2. ΤΟ ΟΖΟΝ

2.1 Ασφάλεια του όζοντος

Το όζον βρίσκεται στην ατμόσφαιρα ως αποτέλεσμα φωτοχημικής οξείδωσης των υδρογονανθράκων που προέρχονται από τα καυσαέρια των αυτοκινήτων και των βιομηχανικών εκπομπών. Οι άνθρωποι εκτίθενται σε χαμηλά επίπεδα όζοντος σε καθημερινή βάση.

Όπως όλα τα οξειδωτικά αέρια, έτσι και το όζον είναι επιβλαβές για τους ανθρώπους αν η έκθεση τους σε αυτό γίνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις και για μεγάλο χρονικό διάστημα. Γι' αυτό το λόγο, έχουν θεσμοθετηθεί όρια από την Διοίκηση Επαγγελματικής Ασφάλειας και Υγείας (Occupational Safety and Health Administration (OSHA)). Το Κατώφλι Ορίου Εκτίμησης - Μεγάλης Διάρκειας Ορίου Έκθεσης (Threshold Limit Value - Long Term Exposure Limit (TLV - LTEL)) για την έκθεση όζοντος στο εργασιακό περιβάλλον είναι 0,1ppm για 8ώρες την ημέρα / 40ώρες την εβδομάδα όπως έχει ορισθεί από την Κυβέρνηση της Αμερικάνικης Συνδιάσκεψης για την Υγεία σε Βιομηχανικά Θέματα (American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)) και έχει εγκριθεί από την Διοίκηση Επαγγελματικής Ασφάλειας και Υγείας (Xu 1999). Το Κατώφλι Ορίου Εκτίμησης - Μικρής Διάρκειας Ορίου Έκθεσης (Threshold Limit Value - Short Term Exposure Limit (TLV - STEL)) είναι 0,3ppm για 15 λεπτά. Αυτό είναι και το επίπεδο στο οποίο υγιείς άνθρωποι μπορούν να εκτεθούν για μικρό χρονικό διάστημα (15 λεπτά) χωρίς να προβληθούν από φυσικούς ερεθισμούς ή άλλα οξεία αποτελέσματα αποδεικνύοντας πως το TLV – LTEL δεν υπερβαίνει τα όρια (Xu 1999, Palou et al., 2002).

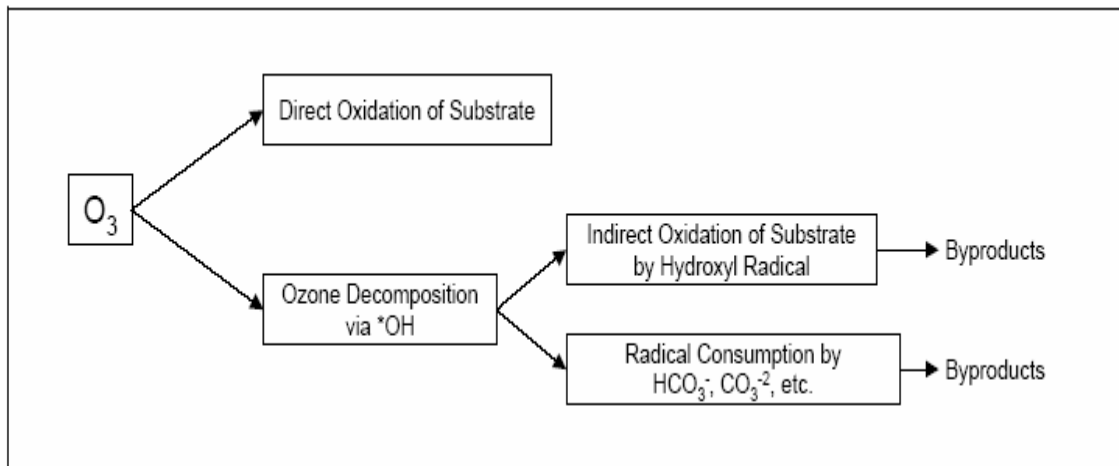
Η τιμή TLV –LTEL για το όζον είναι χαμηλότερη συγκριτικά με άλλα συνήθη αέρια που χρησιμοποιούμε όπως το CO₂, N₂, και O₂. (Xu 1999). Είναι ασφαλέστερο στην χρήση από τα άλλα αέρια (Tzortzakis et al., 2011) επειδή:

- Έχει γρηγορότερη κινητική αντίδραση εξ' αιτίας της δυνατότητας της υψηλής οξείδωσης

- Παράγεται με συγκεκριμένη διαδικασία, σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις και πιέσεις (< 15 psig).
- Έχει σχετικά μικρό χρόνο ημι-ζωής και κατά γενικό κανόνα μετριέται σε λεπτά στην υγρή φάση και σε ώρες στην αέρια φάση (Xu 1999).

2.2 Μηχανισμός αντίδρασης του όζοντος

Το όζον αποσυντίθεται στο νερό και παράγονται ελεύθερες ρίζες του υδροξυλίου (Hoigne and Bader 1983a, 1983b). Όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα το όζον μπορεί να οξειδωθεί σύμφωνα με τις δύο ακόλουθες μεθόδους στην υγρή διάλυση: 1) άμεση αντίδραση με μοριακό όζον, 2) αντίδραση με ελεύθερες ρίζες του υδροξυλίου, παραγόμενες κατά την διάρκεια αποσύνθεσης του όζοντος.



Διάγραμμα 1: Οξειδωτικές αντιδράσεις των ενώσεων κατά την οζονοποίηση του νερού (EPA Guidance Manual 1991).

Και οι δύο αυτές οξειδώσεις συναγωνίζονται η μία την άλλη για την οξείδωση του υποστρώματος. Το όζον στην υγρή φάση υπάρχει σε υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με τις ελεύθερες ρίζες του υδροξυλίου, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες οξείδωσης. Ωστόσο η οξείδωση του όζοντος στην υγρή φάση είναι αργή συγκριτικά με την οξείδωση των ελεύθερων ριζών του υδροξυλίου, οι οποίες έχουν γρηγορότερο ποσοστό αντίδρασης. Η οξειδωτική αντίδραση του όζοντος είναι σημαντικό να γίνεται κάτω από

όξινες συνθήκες, (η οξείδωση είναι η αιτία που οι ελεύθερες ρίζες του υδροξυλίου βρίσκονται κάτω από συνθήκες υψηλού pH, παρουσία υπεριωδών ακτινοβολιών ή με προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου). Αργότερα αυτός ο μηχανισμός χρησιμοποιείται στην διαδικασία προηγμένης οξείδωσης όπως το perexone, αυξάνοντας τα οξειδωτικά ποσοστά των υποστρωμάτων. **(Chawla 1996)**.

2.3 Μικροβιακή δράση του όζοντος

Το όζον ως δυνατός αντιμικροβιακός παράγοντας, έχει πλήθος εκμεταλλεύσιμων εφαρμογών στην βιομηχανία των τροφίμων και μεγάλη αποτελεσματικότητα ενάντια στα βλαστικά και σπορογόνα βακτήρια, στους μύκητες, τα πρωτόζωα και τους ιούς **(Gomez et al., 2011, Rodoni et al., 2010)**. Είναι αποτελεσματικό σε gram αρνητικά και gram θετικά βακτήρια. Εκτός από το ευρύ φάσμα στην αδρανοποίηση των μικροβίων, το όζον έχει την δυνατότητα να σκοτώνει τα παράσιτα και να διασπά τις μυκοτοξίνες, έχοντας ως συνέπεια την καταστροφή τους **(Cullen et al., 2009)**. Ένα από τα πλεονεκτήματα του όζοντος είναι ότι το πρόσθετο όζον που απομένει αυτοδιασπάται και παράγει οξυγόνο, με αποτέλεσμα να μην αφήνει υπολείμματα στα τρόφιμα. Ωστόσο οι αντιδράσεις του όζοντος με οργανικά μίγματα μπορεί να οδηγήσουν σε νέα οξειδωτικά μίγματα, κάποια από τα οποία ίσως και να παραμείνουν στα τρόφιμα **(Tiwari and Muthukumarappan 2012)**. Μικροβιολογικές μελέτες δείχνουν συνήθως 2-log μείωση των συνολικών υπολογισμών και σημαντική μείωση των δυνητικών παθογόνων ειδών που συνδέονται κυρίως με προϊόντα όπως φρούτα και λαχανικά όταν χρησιμοποιείται το όζον σε αυτά **(Gomez et al., 2011)**.

Η αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα του όζοντος ενάντια στους μικροοργανισμούς που σχετίζονται με τα τρόφιμα έχει μελετηθεί σε gram θετικά βακτήρια (*Listeria Monocytogenes*, *Staphylococcus Aureus*, *Bacillus Cereus*, *Enterococcus Faecalis*), σε gram αρνητικά βακτήρια (*Pseudomonas Aeruginosa*, *Yersinia Enterocolitica*), σε ζύμες (*Candida Albicans*, *Zygosaccharomyces Bacilli*) και σε σπόρια (*Aspergillus Niger*) **(Cullen et al., 2009, Guzel – Sedydim et al., 2004)**.

Μήλα, βατόμουρα, μαρούλι, καρότα και πράσινες πιπεριές επεξεργάστηκαν με όζον σε αέρια φάση για να καταπολεμηθούν βακτήρια όπως η *Salmonella*, βακτήριο το οποίο έχει βρεθεί στα παραπάνω οπωροκηπευτικά (**Das et al., 2006**). Η *Salmonella* Enterica έχει συσχετιστεί με ντομάτες, λάχανα, πεπόνια, μήλα και πορτοκάλια, ενώ η *E. Coli* 0157:H7 έχει συνδεθεί με λάχανα, καρότα (**Trinetta et al., 2011, CDC 2010**), μαρούλια και σπανάκι (**Seow et al., 2012**).

Το όζον χρησιμοποιείται κυρίως στο πλύσιμο και την αποθήκευση των φρούτων και των λαχανικών. Οι Yuk et al. μελέτησαν τα αποτελέσματα σε διαφορετικές μεταχειρίσεις όζοντος στο μαρούλι και τις αλλαγές που μπορεί να προκαλέσει το όζον σε επιμολύνσεις από *Listeria Monocytogenes* και *Escherichia Coli*. Η μελέτη έδειξε πως μετά την οζονοποίηση του μαρουλιού σε 5mg L^{-1} όζοντος για 5 λεπτά είχε ως αποτέλεσμα την μείωση κατά 0,9 και $1,0 \log_{10}$ CFU g^{-1} στην *Listeria Monocytogenes* και *Escherichia Coli* αντίστοιχα (**Akbas and Olmez 2007**).

Οι Garcia et al. (2003) χρησιμοποίησαν χλωριωμένο και οζονοποιημένο νερό για να ξεπλύνουν μαρούλι έτοιμο προς κατανάλωση. Η έρευνά τους έδειξε πως με ένα γρήγορο ξέπλυμα της τάξεως $2,5\text{mg/L}$ όζοντος και 100mg/L χλωρίου είναι και η καταλληλότερη ποσότητα για να δώσει τα μέγιστα δυνατά αποτελέσματα, μειώνοντας τα αερόβια βακτήρια στο μαρούλι περίπου $1,2 \log_{10}$ CFU/g (**Garcia et al. 2003**).

Ο Izumi (2007) χρησιμοποίησε όζον σε αέρια φάση για να δείξει την μείωση των ολικών κολοβακτηριδίων στο μαρούλι και το λάχανο. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως για 3 λεπτά όζοντος σε αέρια φάση και 10mg/L συγκέντρωσης τα ολικά κολοβακτηρίδια μειώθηκαν στο λάχανο $1 \log_{10}$ CFU/g, αλλά δεν υπήρξε καμία μείωση στο μαρούλι (**Izumi 2007, Klockow and Keener 2009**).

3 ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ

Ο ακόλουθος πίνακας αναφέρει τις επιδράσεις του όζοντος και άλλων απολυμαντικών μέσων σχετικά με την ανίχνευση και την μείωση του μικροβιολογικού φορτίου και την βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων.

Λαχανικό	Μεθοδολογία	Μετρήσεις		Οργανοληπτικές Ιδιότητες	Πηγή
		Μικροβιολογικοί Παράμετροι	Φυσικοχημικοί Παράμετροι		
Ντομάτα	<p><i>Διοξείδιο του χλωρίου</i></p> <p><i>Συγκέντρωση 10mg/L</i></p> <p><i>Χρόνος 3min σε 75%ωγρασία</i></p>	<p>Salmonella enterica</p> <p>Αρχική τιμή</p> <p>5,86 ± 0,09 log CFU/g</p> <p>Τελικές τιμές</p>			Trinetta et al. (2011)
	<p><i>Όζον</i></p> <p><i>Συγκέντρωση 4,3mg/L</i></p> <p><i>Χρόνος 5min</i></p>	<p>Διοξείδιο του χλωρίου</p> <p>0,54 ± 0,10 log CFU/g</p>			
	<p><i>Ακτίνα ηλεκτρονίων</i></p> <p><i>Συγκέντρωση 7kGy</i></p> <p><i>Χρόνος 1min</i></p>	<p>Όζον</p> <p>1,80 ± 0,10 log CFU/g</p> <p>Ακτίνα ηλεκτρονίων</p> <p>1,50 ± 0,06 log CFU/g</p>			

Μηλοπέπονο	<p>Διοξειδίο του χλωρίου</p> <p>Συγκέντρωση 10mg/L</p> <p>Χρόνος 3min σε 75%ωγρασία</p> <p>Όζον</p> <p>Συγκέντρωση 4,3mg/L</p> <p>Χρόνος 5min</p> <p>Ακτίνα ηλεκτρονίων</p> <p>Συγκέντρωση 7kGy</p> <p>Χρόνος 1min</p>	<p>Salmonella enterica</p> <p>Αρχική τιμή</p> <p>6,14 ± 0,13 log CFU/g</p> <p>Τελικές τιμές</p> <p>Διοξειδίο του χλωρίου</p> <p>4,12 ± 0,12 log CFU/g</p> <p>Όζον</p> <p>1,85 ± 0,09 log CFU/g</p> <p>Ακτίνα ηλεκτρονίων</p> <p>3,90 ± 0,09 log CFU/g</p>			Trinetta et al. (2011)
Σπανάκι	<p>Όζον</p> <p>Συγκέντρωση 0,04 -0,6 mg/L</p> <p>Χρόνος έκθεσης 5min</p> <p>Χρόνος αποθήκευσης 0-0,5-24h</p> <p>Θερμοκρασία 22^oC & 5^oC</p>	<p>E. coli 0157:H7</p> <p>Αρχική τιμή 7,6 ± 0,6 log₁₀ CFU/leaf</p> <p>Μέση τελική τιμή</p> <p>Σε αέρα 1,6 ± 0,2 mg/L</p> <p>&</p> <p>Σε οξυγόνο 4,3 ± 1,0 mg/L</p> <p>Κοινή τελική τιμή στους 5 και 22^oC</p>		↑ Χρώμα	Klockow and Keener (2009)

<p>Κόκκινες πιπεριές</p>	<p>Όζον Συγκέντρωση 16 - 33 – 66 mg Χρόνος 7,5 – 15 - 30 – 60 min Θερμοκρασία 25⁰C</p>	<p>Aflatoxin B1</p> <p>Για πιπεριές χωρίς φλούδα</p> <p>Αρχική τιμή 20 µg/kg</p> <p>Τελικές τιμές Για 16mg/l όζον στα 60min → 11µg/kg Για 33mg/l όζον στα 60min → 4µg/kg</p> <p>Για κομμένες πιπεριές</p> <p>Αρχική τιμή 32 µg/kg</p> <p>Τελικές τιμές Για 16mg/l όζον στα 60min → 12µg/kg Για 33mg/l όζον στα 60min → 6µg/kg Για 66 mg/l όζον στα 60min → 4µg/kg</p>		<p>↑ Χρώμα</p>	<p>Inan et al. (2007)</p>
------------------------------	---	---	--	----------------	----------------------------------

Κόκκινες πιπεριές	<p>Όζον</p> <p>Συγκέντρωση 0,1 -0,5 – 1,0 ppm</p> <p>Χρόνος</p> <p>360 min</p> <p>Θερμοκρασία</p> <p>20°C</p>	<p>E. coli</p> <p>Για 0,1 ppm μείωση < 0,05</p> <p>Για 0,5 ppm μείωση 1,7 log (cfu g⁻¹)</p> <p>Για 1,0 ppm μείωση 2,0 log (cfu g⁻¹)</p> <p>B. cereus</p> <p>Για 0,1 ppm μείωση < 0,05</p> <p>Για 0,5 ppm μείωση < 0,05</p> <p>Για 1,0 ppm μείωση 1,5 log (cfu g⁻¹)</p>		<p>↑ Γεύση</p> <p>↑ Εμφάνιση</p> <p>↑ Αίσθηση</p> <p>↑ Συνολική ευγευστία</p>	<p>Akbas and Ozdemir (2008)</p>
----------------------	---	--	--	---	--

Σέλινο	<p>Όζον Συγκέντρωση 0,03 – 0,08 – 0,18 ppm</p> <p>Χρόνος 2 – 6 – 10 min</p> <p>Θερμοκρασία 17⁰C</p>	<p>Ολικά βακτηροειδή</p> <p>Αρχική τιμή 6,78 ± 0,50 log CFU/g</p> <p>Τελικές τιμές Για 0,03 ppm όζον → 5,72 ± 0,20 log CFU/g Για 0,08 ppm όζον → 5,64 ± 0,64 log CFU/g Για 0,18 ppm όζον → 5,63 ± 0,30 log CFU/g</p> <p>Πολυθενυλοξειδάση</p> <p>Αρχική τιμή 133,00 ± 4,00 u/g FW</p> <p>Τελικές τιμές Για 0,03 ppm όζον → 226,00 ± 10,00 u/g FW Για 0,06 ppm όζον → 216,00 ± 8,00 u/g FW Για 0,06 ppm όζον → 188,00 ± 7,00 u/g FW</p> <p>* 9ημέρες αποθήκευσης στους 4⁰C</p>	<p>Βιταμίνη C</p> <p>Αρχική τιμή 4,40 ± 0,40 mg/100g</p> <p>Τελικές τιμές Για 0,03 ppm όζον → 5,28 ± 0,16 mg/100g Για 0,08 ppm όζον → 5,63 ± 0,20 mg/100g Για 0,18 ppm όζον → 4,75 ± 0,10 mg/100g</p>		<p>Zhang et al. (2005)</p>
--------	--	--	---	--	--

Καρότα	<p>Διοξειδίο του χλωρίου σε υγρή φάση</p> <p>Συγκέντρωση 20mg/L</p> <p>Χρόνος 15min</p>	<p>Escherichia Coli 0157:H7</p> <p>Αρχική τιμή για διοξειδίο του χλωρίου σε υγρή φάση</p> <p>7,85 log₁₀ cfu/g</p> <p>Τελική τιμή 5,31± 0,19 log₁₀ cfu/g</p>			Singh et al. (2002)
	<p>Διοξειδίο του χλωρίου σε αέρια φάση</p> <p>Συγκέντρωση 1.00mg/L</p> <p>Χρόνος 15min</p>	<p>Αρχική τιμή για διοξειδίο του χλωρίου σε αέρια φάση</p> <p>7,72 log₁₀ cfu/g</p> <p>Τελική τιμή 4,72 ± 0,19 log₁₀ cfu/g</p>			
	<p>Όζον σε υγρή φάση</p> <p>Συγκέντρωση 16,5 mg/L</p> <p>Χρόνος 15 min</p>	<p>Αρχική τιμή για όζον σε υγρή φάση</p> <p>7,82 log₁₀ cfu/g</p> <p>Τελική τιμή 5,97 ± 0,16 log₁₀ cfu/g</p>			
	<p>Όζον σε αέρια φάση</p> <p>Συγκέντρωση 7,6 mg/L</p> <p>Χρόνος 15min</p>	<p>Αρχική τιμή για όζον σε αέρια φάση</p> <p>7,80 log₁₀ cfu/g</p> <p>Τελική τιμή 5,16 ± 0,15 log₁₀ cfu/g</p>			
	<p>Thyme Essential Oil</p> <p>Συγκέντρωση 10.0 mL/L</p> <p>Χρόνος 15 min</p>	<p>Αρχική τιμή για thyme essential oil</p> <p>7,54 log₁₀ cfu/g</p> <p>Τελική τιμή 4,77 ± 0,15 log₁₀ cfu/g</p>			

Μαρούλι	<p>Όζον</p> <p>Συγκέντρωση 0,5 - 1,6- 2,2 ppm</p> <p>Χρόνος 1 min</p> <p>Θερμοκρασία 37⁰C</p> <p>Συγκέντρωση 2 ppm</p> <p>Χρόνος 5 min</p> <p>Θερμοκρασία 10⁰C</p> <p>Συγκέντρωση 5 ppm</p> <p>Χρόνος 5 min</p> <p>Θερμοκρασία 10⁰C</p>	<p>Shigella Sonnei</p> <p>Αρχική τιμή 10⁸ CFU mL⁻¹</p> <p>Τελικές τιμές</p> <p>για 0,05ppm → 0,3± 0,2 log₁₀ CFU mL⁻¹</p> <p>για 1,6ppm → 3,7± 0,5 log₁₀ CFU mL⁻¹</p> <p>για 2,2ppm → 5,6± 0,3 log₁₀ CFU mL⁻¹</p> <p>για 2ppm → 0,9 & 1,4 log₁₀ CFU mL⁻¹</p> <p>για 5ppm → 1,8 log₁₀ CFU mL⁻¹</p>	↑ ph		Selma et al. (2007)
---------	--	--	------	--	------------------------

Μαρούλι	<p><i>Διοξειδίο του χλωρίου</i> <i>Συγκέντρωση 10mg/L</i> <i>Χρόνος 3min σε</i> <i>75%υγρασία</i></p> <p><i>Όζον</i> <i>Συγκέντρωση 4,3mg/L</i> <i>Χρόνος 5min</i></p> <p><i>Ακτίνα ηλεκτρονίων</i> <i>Συγκέντρωση 7kGy</i> <i>Χρόνος 1min</i></p>	<p>Escherichia Coli O157:H7</p> <p>Αρχική τιμή 5,47 ± 0,14 log CFU/g</p> <p>Τελικές τιμές</p> <p>Διοξειδίο του χλωρίου 3,53 ± 0,12 log CFU/g</p> <p>Όζον 1,94 ± 0,07 log CFU/g</p> <p>Ακτίνα ηλεκτρονίων 3,26 ± 0,08 log CFU/g</p>			<p>Trinetta et al. (2011)</p>
---------	---	---	--	--	--

Μαρούλι	<p>Διοξειδίο του χλωρίου σε υγρή φάση</p> <p>Συγκέντρωση 20mg/L</p> <p>Χρόνος 15min</p>	<p>Escherichia Coli 0157:H7</p> <p>Αρχική τιμή για διοξειδίο του χλωρίου σε υγρή φάση</p> <p>8,12 log₁₀ cfu/g</p> <p>Τελική τιμή 6,40 ± 0,17 log₁₀ cfu/g</p>			<p>Singh et al. (2002)</p>
	<p>Διοξειδίο του χλωρίου σε αέρια φάση</p> <p>Συγκέντρωση 1.00mg/L</p> <p>Χρόνος 15min</p>	<p>Αρχική τιμή για διοξειδίο του χλωρίου σε αέρια φάση</p> <p>8,10 log₁₀ cfu/g</p> <p>Τελική τιμή 5,89 ± 0,20 log₁₀ cfu/g</p>			
	<p>Όζον σε υγρή φάση</p> <p>Συγκέντρωση 16,5 mg/L</p> <p>Χρόνος 15 min</p>	<p>Αρχική τιμή για όζον σε υγρή φάση</p> <p>8,10 log₁₀ cfu/g</p> <p>Τελική τιμή 6,59 ± 0,11 log₁₀ cfu/g</p>			
	<p>Όζον σε αέρια φάση</p> <p>Συγκέντρωση 7,6 mg/L</p> <p>Χρόνος 15min</p>	<p>Αρχική τιμή για όζον σε αέρια φάση</p> <p>8,00 log₁₀ cfu/g</p> <p>Τελική τιμή 6,21 ± 0,24 log₁₀ cfu/g</p>			
	<p>Thyme Essential Oil</p> <p>Συγκέντρωση 10.0 mL/L</p> <p>Χρόνος 15 min</p>	<p>Αρχική τιμή για thyme essential oil</p> <p>7,86 log₁₀ cfu/g</p> <p>Τελική τιμή 5,45 ± 0,13 log₁₀ cfu/g</p>			

Μαρούλι	Χλώριο	Αερόβιοι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί			
	Συγκέντρωση 100mg/L	Αρχική τιμή 4,6 – 7 log ₁₀ CFU / g			
	Χρόνος				
	90sec	Για χλώριο 100 mg/L τελική τιμή 3,9 – 5,6 log ₁₀ CFU / g			
	Θερμοκρασία				
	4° C	Για χλώριο 200 mg/L τελική τιμή 2 – 4,2 log ₁₀ CFU / g			
	Χλώριο				
	Συγκέντρωση	Ψευδομονάδα			
	200mg/L	Αρχική τιμή 4,6 – 7 log ₁₀ CFU / g		↑ Συνολική οπτική ποιότητα	
	Χρόνος			↑ Καστανώμα	
	90sec & 120sec	Για χλώριο 100 mg/L τελική τιμή 3,9 – 5,6 log ₁₀ CFU / g		↑ Άρωμα	Baur et al. (2004)
	Θερμοκρασία			↑ Οσμή	
	4° C	Για χλώριο 200 mg/L τελική τιμή 2 – 4,2 log ₁₀ CFU / g		↑ Γεύση	
	Όζον			↑ Χρώμα	
Συγκέντρωση	Εντεροβακτήρια				
1mg/L	Αρχική τιμή 4 – 5log ₁₀ CFU / g				
Χρόνος					
90sec & 120sec	Για χλώριο 100 mg/L τελική τιμή 3 – 4,5 log ₁₀ CFU / g				
Θερμοκρασία					
4° C	Για χλώριο 200 mg/L τελική τιμή 2 – 2,3log ₁₀ CFU / g				
	Για όζον 1mg/L τελική τιμή 2,4 – 2,6log ₁₀ CFU / g				
	* Για 9 ημέρες αποθήκευσης				

Η ένταση και ο χρόνος της οζονοποίησης έχουν σημαντικό ρόλο στα αποτελέσματα του μικροβιολογικού ελέγχου. Οι Trinetta V., Vaidya N., Linton R. και Morgan M. έδειξαν μείωση της E. coli στο μαρούλι από $5,47 \pm 0,14 \log\text{CFU/g}$ στα $1,94 \pm 0,07 \log\text{CFU/g}$ ύστερα από την χρήση $4,3\text{mg/L}$ όζοντος σε αέρια μορφή για 5 λεπτά έκθεσης (Trinetta et al. 2011). Έρευνα των Baur S., Klaiber R., Hammes W.P. και Carle R. έδειξε μείωση στους αερόβιους μεσόφιλους μικροοργανισμούς του μαρουλιού από $4,6 - 7 \log_{10} \text{CFU/g}$ στα $3,5 - 5,2 \log_{10} \text{CFU/g}$ ύστερα από χρήση 1mg/L οζονοποιημένου νερού για 120 δευτερόλεπτα. Η μείωση για την ίδια συγκέντρωση και χρόνο της ψευδομονάδας ήταν από $4,6 - 7 \log_{10} \text{CFU/g}$ στα $3,5 - 5 \log_{10} \text{CFU/g}$ και για τα εντεροβακτήρια από $4 - 5 \log_{10} \text{CFU/g}$ στα $2,4 - 2,6 \log_{10} \text{CFU/g}$ (Baur et al. 2004).

4. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ

4. ESCHERICHIA COLI

Κοινή ονομασία του είδους που επικράτησε στα ελληνικά είναι η λέξη κολοβακτηρίδιο. Έχει όλους τους γενετικούς χαρακτήρες της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών και αποτελεί το τυπικό μοντέλο για μελέτες μοριακής βιολογίας και γενετικής, φαινομένων αντοχής στα αντιβιοτικά, πλασμιδολογίας και ενζυμολογίας. Αν και είναι απαραίτητο στοιχείο της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας είναι μικρόβιο παθογόνο που προκαλεί ποικιλία εντερικών και εξωεντερικών λοιμώξεων. Είναι το συχνότερο απομονούμενο μικρόβιο από τις καλλιέργειες κλινικών δειγμάτων (**Brenner 1984**).

4.1 Μορφολογία

Gram αρνητικό αερόβιο ασπορογόνο βακτήριο, μήκους 1-1, 5-3μm. Είναι περίτριχο, κινούμενο, αλλά υπάρχουν και ακίνητα στελέχη. Παράγει ένα πολύ λεπτό έλυτρο που στα μη κινούμενα στελέχη είναι παχύτερο σαν μια πραγματική κάψα. Τόσο τα κινούμενα όσο και τα ακίνητα παράγουν ινίδια προσκολλητικά και πολλά στελέχη παράγουν και ινίδια συζευκτικά (**Ewing 1986**).

4.2 Καλλιέργεια

Αναπτύσσεται σε όλα τα κοινά θρεπτικά υλικά και σε πολλά εκλεκτικά. Στο θρεπτικό άγαρ οι αποικίες του είναι λείες, χαμηλές, λίγο καμπυλωτές, διαμέτρου μέχρι 2mm, περιγραμμένες, γυαλιστερές όταν βρίσκονται στην S (Smooth) φάση και ξηρές όταν βρίσκονται στην R (Rough) φάση. Στο αιματούχο άγαρ είναι γκριζωπές και σε πολλά στελέχη περιβάλλονται από λεπτή ζώνη αιμολύσεως. Στο άγαρ MacConkey οι αποικίες είναι ροδοκόκκινες γιατί ζυμώνει την λακτόζη και προκαλεί αλλαγή του χρώματος του ουδέτερου ερυθρού που περιέχεται στο θρεπτικό αυτό υλικό. Οι αποικίες του είναι μικρότερες από ό,τι στο θρεπτικό άγαρ. Στο άγαρ με δεσοξυχολικό και λακτόζη (DCA) οι αποικίες είναι ακόμη μικρότερες, συμπαγέστερες και κόκκινες. Στο ζωμό προκαλεί διάχυτη θολερότητα και παχύ ίζημα όταν βρίσκεται στην S φάση, κροκυκώδη ανάπτυξη όταν βρίσκεται στην R φάση (**Farmer and Kelly 1991**).

4.3 Βιοχημικές ιδιότητες

Οι βιοχημικές δηλαδή οι σακχαροδιασπαστικές και οι άλλες ενζυμικές – βιολογικές, ιδιότητες της *E. coli* καθώς και όλων των άλλων εντεροβακτηριακών αποτελούν σταθερό γνώρισμα που επιτρέπει την ταυτοποίηση.

Οι τυπικές βασικές βιοχημικές ιδιότητες της *E. coli* είναι οι εξής:

- Ινδόλη (+)
- M.R. (+)
- V.P. (-)
- Κιτρικά (-)
- PPA (-)
- Λακτόζη (+)
- ONPG (+)
- Λυσίνη (+)
- KCN (-)
- NO₃ (+)
- H₂S (-)
- Ουρία (-)
- Ορνιθίνη (+/-)
- Αργινίνη (+/-)
- Οξειδάση (-)

Εκτός από τις παραπάνω βιοχημικές ιδιότητες η *E. coli* ζυμώνει διαφορά σάκχαρα εκτός της λακτόζης και της γλυκόζης, όπως τη μαλτόζη, τη μαννιτόλη, και αρκετά στελέχη τη σουκρόζη, τη σαλικίνη, τη δουλσιτόλη και τη σουρβιτόλη. Δεν ζυμώνει τον ινοσίτη και την αδενιτόλη. Οι διαφορές που παρατηρούνται στις σακχαροζυμωτικές ιδιότητες επιτρέπουν το διαχωρισμό της *E. coli* σε διάφορους βιότυπους (**Farmer et al. 1985**).

4.4 Οικολογία

Οι εσερίχιες είναι τα πιο πολυάριθμα αερόβια μικρόβια της εντερικής και όλης της φυσιολογικής χλωρίδας του σώματος μας καθώς και αυτής των ζώων. Αν και δεν είναι μικρόβια του φυσικού περιβάλλοντος βρίσκονται σχεδόν σε κάθε τρόφιμο που έρχεται σε επαφή με τα χέρια μας, κατά συνέπεια υπάρχουν και στα φρούτα και στα λαχανικά, αλλά και στα προϊόντα από ζώα όπως το γάλα και τα παράγωγά του.

Όλη η περιγεννητική περιοχή του σώματος μας, το στόμιο της ουρήθρας και του κόλπου φιλοξενούν το κολοβακτηρίδιο.

4.5 Νόσοι από E. coli

Η E. coli διαχωρίζεται στις ακόλουθες ομάδες : 1. Εντεροτοξινογόνες ή ETEC, 2. Εντεροπαθογόνες ή EPEC (**Knutton et al. 1989**), 3. Εντεροδιεισδυτικές (invasive) ή EIEC (**Gordillo et al. (1992)**), 4. Εντεροαιμοραγικές ή EHEC (**Knutton et al. 1989**), 5. Διάχυτης προσκολλησεως (diffuse adherens) DAEC (**Giron et al. 1991**), 6. Ουροπαθογόνες (**O' Hanley et al. 1985**).

Τα νοσήματα που προκαλούνται είναι τα εξής:

Εντερικές λοιμώξεις: Γαστρεντερίτις βρεφών (EPEC) (**Burnens et al. 1992**), χολεροειδής εντερίτις – νόσος ταξιδιωτών (ETEC) (**Yam et al. 1992**), δυσεντεροειδές σύνδρομο (EIEC), αιμορραγική κολίτις και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (EHEC) (**Bitzan et al. 1991, Riley et al. 1983**).

Εξωεντερικές λοιμώξεις: Ουρολοίμωξη, αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (EHEC) (**Spika et al. 1986**), μηνιγγίτις, σηψαιμία, ευκαιριακές λοιμώξεις, ενδοτοξικό σοκ (**Echeveria et al. 1991**).

Η Escherichia Coli μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε τριμμένο μαρούλι , σε φέτες από αγγούρι και σε τριμμένα καρότα στους 12 – 21 °C και σε κύβους από πεπόνι στους 25 °C. Στους 5 °C η E. Coli μπορεί να επιβιώσει σε κύβους από πεπόνι για 34ώρες και πάνω από 14 ημέρες να σε τριμμένο μαρούλι , σε φέτες αγγουριού και σε τριμμένο καρότο (**Abdul – Raouf et al., 1993, Del Rosario and Beauchat 1995**).

5. LISTERIA MONOCYTOGENES

Στο γένος *Listeria* ανήκουν επτά είδη, από τα οποία τα πέντε είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα. Η *L. monocytogenes*, *L. seligeri*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshmeri* ανήκουν στα παθογόνα είδη και η *L. grayi* με την *L. murrayi* ανήκουν στα μη παθογόνα. Για τον ανθρώπινο οργανισμό παθογόνα είναι μόνο η *L. ivanovii* και η *L. monocytogenes* η οποία αποτελεί και το τυπικό είδος του γένους. Όλα τα είδη έχουν απομονωθεί από τα τρόφιμα, από το περιβάλλον (έδαφος, φυτά, νερό) και από τα ζώα, πτηνά, ψάρια, από το κρέας τους, το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (**Fleming et al. 1985, CDC 1985**).

5.1 Μορφολογία

Η *L. monocytogenes* είναι gram θετικό βακτηρίδιο κοντό, ίσιο ή ελαφρά κεκαμμένο που διατάσσεται κατά ζεύγη σε οξεία γωνία ή μοναχικά. Είναι αερόβιο και εκλεκτικά αναερόβιο, ασπορογόνο χωρίς έλυτρο, περίτριχο. Έχει λίγες, 1 – 5 βλεφαρίδες με τις οποίες κινείται με τρομώδη κίνηση όταν αναπτύσσεται στους 20-25° C και παραμένει ακίνητο στους 35-37° C. Όταν καλλιεργηθεί σε στερεό θρεπτικό υλικό έχει μορφή περισσότερο κοκκοειδή και μοιάζει με στρεπτόκοκκο, όταν αναπτυχθεί σε ζωμό έχει μορφή βακτηριδίου και μοιάζει με κορυνοβακτήριδιο. Στα παλιά καλλιεργήματα ή σε έντονο αποχρωματισμό κατά την χρώση gram εμφανίζεται σαν gram αρνητικό βακτηρίδιο και μοιάζει με αιμόφιλο (**Ryan 1990**).

5.2 Καλλιέργεια

Αναπτύσσεται σε όλα τα στερεά και υγρά σύγχρονα καλά θρεπτικά υλικά με BHI ή TSA, κάπως αργά. Στα στερεά αυτά θρεπτικά υλικά οι αποικίες έχουν μια γαλαζοπράσινη ανταύγεια όταν φωτιστούν με πλάγιο φωτισμό. Στο αιματούχο άγαρ μετά από 24ώρη επώαση οι αποικίες είναι μικρές διαφανείς, που μεγαλώνουν καθώς παρατείνεται η επώαση επί 7 ημέρες και γίνονται λευκωπές μη διαφανείς και περιβάλλονται από λεπτή ζώνη αιμολύσεως. Έχει ευρύ περιθώριο θερμοκρασιών στο οποίο μπορεί να αναπτυχθεί από 4-42° C. Αναπτύσσεται στο MacConkey και σε τελλουριούχα υλικά όπου παράγει αποικίες μικρές μαύρες γυαλιστερές που περιβάλλονται από λεπτή πράσινη ζώνη.

Στις πρωτοκαλλιέργειες δειγμάτων με παρουσία μικροβίων φυσιολογικής χλωρίδας από ανθρώπους, ή από τροφές και από το περιβάλλον χρησιμοποιούνται νέα ειδικά θρεπτικά υλικά σε αντικατάσταση του παλιού Mc Bride. Τα υλικά αυτά είναι εμπλουτισμένα με ουσίες και αντιβιοτικά που αναστέλλουν την ανάπτυξη διαφορών μικροβίων, επιτρέπουν και ενισχύουν την ανάπτυξη των λιστεριών και καθιστούν εύκολη την αναγνώριση των αποικιών της λιστέριας. Τέτοια υλικά είναι το LPM άγαρ με λίθιο και μοξαλακτάμη, το Oxford άγαρ με εσκουλίνη, κιτρικό αμμώνιο-σίδηρο με και πέντε αντιμικροβιακές ουσίες και το PALCAM άγαρ με λίθιο, εσκουλίνη, σιδηρούχα άλατα, αντιβιοτικά και σάκχαρα (Ryan 1990).

5.3 Βιοχημικές ιδιότητες

Η *L. Monocytogenes* είναι καταλάση θετική, οξειδάση αρνητική όπως όλα τα είδη των λιστεριών. Οι κοινές βιοχημικές της ιδιότητες είναι οι εξής:

- Καταλάση (+)
- Οξειδάση (-)
- CAMP (+)
- NaCl 5% (+)
- Διάσπαση σακχάρων (όχι σε αέριο)
- Γλυκόζη (+)
- Τρεχαλόζη (+)
- Σαλικίνη (+)
- Ραμνόζη (+)
- Λακτόζη (+)
- Μαλτόζη (+)
- Σουκρόζη (+)
- Μαννιτόλη (-)
- Δουλισιτόλη (-)
- Ξυλόζη (-)
- Ουρία (-)

- Εσκουλίνη (+)
- Ιππουρικά (+)
- Ινδόλη (-)
- MR (+)
- VP (+)
- NO₃ (-)

Οι ειδικές διαχωριστικές από τις άλλες λιστέρειες βιοχημικές ιδιότητες είναι η αντοχή στα 5% NaCl, η θετική αντίδραση CAMP με τον *S. aureus*, διάσπαση της ραμνόζης και μη διάσπαση της ξυλόζης.

5.4 Ανθεκτικότητα

Η *L. monocytogenes* επιζεί στις τροφές ζωικής ή φυτικής προέλευσης και πολλαπλασιάζεται σ' αυτές όταν διατηρούνται εκτός ψυγείου (>5° C), επιζεί σε pH όξινο μέχρι 4,8 και σε παρουσία NaCl 5%. Δεν αντέχει κατά την διαδικασία παρασκευής σκληρών τυριών και γιαουρτιού, επιζεί όμως στην διαδικασία παρασκευής μαλακών τυριών τύπου φέτα, Brie και Camambert. Επίσης επιζεί και πολλαπλασιάζεται στο μη παστεριωμένο γάλα. Η *L. monocytogenes* καταστρέφεται στην θερμοκρασία άνω των 50° C (Conner et al. 1986).

5.5 Οικολογία

Πηγή της *L. monocytogenes* και των λιστεριών γενικότερα είναι το φυσικό περιβάλλον, το έδαφος, τα φυτά, οι σε αποσύνθεση φυτικές ουσίες, τα νερά. Από τις πηγές αυτές μολύνονται τα ζώα. Πολλά από αυτά γίνονται εντερικοί φορείς λιστεριών και μερικά νοσούν συχνότερα από νόσους του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως εγκεφαλίτις, και σπανιότερα από το γαλακτοπαραγωγικό σύστημα ή άλλα όργανα. Η εγκεφαλίτις στις αγελάδες συνδυάστηκε με αρκετές από τις κατά την τελευταία δεκαετία τροφογενείς επιδημίες λιστεριώσεως (Anonymous 1992).

Τα ζώα από τα οποία μολύνεται ο άνθρωπος άμεσα ή έμμεσα είναι τα πρόβατα, οι αγελάδες, οι χοίροι, τα πουλερικά, τα θαλασσινά και τα ψάρια. Άτομα ασχολούμενα με κτηνοτροφικές εργασίες και με παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων έχουν συνήθως

αντισώματα στο αίμα τους για λιστέρειες και αρκετοί από αυτούς αναφέρουν νόσο συμβιβάσιμο με λιστερίωση. Έμμεσα μολύνεται όλος ο πληθυσμός από την κατανάλωση γαλακτοκομικών τροφών μολυσμένων που προέρχονται από ζώα άρρωστα με μαστίτιδα ή φυτικών τροφών που λιπάρθηκαν με κόπρανα ζώων φορέων ή πασχόντων. Σε φρούτα και λαχανικά μπορούμε επίσης να συναντήσουμε λιστέρειες λόγω του μολυσμένου εδάφους και του νερού. Μόλυνση των τροφίμων με λιστέρειες μπορεί να γίνει έμμεσα κατά την επαφή καθαρών τροφίμων με μολυσμένα όπως αυτό συμβαίνει στα οικιακά ψυγεία. Πιο εύκολα μολύνονται, διατηρούν και επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό των λιστεριών οι μαγειρεμένες τροφές που τυχαίνει να μολυνθούν από νωπές μολυσμένες τροφές όπως το γάλα, το κρέας και τα λαχανικά (Ciesielki and Broome 1987, Schlech 1983).

5.6 Νόσοι από *L. monocytogenes* και από λιστέρειες

Η λιστερίωση στον άνθρωπο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1929. Εκτός από τα συμπτώματα από το κεντρικό νευρικό σύστημα χαρακτηριστικό εργαστηριακό στοιχείο ήταν η αύξηση των μονοπυρήνων λευκών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα. Από το γεγονός αυτό η λιστέρια ονομάστηκε μονοκυτταρογόνος. Προσβάλλει συχνότερα άτομα ακραίων ηλικιών όπως είναι τα νεογνά και οι γέροντες, τις έγκυες, και για τους διάφορες αιτίες ανοσοκατασταλμένους είτε λόγω νόσου όπως αιματολογικές νόσοι, το AIDS, είτε λόγω θεραπευτικών ή νοσηλευτικών αγωγών όπως οι μεταμοσχεύσεις, οι ακτινοβολίες, τα κορτικοστεροειδή και ορισμένα αντιβιοτικά.

Στα νεογνά η λιστερίωση εμφανίζεται υπό δύο μορφές. Σαν πρώιμη σηψαιμική νόσος την 1η ή 2η ημέρα γεννήσεώς των. Συνήθως πρόκειται για πρόωρα γεννηθέντα ή και μικρού βάρους νεογνά και οφείλεται σε ενδομήτρια μόλυνση. Τα συμπτώματα είναι γενικά, επικρατούν αυτά από το αναπνευστικό και η θνητότητα πολύ υψηλή. Σαν όψιμη εμφανίζεται μετά την πρώτη ή έως και την τέταρτη εβδομάδα της ζωής σαν σηψαιμία και μηνιγγίτιδα ή μηνιγγοεγκεφαλίτιδα.

Στην έγκυο η λιστερίωση εμφανίζεται σαν ελαφριά εμπύρετη νόσος με διάρροια στην έναρξη της, που μοιάζει με γρίπη. Το έμβρυο μολύνεται, νοσεί με αποτέλεσμα την αποβολή του κατά τους πρώτους μήνες της εγκυμοσύνης. Επί παραμονής του

μολυνθέντος εμβρύου μπορεί να αναπτυχθεί το σύνδρομο εμβρυοσηπτικής κοκκιωματώσεως με διάσπαρτα αποστήματα και κοκκιωματώσεις. Άλλη έκβαση είναι η γέννηση νεκρού παιδιού και η ελαφρότερη ο πρόωρος τοκετός (**Gellin and Broome 1989**) .

Στους ανοσοκατασταλμένους η λιστέρια προκαλεί ποικίλες συστηματικές λοιμώξεις όπως ενδοκαρδίτιδα, αρθρίτιδα, πνευμονία και εγκεφαλικό απόστημα. Οι πιο ευπαθείς είναι οι μεταμοσχευμένοι, με τη μεγαλύτερη συχνότητα ενδονοσοκομειακής λιστεριώσεως και την μεγαλύτερη θνητότητα από αυτήν. Η λιστέρια απομονώνεται από το αίμα.

Λιστεριώσεις παρατηρήθηκαν σε πάσχοντες από το HIV (AIDS), σε καρκινοπαθείς και σε πάσχοντες από αιματολογικές νόσους.

Στους υγιείς ενήλικες η λιστερίωση εμφανίζεται σαν νόσος του ΚΣΝ κυρίως σαν εγκεφαλίτις με υψηλή θνητότητα και υπολείμματα βλαβών του κεντρικού νευρικού συστήματος στους επιζήσαντες.

Εκτός της εγκεφαλίτιδας και του αποστήματος του εγκεφάλου η λιστερίωση στους ενήλικες σπάνια εμφανίζεται και με άλλες εντοπίσεις όπως πνευμονία, πλευρίτις, σηπτική αρθρίτις, ενδοκαρδίτις και περιτονίτις (**Anonymous 1992**).

6. SALMONELLA SPP

Κατά το Bergey's Manual όλες οι σαλμονέλλες και οι αριζόνες ανήκουν σε ένα είδος το οποίο συνιστάται από 5 (πέντε) υπογένη (subgenus) I, II, III, IV, V. Σε κάθε υπογένος υπάγονται ορισμένοι βióτυποι ως ακολούθως :

<u>Υπογένος I</u>	<u>Είδη Σαλμονέλας</u>	
	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. schotmuelleri</i>
	<i>S. hirschfeldii</i>	<i>S. typhimurium</i>
	<i>S. typhi</i>	<i>S. enteritidis</i>
	<i>S. paratyphi-A</i>	<i>S. gallinarum</i>
Υπογένος II	Άτυπες σαλμονέλλες	<i>S. salamae</i>
Υπογένος III	Άτυπες σαλμονέλλες	<i>S. arizonae</i>
Υπογένος IV	Άτυπες σαλμονέλλες	<i>S. houtenae</i>
Υπογένος V	Δουλσιτόλη, ONPG,	<i>S. bongor</i>
και KCN (+)	(Le Minor 1984, Le Minor et al. 1982)	

6.1 Μορφολογία

Οι Salmonella Spp. είναι Gram αρνητικά μικρόβια, κινούμενα με περίτριχες βλεφαρίδες. Μόνο δύο είδη είναι ακίνητα η Salmonella gallinarum και η S. pullorum. Είναι αερόβια μικρόβια, ασπορογόνα, καταλάση θετικά, οξειδάση αρνητικά. Έχουν ινίδια, αλλά δεν έχουν έλτρο εκτός από τη S. typhi που παράγει κάψα όταν καλλιεργηθεί στους 22°C. Διασπούν την λακτόζη με την παραγωγή αερίου εκτός από τη S. typhi που δεν παράγει αέριο και σπανιότατα μερικοί μεταλλάκτες των άλλων σαλμονελλών. Δεν ζυμώνουν την λακτόζη και δεν παράγουν β-γαλακτοσιδάση. Το

ποσοστό της δυάδας G + C στο μόριο του DNA είναι 55-53%. Όλες οι σαλμονέλλες λύνονται από ένα συγκεκριμένο φάγο, τον O1 των Felix-Callow (**Thaller et al. 1992**).

6.2 Καλλιέργεια

Οι σαλμονέλλες αναπτύσσονται στα κοινά θρεπτικά υλικά. Οι αποικίες στο θρεπτικό άγαρ είναι σχετικά μεγάλες, διαμέτρου 2-3 mm, χαμηλές, κυκλικές, με περιφέρεια λοβώδη, γυαλιστερές και μάλλον διαφανείς. Στον ζωμό προκαλούν διάχυτη θολερότητα. Αναπτύσσονται στα ειδικά εκλεκτικά θρεπτικά υλικά των σαλμονελλών, στα οποία δεν αναπτύσσονται οι εσερίχιες και τα άλλα εντεροβακτηριακά. Τέτοια ειδικά υλικά είναι το SS άγαρ, το XLD άγαρ, το άγαρ με δεσοξυχολικό (DCA), το Wilson-Blair, το άγαρ με στίλβον πράσινο, ο ζωμός με σεληνίτη κ.ά.. Ευνοϊκή θερμοκρασία αναπτύξεως είναι 37°C αλλά αναπτύσσονται και σε άλλες θερμοκρασίες από 10°C έως 42°C (**Dealler et al. 1992**).

6.3 Βιοχημικές ιδιότητες

Οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες είναι οι εξής:

- Ινδόλη (-)
- MR (+)
- VP(-)
- Κιτρικά (+)
- NO₃ (+)
- PPA (-)
- KCN (-)
- Λυσίνη (+)
- Ορνιθίνη (+)
- ONPG (-)
- H₂S (+)

- Ουρία (-)
- Λακτόζη (-)
- Γλυκόζη (+) (οξύ και αέριο)
- Σουκρόζη (-)
- Σαλικίνη (-)
- Kligler υλικό : Αλκαλικό/ όξινο/ H₂S/ αέριο

Από τις ιδιότητες αυτές οι πιο σταθερές είναι: MR (+), VP(-), PPA (-), Ουρία (-)

6.4 Ανθεκτικότητα

Η *Salmonella Spp.* καταστρέφεται στην θερμοκρασία των 60°C μετά από 15-20min. Αντέχουν περισσότερο των άλλων εντεροβακτηριακών στην αντιμικροβιακή δράση διαφόρων χρωστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των ειδικών θρεπτικών υλικών όπως ο σεληνίτης, το τετραθειονικό νάτριο, το στίλβον πράσινο κ.ά. (O Hara et al. 1992).

6.5 Νόσοι από *Salmonella Spp*

Οι Εντερικές σαλμονελλώσεις προκαλούν:

1. Τυφοειδής πυρετός, παράτυφοι.
2. Εντερίτις από σαλμονέλλες.
3. Τροφική δηλητηρίαση ή εντεροτοξινική εντερίτις. (Chaicumpa et al. 1992).

Οι Εξωεντερικές σαλμονελλώσεις προκαλούν:

1. Οστεομυελίτιδα και σηπτική αθροίτιδα
2. Άσηπτος αντιδραστική αθροίτιδα.
3. Λοιμώξεις μαλακών ιστών.
4. Μηνιγγίτις.
5. Ουρωλοίμωξη. (Chalker & Blaser 1988).

7. ENTEROBACTERIACEAE

7.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Τα εντεροβακτηριακά αποτελούν μια μεγάλη ετερογενή οικογένεια η οποία περιλαμβάνει Gram αρνητικά βακτηρίδια πλάτους 1μm και μήκους 0,6 έως 6,0 μm τα οποία παρουσιάζουν ορισμένα τυπικά χαρακτηριστικά

A) δεν σχηματίζουν σπόρους

B) κινούνται με βλεφαρίδες ή είναι ακίνητα

Γ) αναπτύσσονται σε κοινά στερεά και υγρά θρεπτικά υλικά

Δ) αναπτύσσονται αερόβιος και προαιρετικά αναερόβιος

E) ζυμώνουν τη D-γλυκόζη και αλλά σάκχαρα συχνά με παράγωγη οξέος ή οξέος και αερίων

Στ) ανάγουν τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη (με μερικές εξαιρέσεις)

Z) δίνουν θετική την αντίδραση κατάλυσης και αρνητική την αντίδραση της οξειδωσης

H) η περιεκτικότητα του DNA τους σε γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C) κυμαίνεται μεταξύ 39-59%.

Τα Εντεροβακτηριακά είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση. Βρίσκονται στο περιβάλλον (έδαφος και νερό) και αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου και των ζώων (**Abbott S. 2003**). Ορισμένα είδη έχουν συγκεκριμένη οικολογική φωλιά π.χ. η *Salmonella typhi* που προκαλεί τυφοειδή πυρετό βρίσκεται μόνο στον άνθρωπο. Αντίθετα το είδος *Klebsiella pneumonia* παρουσιάζει ευρεία εξάπλωση στο περιβάλλον όπου συμμετέχει σε βιοχημικές και γεωχημικές διεργασίες, αλλά παράλληλα, προσβάλλει και τον άνθρωπο στον οποίο μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις (**Farmer J.J 2003**).

7.2 Ταξινόμηση

Τα εντεροβακτηριακά αποτελούν μια οικογένεια μικροβίων ιδιαίτερα ετερογενή. Έχουν περιγραφεί περισσότερα από 30 γένη και 120 είδη (**Murray P. R. et al. 1998**).

Η ταξινόμηση τους αρχικά στηρίχτηκε σε βιοχημικά, φαινοτυπικά, λειτουργικά και οντογονικά χαρακτηριστικά και αποτέλεσε πεδίο έντονης αντιπαράθεσης διαφωνιών και σύγχυσης. Με την πρόοδο στον τομέα των τεχνικών αλληλούχισης και υβριδισμού των νουκλεϊκών οξέων, καθώς και της φυλογενετικής ανάλυσης, έγινε δυνατή η καλύτερη ταξινόμηση και ο προσδιορισμός των σχέσεων μεταξύ των διαφόρων μελών της οικογένειας καθώς επίσης και η ανακάλυψη νέων ειδών.

Σύμφωνα με την ταξινόμηση η οποία προτάθηκε από το κέντρο Έλεγχου Λοιμωδών Νοσημάτων (CDC) των ΗΠΑ, τα γένη της οικογένειας των εντεροβακτηριακών είναι τα ακόλουθα:

Budvicia, Buttiauxella, Cedecea, Citrobacter, Edwardsiella, Enterobacter, Esherichia, Shigella, Ewingella, Hafnia, Klebsiella, Kluyvera, Leclercia, Leminorella, Moellerella, Morganella, Obesumbacterium, Pragia, Pantoea, Photorhabdus, Plesiomonas, Proteus, Providencia, Rahnella, Salmonella, Serratia, Tatumella, Trabulsiella, Xenorhabdus, Yersinia, Yokenella (Koserella), Enteric Group 58,59,60,63,64,68,69,137.

Κάθε γένος υποδιαιρείται σε είδη και υποείδη, των οποίων ο αριθμός είναι δύσκολο να προσδιοριστεί, δεδομένης της συνεχούς ανακάλυψης νέων ειδών και στελεχών. Επίσης λόγω του μεγάλου αριθμού και της ποικιλίας των Εντεροβακτηριακών είναι αναγκαίο να διακρίνονται τα βακτηρίδια της οικογένειας αυτής σε δυο ομάδες.

Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει γένη και είδη που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου ή είδη που σχετίζονται με την πρόκληση λοιμώξεων στον άνθρωπο. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει γένη που δύναται να αποικίζουν τον άνθρωπο αλλά σπανίως προκαλούν λοιμώξεις σε αυτόν. Συνηθεστέρα χαρακτηρίζονται ως αποικιστές του περιβάλλοντος και των ζώων (**Bailey & Scott, 2002**). Πληθώρα νέων ειδών περιγράφονται συνεχώς από ερευνητές. Η *Buttiauxella noackiae* και η *Kluyvera Georgiana* αποτελούν δυο νέα είδη με κλινική σημασία για τον άνθρωπο (**Müller H. E. Et al 1996**). Η *Plesiomonas shigelloides* αποτελεί επίσης νέο είδος αφού η αλληλούχιση του rRNA έδειξε μεγάλη γενετική συγγένεια με τον *Proteus vulgaris*. Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι η περιγραφή νέων ειδών, ο επαναπροσδιορισμός των φυλογενετικών

σχέσεων με τη χρήση των νέων τεχνικών μοριακής βιολογίας και η συσσώρευση νέων δεδομένων οδηγεί αναπόφευκτα σε αλλαγές στην ταξινόμηση των εντεροβακτηριακών (Martinez-Murcia A. J et al, 1992).

7.3 Καλλιέργεια

Εντεροβακτηριακά μπορεί να απομονωθούν από κλινικά, τροφικά, φαρμακευτικά αλλά και άλλα δείγματα. Τα περισσότερα εντεροβακτηριακά αναπτύσσονται πολύ καλά σε κοινά θρεπτικά υλικά όπως το θρεπτικό και το σοκολατόχρωμο άγαρ και σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (10-42°C) με ευνοϊκότερη θερμοκρασία τους 35-37°C.

Το διαφοροποιητικό υλικό που χρησιμοποιείται συχνότερα για την απομόνωση των εντεροβακτηριακών είναι το MacConkey άγαρ. Το Mac Conkey άγαρ περιέχει ως βάση την πεπτόνη, ως δείκτη ουδέτερο του ερυθρού, άλατα χολής, λακτόζη και κρυσταλλικό ιώδες για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των Gram- θετικών βακτηρίων και των μυκήτων. Στην περίπτωση που κάποιο εντεροβακτηριακό ζυμώνει τη λακτόζη, πέφτει το pH του θρεπτικού υλικού με αποτέλεσμα η αποικία του μικροβίου να παίρνει κόκκινο-ροζ χρώμα (Bailey & Scott, 2002).

Το XLD άγαρ χρησιμοποιείται για την διάκριση των σαμονέλλων και των σιγκέλλων. Περιέχει ξυλόζη, L-λυσίνη, λακτόζη, σουκρόζη, δεοξυχολικό νάτριο, κιτρικό αμμώνιο σιδήρου και ως δείκτη ερυθρό της φαινόλης. Το S-S άγαρ είναι εκλεκτικό υλικό που εμποδίζει την ανάπτυξη των εσερίχιων αλλά επιτρέπει την ανάπτυξη των σαλμονέλλων και σιγκέλλων. Περιέχει πεπτόνη, λακτόζη, χολικά άλατα, κιτρικό νάτριο, θειοθειικό νάτριο, κιτρικό σίδηρο, στίλβον πράσινο και ως δείκτη ουδέτερο ερυθρό. Το θειοθειικό νάτριο αποτελεί πηγή θείου και χρησιμοποιείται από τα βακτήρια που παράγουν H₂S και δίνει μαύρο χρώμα στις αποικίες αυτών. Ο ζωμός σεληνίτη ενώ είναι τοξικός για τα περισσότερα εντεροβακτηριακά ευνοεί την ανάπτυξη *Salmonella spp.*

Για την απομόνωση της σαλμονέλλας χρησιμοποιείται υψηλής εκλεκτικότητας θρεπτικό υλικό όπως το brilliant green άγαρ ή το bismuth sulfite άγαρ. Το brilliant green άγαρ εμποδίζει την ανάπτυξη των περισσότερων Gram θετικών και Gram αρνητικών συμπεριλαμβανομένης της σιγκέλλας και σαλμονέλλας του τύφου, ενώ αναπτύσσονται όλες οι υπόλοιπες σαλμονέλλες. Τέλος το CHROMagar Orientation χρωμογόνο άγαρ με το οποίο μπορεί να γίνει αδρή ταυτοποίηση βασισμένη στο χρώμα που παίρνουν οι αποικίες των βακτηρίων όταν αυτά αναπτυσσόμενα αντιδρούν ενζυματικά με χρωμογόνα

συστατικά του υλικού, η θρεπτική βάση του CHROMagar είναι πεπτόνη και γλυκόζη ενώ διάφορα άλλα μίγματα χρωμογόνων και αντιβιοτικά συντελούν στην εύκολη ταυτοποίηση ιδιαίτερα του *E.coli* O157:H7. (Farmer J.J, 2003).

7.4 Βιοχημικές ιδιότητες

Η ταυτοποίηση των εντεροβακτηριακών με βάση τις βιοχημικές τους ιδιότητες (σακχαροδιασπαστικές και ενζυμικές-βιολογικές) γίνεται με ορισμένες βιοχημικές δοκιμασίες. Οι σπουδαιότερες από αυτές είναι οι εξής:

A) Η δοκιμασία διάσπασης της λακτόζης – η οποία αναγνωρίζεται εύκολα κατά την ανάπτυξη σε θρεπτικά υλικά τα οποία περιέχουν λακτόζη και δείκτη. Έτσι γίνεται μια αδρή διάκριση των εντεροβακτηριακών σε γένη που ζυμώνουν τη λακτόζη (*Escherichia, Klebsiella, Enterobacter*) και γένη που δε ζυμώνουν τη λακτόζη (*Salmonella, Shigella, Citrobacter, Edwardsiella, Serratia, Proteus-Providencia*)

B) Η δοκιμασία παραγωγής της ινδόλης. Κατά την ανάπτυξη ορισμένων ειδών Εντεροβακτηριακών παράγεται το ενζυμο τρυπτοφανάση το οποίο διασπά το αμινοξύ τρυπτοφάνη που υπάρχει πλούσιο στην πεπτόνη του θρεπτικού υλικού σε ινδόλη. Η παραγωγή της ινδόλης ανιχνεύεται με το αντιδραστήριο Kovacs .

Γ) Η δόκιμη διάσπασης της ουρίας από Εντεροβακτηριακά που παράγουν ουρεάση.

Δ) Η δοκιμασία παραγωγής υδρόθειου από εντεροβακτηριακά που διασπών αμινοξέα που περιέχουν θείο.

Στ) Η δοκιμασία διάσπασης διαφόρων σακχάρων (γλυκόζη, αδονιτόλη, αραβινόλη, δουλσιτόλη, εσκουλίνη, ινοσιτόλη, μαλτόζη, μαννιτόλη, σαλικίνη, σορβιτόλη, σουκρόζη, τρεχαλόζη, ξυλόζη) με την παραγωγή οξέος και αερίου σε πεπτονούχα υλικά.

Z) Δοκιμασία παραγωγής ONPG (β-γαλακτοσιδάσης). Η ONPG έχει δομή παρόμοια με τη δομή της λακτόζης. Διασπάται υπό την επίδραση της β-γαλακτοσιδάσης προς γαλακτόζη και ορθο-νιτροφαινόλη.

H) Δοκιμασία αναγωγής νιτρικών (NO_3) σε νιτρώδη (NO_2). Υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις για την ταυτοποίηση των εντεροβακτηριακών. Εκτός από τις κλασσικές βιοχημικές διαδικασίες με τη μέθοδο των σωληνάρων οι οποίες ακόμα χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια αναφοράς, σήμερα προτιμούνται "manual"

συστήματα με τυποποιημένα αντιδραστήρια του εμπορίου (API 20E, CRYSTAL, ENTEROTUBE κ.α).

Το API 20E είναι ένα αυτόνομο μικροσύστημα των συμβατικών βιοχημικών διαδικασιών ταυτοποίησης των εντεροβακτηριακών. Η Ταυτοποίηση γίνεται με την μετατροπή του αποτελέσματος της αντίδρασης σε αριθμητικό προφίλ το οποίο στη συνέχεια ερμηνεύεται βάσει ειδικού καταλόγου (Waites KB et al. 2002).

Πίνακας 3 : Βιοχημικές ιδιότητες των κυριότερων Εντεροβακτηριακών

ΓΕΝΟΣ/ ΕΙΔΟΣ	E.coli	Klebsiella	Enterobacter Cloacae	Serratia Marcesens	Providencia		Proteus			Salmonella	Morganella morgani	Shiglla	Citrobacter freundii
					Alcal	Stuart	Mirabilis	Vulgari	Peneri				
ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΓΛΥΚΟΖΗΣ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΕΡΙΟΥ	+	+	+	+/-	+/-	-	+	+	+	+	+	-	+
ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΛΑΚΤΟΖΗΣ	+	+	+	Βραδέως	-	-	-	-	-	-	-	-	Βραδέως
ONPG	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	- sonei+	+
ΚΙΝΗΤΙΚΟΤ ΗΤΑ	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΟΥΡΙΑΣ	+	+	-	-	-	-/+	+	+	+	-	+	-	-
CITRATE	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΝΔΟΛΗΣ	+	Oxytoca+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-ή+	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
PPA Phe	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
VP	-	+	+	+	-	-	+ή-	-	-	+	-	-	-
Arginine	D	-	+	-	-	-	-	-	-	+ή-	-	-	D
Lysine	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Ornithine	D	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-sonei+	-

ΟΞΕΙΔΑΣΗ	-	-	-	-	- -	- - -	-	-	-	-
DNΑαση	-	-	-	+	- -	- - -	-	-	-	-
ΝΙΤΡΙΚΑ	+	+	+	+	+ +	+ + +	+	+	+	+

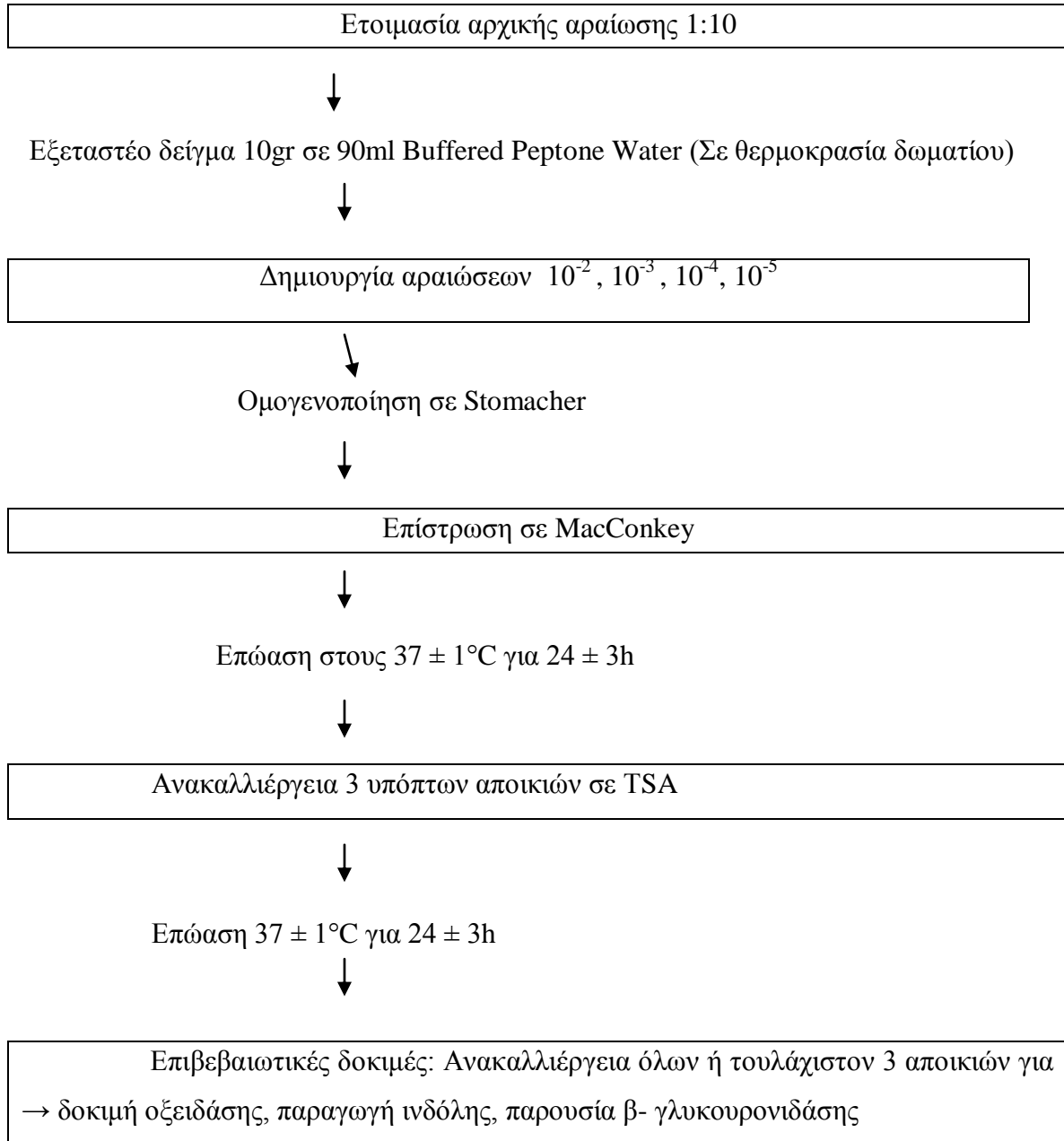
ONPG: ο-νιτρο-φαινυλ-β-γαλακτοπυρανοσιδή, **PPA Phe:** απαμίνωση της φαινυλαλανίνης **VP:** voges Proskauer, **DNΑαση :** δοκιμή δεοξυριβονουκλεασής

7.5 Νόσοι από Εντεροβακτηριακά

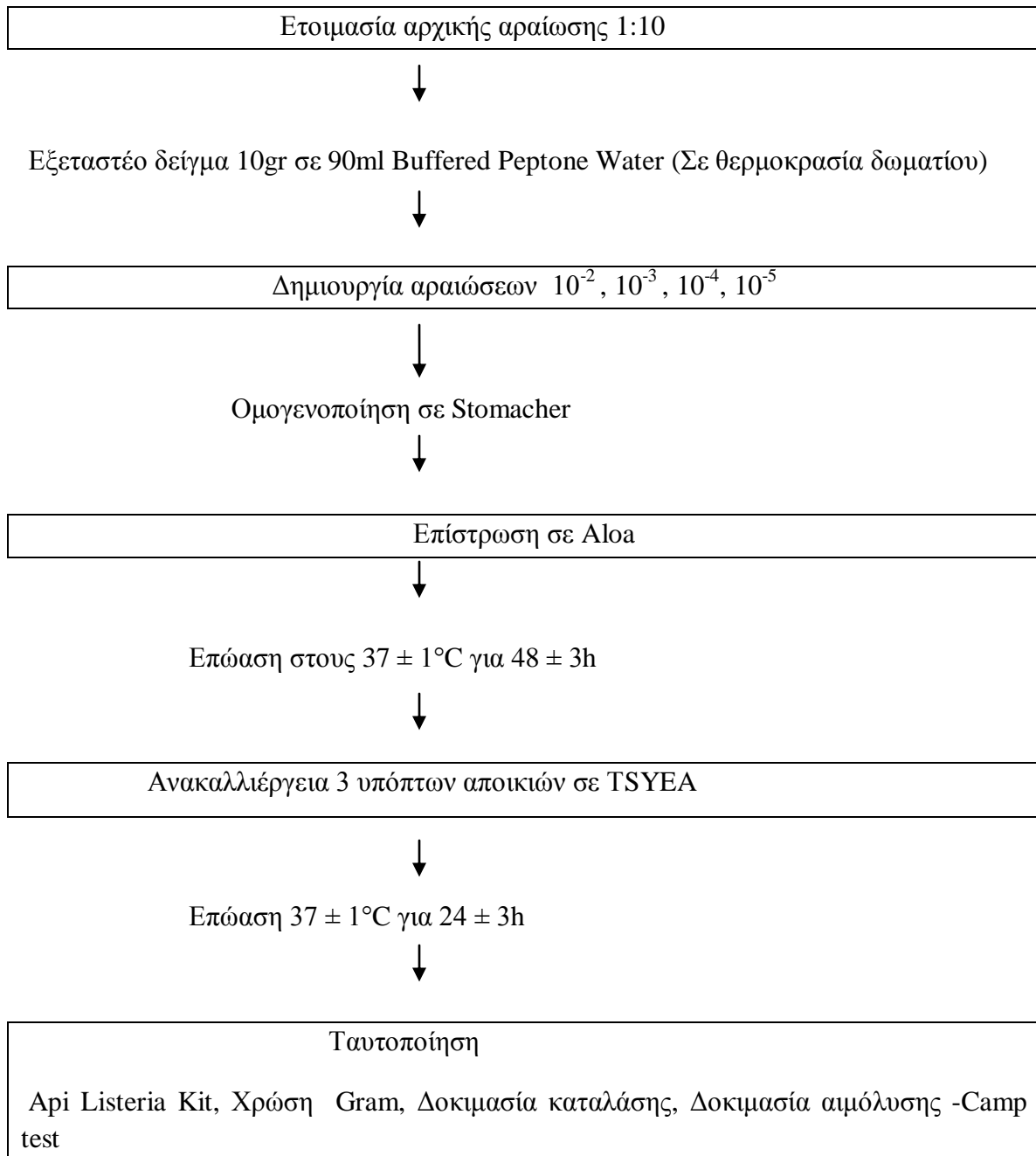
Η οικογένεια των εντεροβακτηριακών περιλαμβάνει έναν σημαντικό αριθμό παθογόνων ειδών, που είναι αίτια διαφόρων λοιμώξεων στον άνθρωπο. Τα είδη αυτά μπορούν να διακριθούν στα ευκαιριακά παθογόνα και στα παθογόνα. Στην κατηγορία των παθογόνων ανήκουν τα Εντεροβακτηριακά *Salmonella typhi*, *Shigella spp.* και *Yersinia pestis*, που προκαλούν τυφοειδή πυρετό, δυσεντερία και βουβωνική πανώλη, αντίστοιχα. Στα ευκαιριακά παθογόνα ανήκουν τα *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, τα οποία σε υγιή άτομα δε προκαλούν νόσο. Παρότι πρόκειται για ευκαιριακά παθογόνα η λοιμογόνος δράση τους μπορεί να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (**Bailey & Scott, 2002**).

8. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗΣ

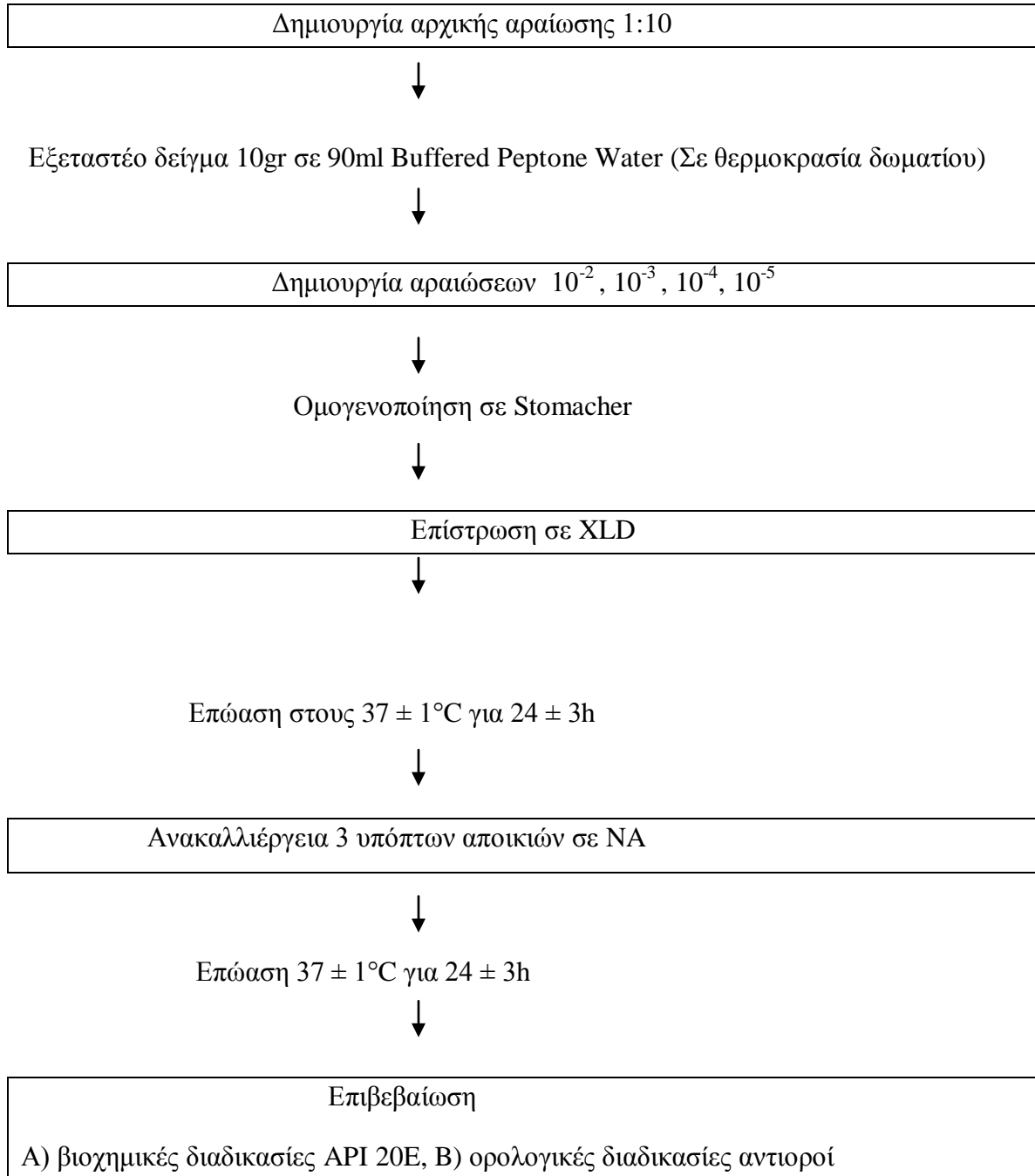
8.1 Μέθοδος καταμέτρησης Health Protection Agency (HPA)



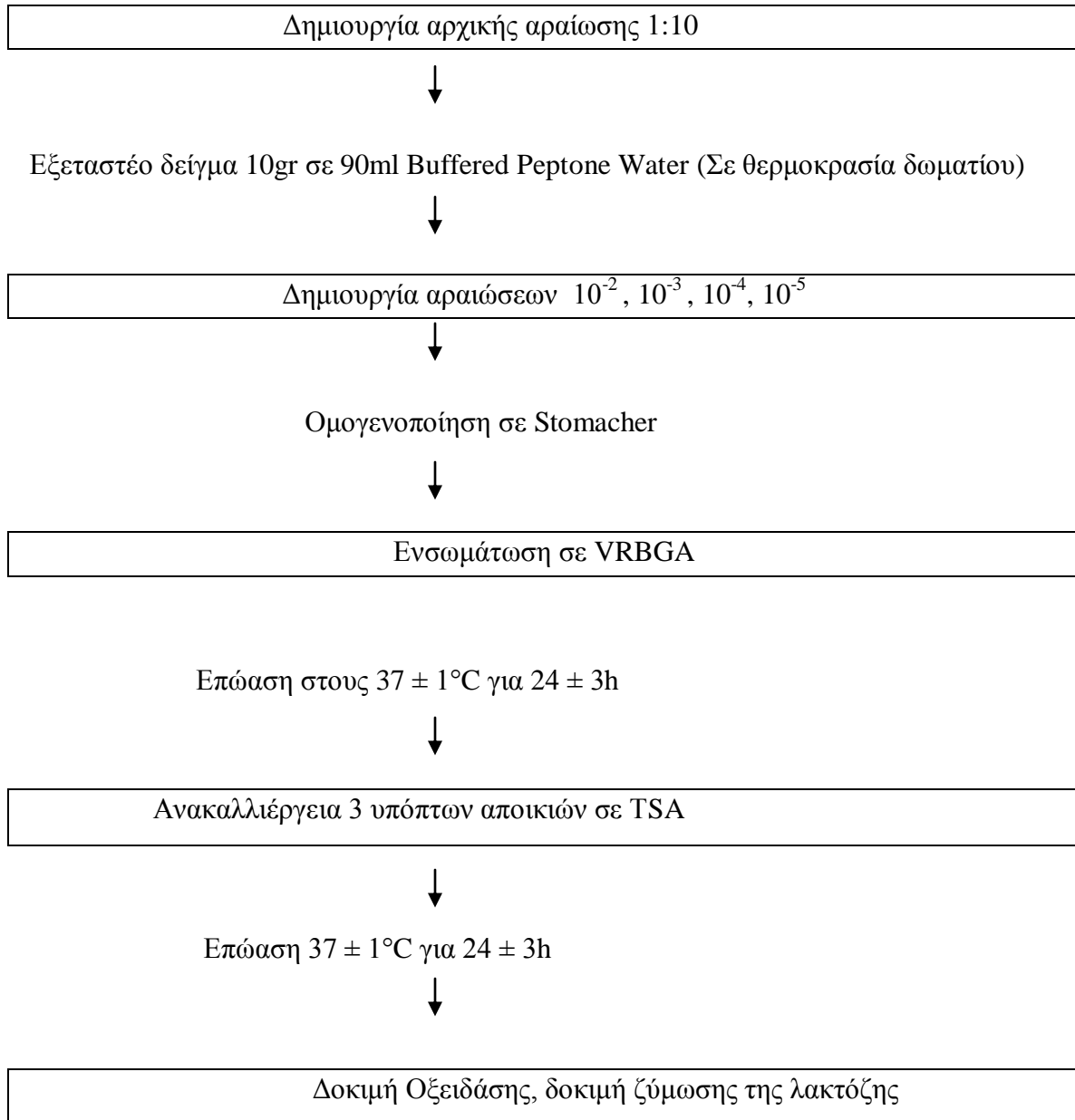
8.2 Μέθοδος καταμέτρησης *Listeria monocytogenes* ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004



8.3 Μέθοδος καταμέτρησης Salmonella spp. ΕΛΟΤ EN ISO 6579:2003 / TC1:2004



8.4 Μέθοδος καταμέτρησης Εντεροβακτηριακών Statutory Instrument SI 2383,1989 και BS 4285:3.7.



9. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

9.1 Ορισμοί

Σύμφωνα με τον **Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα :**

Μικροβιολογικό κριτήριο: είναι ένα κριτήριο που καθορίζει το αποδεκτό ενός προϊόντος, μιας παρτίδας τροφίμων ή μιας διαδικασίας, με βάση την απουσία, την παρουσία ή τον αριθμό μικροοργανισμών, ή/και με βάση την ποσότητα των τοξινών ή μεταβολιτών τους, ανά μονάδα μάζας, όγκου, επιφάνειας ή ανά παρτίδα.

Κριτήριο υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας: είναι ένα κριτήριο που καθορίζει την αποδεκτή λειτουργία της διαδικασίας παραγωγής· ένα τέτοιο κριτήριο δεν εφαρμόζεται στα προϊόντα που διατίθενται στην αγορά· ορίζει μια ενδεικτική τιμή μόλυνσης πάνω από την οποία απαιτούνται διορθωτικές ενέργειες προκειμένου να διατηρηθεί η υγιεινή της παραγωγικής διαδικασίας σύμφωνα με τη νομοθεσία για τα τρόφιμα.

Κριτήριο ασφάλειας των τροφίμων: είναι ένα κριτήριο που καθορίζει το αποδεκτό ενός προϊόντος ή μιας παρτίδας τροφίμων και το οποίο εφαρμόζεται στα προϊόντα που διατίθενται στην αγορά.

9.2 Νομοθεσία

Σύμφωνα με τον **Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1441/2007 της Επιτροπής της 5ης Δεκεμβρίου 2007** για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα:

E. coli: Κομμένα φρούτα και λαχανικά (έτοιμα προς κατανάλωση). Η νομοθεσία επιβάλλει ποσότητα <1000 cfu/gr.

Listeria monocytogenes: Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και ιατρικούς σκοπούς. Η νομοθεσία επιβάλλει ποσότητα < 100 cfu/gr.

Salmonella: Κομμένα φρούτα και λαχανικά (έτοιμα για κατανάλωση). Η νομοθεσία επιβάλλει απουσία σε 25gr τροφίμου στην μέθοδο της αντίχνευσης. Σύμφωνα με την μέθοδο καταμέτρησης που χρησιμοποιήσαμε μεταφράζεται ποσότητα <100 cfu/gr.

Enterobacteriaceae: Η νομοθεσία αφορά μόνο γάλα και κρέας. Δεν αναφέρεται τίποτα για φρούτα και λαχανικά ή γενικά για τρόφιμα.

10. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

10.1 Οργανοληπτικός έλεγχος τροφίμων

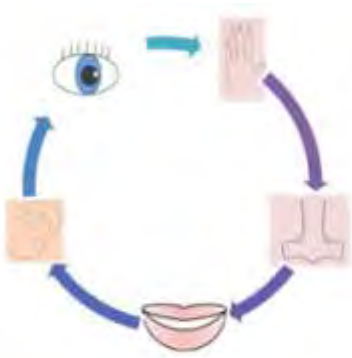
Ο Οργανοληπτικός έλεγχος και η αξιολόγηση των τροφίμων ασχολείται με την αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών ενός προϊόντος από τις αισθήσεις και είναι συνυφασμένος με τις δοκιμές και τις μεθόδους αξιολόγησης. Ο μέσος καταναλωτής εφαρμόζει τις αρχές του οργανοληπτικού ελέγχου ίσως και άθελα του. Έτσι σε κάθε ευκαιρία δοκιμάζει το προς κατανάλωση προϊόν, το επεξεργάζεται με όλες του τις αισθήσεις, το βλέπει, το αγγίζει, το μυρίζει, το γεύεται (**ISO 5492:2008**).

Η ιστορία των οργανοληπτικών ελέγχων ξεκινάει από τότε που οι πρώτοι άνθρωποι ξεχώρισαν το καλό από το κακό στα τρόφιμα και σε οτιδήποτε άλλο μπορούσε να καταναλωθεί. Η ανάπτυξη του πνεύματος ανταλλαγής προϊόντων ως μέσο αγοραπωλησίας έφερε και τα πρώτα πιο επίσημα τεστ οργανοληπτικής αξιολόγησης. Ο αγοραστής, ελπίζοντας πως ένα δείγμα της παραλαβής αντιπροσωπεύει όλο το προϊόν, δοκίμαζε και καθόριζε την τιμή αγοραπωλησίας. Το 1946 η συστηματική οργανοληπτική ανάλυση συμπεριλήφθηκε στη προσπάθεια για παραγωγή τροφίμων αποδεκτών από τον Αμερικάνικο στρατό (**Dove 1946, 1947**). Από εκεί και πέρα ο οργανοληπτικός έλεγχος και τα εργαλεία αξιολόγησής του αναπτύχθηκαν ραγδαία.

10.2 Βασικές αισθήσεις.

Η οργανοληπτική ανάλυση περιλαμβάνει την εξέταση ενός τροφίμου με την χρήση των πρωτογενών ή βασικών αισθήσεων την γεύση, την όσφρηση, την όραση, την ακοή, την αφή ή και συνδυασμό αυτών. Το αποτέλεσμα των αισθήσεων βασίζεται στη λειτουργία των νεύρων και στη συνεχή ανατροφοδότηση πληροφοριών. Το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα συμμετέχει σε αυτή τη διαδικασία κατανόησης και μετάφρασης των αισθήσεων. Τα νευρικά ερεθίσματα, π.χ. μυρωδιά, φτάνουν υπό μορφή δυναμικού ενέργειας στους προσυναπτικούς νευρώνες. Ο νευρομεταβιβαστής απελευθερώνεται στη σύναψη και συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς στη μεμβράνη του

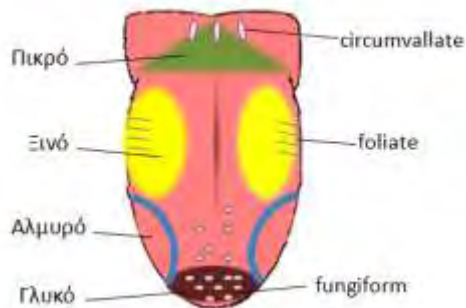
μετασυναπτικού κυττάρου προκαλώντας τη διέγερσή του. Η αρχή λειτουργίας των νευρών είναι κοινή είτε πρόκειται για όσφρηση είτε για οποιαδήποτε άλλη αίσθηση. Από την έναρξη της οργανοληπτικής αξιολόγησης (όραση) μέχρι την τελική κατάποσή του προϊόντος τα ερεθίσματα που δέχεται ο εγκέφαλος είναι πολλά. Η τελική αίσθηση που αφήνει η όλη διαδικασία οφείλεται σε ένα σύνολο ερεθισμάτων και πληροφοριών που δέχεται ο εγκέφαλος (Verhagen and Engelen 2006, Verhagen 2007).



Εικόνα 1. Σχήμα στο οποίο παρουσιάζονται οι 5 βασικές αισθήσεις του ανθρώπου, (όραση, αφή, όσφρηση, γεύση και ακοή)

10.2.1 Γεύση

Γεύση είναι η αντιληπτή αίσθηση από το μέσο γεύσης, όταν αυτό διεγείρεται από ορισμένες διαλυτές ουσίες του προϊόντος. Οι βασικές γεύσεις που αναγνωρίζονται είναι:



Εικόνα 2. Ζώνες γλώσσας όπου εντοπίζονται οι διάφορες γεύσεις

- Πικρό: γεύση που παράγεται από υδατικά διαλύματα διαφόρων ουσιών, όπως η κινίνη ή η καφεΐνη.
- Αλμυρό: γεύση που παράγεται από αραιό υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου.
- Γλυκό: γεύση που παράγεται από αραιό υδατικό διάλυμα των φυσικών ή τεχνητών ουσιών όπως σακχαρόζη ή ασπαρτάμη.
- Ξινό: γεύση περίπλοκη, συνήθως λόγω της παρουσίας των οργανικών οξέων (ISO 5492:2008).

Η κάθε γεύση εντοπίζεται σε διαφορετικές ζώνες της γλώσσας, ανάλογα με τους γευστικούς κάλυκες που εδράζουν εκεί. Μόρια τροφίμων διασκορπίζονται στη στοματική κοιλότητα και έρχονται σε επαφή με τα αισθητήρια όργανα της γεύσης. Έτσι στο μπροστινό τμήμα της γλώσσας εδράζουν μυκητοειδείς αυξήσεις (fungiform), σχηματισμοί στο επιθήλιο, όπου υπάρχουν κάλυκες από τους οποίους αναγνωρίζεται η γλυκιά γεύση (Εικόνα 2). Πλευρικά του κυρίου σώματος της γλώσσας βρίσκονται οι πλευρικές πτυχώσεις (foliate) στις οποίες αναγνωρίζονται η αλμυρή και η ξινή γεύση. Τέλος, κοντά στη βάση της γλώσσας, εδράζουν 8-12 θηλές (circumvallate), οι κάλυκες

των οποίων ανταποκρίνονται στην πικρή και σε μικρό βαθμό στην ξινή γεύση (Meilgaard 2007).

Κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση χρησιμοποιούνται ακόμη δύο γεύσεις, η umami “είναι η ευχάριστη νόστιμη γεύση” και η μεταλλική “είναι όταν νοιώθεις ένα τσίμπημα στην γλώσσα”. Η πρώτη παράγεται από αραιά υδατικά διαλύματα, από ένα ορισμένο είδος αμινοξέος ή νουκλεοτίδιου, όπως το όξινο γλουταμινικό νάτριο και συνδέεται με το πικάντικο, ενώ η δεύτερη παράγεται από διαλύματα βάσεων (π.χ. υδροξείδια νατρίου) και συχνά αναφέρεται ως η γεύση που έχει το αίμα. Οι γεύσεις αυτές δεν αναγνωρίζονται από όλους, ωστόσο χρησιμοποιούνται ευρέως, ειδικά κατά την εκπαίδευση των δοκιμαστών, και αυτό γιατί είναι εύκολα αναγνωρίσιμες. Τον τελευταίο καιρό, γίνεται λόγος για μία ακόμη γεύση που σχετίζεται με την αναγνώριση του λίπους. Αμερικανοί επιστήμονες φαίνεται να ανακάλυψαν ένα γονίδιο που ρυθμίζει την ικανότητα αναγνώρισης αυτής της νέας γεύσης.

10.2.2 Όσφρηση

Όσφρηση είναι η αίσθηση που γίνεται αντιληπτή μέσω των οργάνων όσφρησης κατά την εισπνοή ορισμένων πτητικών ουσιών. Ο οσφρητικός βλεννογόνος φέρει επιθήλιο στο οποίο εδράζουν τα οσφρητικά κύτταρα. Κάθε κύτταρο έχει δύο αποφυάδες με 6-8 τριχίδια, τους οσφρητικούς υποδοχείς. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν 25 εκατομμύρια οσφρητικά κύτταρα με μέσο όρο ζωής 30 ημέρες. Περίπου το 1% αυτών δεν αναπληρώνονται με αποτέλεσμα με το πέρασμα των ετών να χάνεται η οσφρητική ικανότητα. Ο μέσος άνθρωπος μπορεί να ανιχνεύσει περίπου 10.000 διαφορετικές οσμές. Ωστόσο, δεν μπορεί να τις ονοματίσει. Η κατανόηση των διαφόρων ουσιών προϋποθέτει οι ουσίες αυτές να είναι πτητικές και σχετικά υδατο- ή λιπο- διαλυτές. Το οσφρητικό αποτέλεσμα οφείλεται σε κάποιες δραστικές ομάδες, η στερεοχημική δομή των οποίων επηρεάζει το χαρακτήρα και την ένταση της οσμής (ISO 5492:2008).

10.2.3 Όραση

Το όργανο αντίληψης της όρασης είναι το μάτι ενώ το αντικείμενο της αντίληψης είναι το φως. Αυτό που βλέπουμε- το φως- είναι το αποτέλεσμα του ερεθισμού του αισθητηρίου της όρασης (μάτι) από ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος (ορατή ακτινοβολία 380-770 nm). Το φως εισέρχεται στο μάτι μέσω της κόρας και εστιάζεται μέσω του κερατοειδή χιτώνα και του φακού, στον αμφιβληστροειδή, στο πίσω μέρος του ματιού. Οι υποδοχείς στο σημείο αυτό ανιχνεύουν την ενέργεια και με μία διαδικασία μεταγωγής σήματος, θέτουν σε εφαρμογή δυναμικά ενέργειας, που ταξιδεύουν στο οπτικό νεύρο. Περίπου το 30% του ανθρώπινου εγκεφάλου ασχολείται με την επεξεργασία και ερμηνεία των ερεθισμάτων της όρασης. Περίπου το 30% του ανθρώπινου εγκεφάλου ασχολείται με την επεξεργασία και ερμηνεία των ερεθισμάτων της όρασης (Meilgaard 2007).

10.2.4 Υφή

Η έννοια της υφής περιλαμβάνει όλα τα μηχανικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά του σώματος ενός προϊόντος που γίνονται αντιληπτά με τη βοήθεια κιναισθησίας από οπτικούς και ακουστικούς υποδοχείς από την πρώτη μπουκιά έως τη τελική κατάποση (ISO 5492:2008).

Οι μηχανικές ιδιότητες είναι εκείνες που σχετίζονται με την αντίδραση του προϊόντος στην πίεση και χωρίζονται σε πέντε κύρια χαρακτηριστικά:

- Σκληρότητα: εκφράζει το σύνολο της δύναμης που απαιτείται για να υποστεί παραμόρφωση το τρόφιμο.
- Συνεκτικότητα: εκφράζει το ποσοστό κατά το οποίο ένα τρόφιμο παραμορφώνεται πριν σπάσει.
- Ιξώδες: εκφράζει τη δύναμη που απαιτείται για τη μετακίνηση ενός τροφίμου με τη γλώσσα από το κουτάλι ή για την επάλειψη του ως το υπόστρωμα.

- Ελαστικότητα: εκφράζει τη ταχύτητα και το βαθμό επαναφοράς στην αρχική κατάσταση ύστερα από άσκηση δύναμης.
- Κολλητικότητα: εκφράζει τη δύναμη που απαιτείται για απομάκρυνση ουσιών που έχουν κολλήσει στο στόμα.

Πέραν αυτών των ιδιοτήτων στα πλαίσια της υφής, κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση, μπορούν να μελετηθούν η μασητικότητα, η ευθραυστότητα καθώς επίσης το μέγεθος, το σχήμα και η κατανομή των σωματιδίων στο τρόφιμο. Τα χαρακτηριστικά του τροφίμου εμφανίζονται με την παρακάτω σειρά:

- Πριν την μάσηση (χέρια, χείλη όραση)
- Πρώτη δαγκωματιά (γεωμετρικές ιδιότητες)
- Φάση μάσησης (ψηλάφηση)
- Φάση παραμονής (αλλαγές)
- Κατάποση (υπολείμματα, ευκολία) (**ISO 11036: 1994**)

10.2.5 Ακοή

Ακοή είναι η αίσθηση που γίνεται αντιληπτή από τα αυτιά μέσω των ηχητικών κυμάτων που φτάνουν σε αυτά. Τα ηχητικά κύματα που διαδίδονται στο περιβάλλον με τη βοήθεια των πτερυγίων φτάνουν στο το τύμπανο κάνοντάς το να δονείται. Οι δονήσεις αυτές φτάνουν στο εσωτερικό του αυτιού, στον κοχλία, όπου μεταμορφώνονται σε ηλεκτρικό δυναμικό το οποίο με τη σειρά του φτάνει στον εγκέφαλο για να μεταφραστεί σε ήχο. Όσον αφορά την οργανοληπτική αξιολόγηση, ο ήχος δεν εξετάζεται ευρέως. Ωστόσο, ο τόνος, η ένταση και η χροιά ενός ήχου μπορούν να θεωρηθούν ως χαρακτηριστικά ποιότητας και φρεσκάδας για προϊόντα όπως chips, γαριδάκια, μπισκότα, μήλα κ.ά. και ως εκ τούτου μπορεί να συνυπολογίζονται κατά περίπτωση σε μια οργανοληπτική αξιολόγηση.

Στο σύγχρονο οργανοληπτικό έλεγχο όλα τα προηγούμενα μπορεί να αναλύονται είτε ξεχωριστά είτε σε συνδυασμό προκειμένου να καταλήξουν σε σημαντικά αποτελέσματα για την αξιολόγηση ενός τροφίμου. Τέλος, μοντέλα που συνδέουν τα χαρακτηριστικά αυτά με αντικειμενικές μεθόδους αναπτύσσονται προκειμένου να συνδεθούν τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης με μετρήσεις και με μελλοντικές προβλέψεις τελικών χαρακτηριστικών των προϊόντων (ISO 5492:2008).

10.3 Βασικές αρχές οργανοληπτικού ελέγχου

10.3.1 Οργάνωση και σχεδίαση οργανοληπτικής μελέτης

Ο οργανοληπτικός έλεγχος μπορεί να έχει ως σκοπό την βελτίωση ενός προϊόντος, την σύγκρισή του με άλλα προϊόντα ίδιου τύπου, την αντικατάσταση διαφόρων ουσιών σε αυτό, την εξοικονόμηση πόρων κ.α. Αφού καθοριστεί ο σκοπός της μελέτης ορίζονται και οι επιμέρους στόχοι των δοκιμών. Ο υπεύθυνος καλείται να επιλέξει σε ποια βασικά ερωτήματα θα πρέπει να απαντήσουν οι δοκιμαστές, γενική αποδοχή, σχετική προτίμηση, σύγκριση με βάση τα χαρακτηριστικά κ.α. Κατά τη διάρκεια της συζήτησης για τον ορισμό των στόχων θα πρέπει να βρεθούν όλα τα χαρακτηριστικά του δείγματος που θα εξεταστούν. Στη συνέχεια, επιλέγονται οι δοκιμαστές, έμπειροι, ειδικοί κ.α., και οι δοκιμές, τριγωνική, duo/trio, περιγραφική κ.α. Κατά την διεξαγωγή των δοκιμών θα πρέπει να εξασφαλίζεται ότι τηρούνται όλοι οι κανόνες και οι προδιαγραφές που έχουν τεθεί. Ακολουθεί, ανάλυση και παρουσίαση των αποτελεσμάτων με χρήση στατιστικών μοντέλων (ISO 6658:2005).



Εικόνα 3. Διάγραμμα 2. οργάνωση για την διεξαγωγή της οργανοληπτικής μελέτης.

10.3.2 Διαδικασία δοκιμής

Πριν την έναρξη της δοκιμής ο υπεύθυνος της οργανοληπτικής εξέτασης δίνει κάποια βασικά στοιχεία για τα υπό εξέταση προϊόντα, τις βασικές αρχές και τους χειρισμούς που θα πρέπει να ακολουθηθούν. Έτσι ενημερώνει για την ποσότητα του δείγματος που θα πρέπει να καταναλώσουν, τον τρόπο κατανάλωσης (με κουτάλι, με γουλιά κλπ) και τον χρόνο που θα είναι σε επαφή με το δείγμα (μία δαγκωνιά, γουλιά/φτύσιμο ή κατάποση). Τέλος, τα φύλλα αξιολόγησης που δίνονται προς συμπλήρωση στους δοκιμαστές περιλαμβάνουν και οδηγίες για τη σωστή διεξαγωγή της δοκιμής.

Η παρουσίαση των δειγμάτων είναι πολύ σημαντική. Τα δείγματα δίνονται κατά προτίμηση σε γυάλινους περιέκτες, ενώ για ορισμένα προϊόντα υπάρχουν ειδικές προδιαγραφές (π.χ. ελαιόλαδο). Η ποσότητα του δείγματος θα πρέπει να είναι ακριβής. Δείγματα όπως καφές, τσάι, λαχανικά κ.α. σερβίρονται κυρίως χωρίς συνοδευτικά, ενώ σε δοκιμές προτίμησης και αποδοχής τα δείγματα θα πρέπει να σερβίρονται όπως τα έχει συνηθίσει ο δοκιμαστής, π.χ. καφές με γάλα (Meilgaard et al. 2007).

Σε μία οργανοληπτική δοκιμή η σειρά, η κωδικοποίηση και ο αριθμός των δειγμάτων που προσφέρονται θα πρέπει να παρακολουθούνται. Ο χρόνος παρουσίασης

των δειγμάτων θα πρέπει να εμφανίζει μια σταθερή περιοδικότητα. Οι κωδικοί τους συνήθως αποτελούνται από τρία γράμματα ή αριθμούς, τυχαία επιλεγμένα. Ο αριθμός των δειγμάτων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μία δοκιμή δεν είναι απεριόριστος, αφού από ένα σημείο και μετά επέρχεται η οργανοληπτική κόπωση. Για τα μπισκότα, οκτώ ή δέκα δείγματα είναι το ανώτερο όριο, για την μύρα το αντίστοιχο όριο είναι έξι ή οκτώ. Για δείγματα με υψηλή επικάλυψη γεύσης, όπως πικρά διαλύματα, επιτρέπονται ένα με δύο. Στις οπτικές αξιολογήσεις μπορούν να εξεταστούν είκοσι με τριάντα δείγματα, αφού η κούραση είναι κυρίως ψυχολογική (**Lawless et al. 2003**).

10.3.3 Απόδοση δοκιμαστών.

Το πλέον κρίσιμο κριτήριο για την επιτυχία ενός οργανοληπτικού ελέγχου είναι η σωστή επιλογή των δοκιμαστών. Υπάρχουν κάποια βασικά κριτήρια επιλογής τους ανάλογα με τον στόχο του τεστ. Ωστόσο υπάρχουν και κάποιοι κρίσιμοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση τους.

Καταρχάς, η απόδοση των δοκιμαστών μπορεί να συνδεθεί με την ηλικία. Ειδικότερα, η αντίληψη της γεύσης και της όσφρησης μειώνονται σημαντικά με το πέρασμα των χρόνων. Όσον αφορά την όσφρηση, υπολογίζεται ότι καθημερινά χάνονται χωρίς να αναπληρώνονται το 1% των οσφρητικών κυττάρων με αποτέλεσμα, προϊόντος του χρόνου να χάνεται η οσφρητική ικανότητα. Έρευνες έδειξαν ότι η εκμάθηση των οσμών είναι πιο εύκολη στις μικρές ηλικίες, ωστόσο η ικανότητα αναγνώρισης τυχαίων οσμών δεν καθορίζεται από την ηλικία. Η εμπειρία των εκπαιδευμένων δοκιμαστών μπορεί να αντικαταστήσει την απώλεια της γεύσης και της όσφρησης που οφείλεται στο πέρασμα των ετών. Επίσης, έρευνες αποδεικνύουν ότι η οργανοληπτική μνήμη μπορεί να συσχετιστεί με το φύλο. Οι γυναίκες φαίνεται να έχουν πιο ισχυρή μνήμη και να αναγνωρίζουν καλύτερα τον στόχο της δοκιμής (**Laureati et al. 2008, Moller et al. 2004**).

Ο χρόνος που γίνονται τα τεστ είναι καθοριστικός, αφού οι δοκιμαστές δεν θα πρέπει να έχουν την αίσθηση του κορεσμού ούτε της πείνας κατά την αξιολόγηση.

Βέλτιστες ώρες είναι από τις 10 το πρωί έως το μεσημέρι. Επίσης, δεν θα πρέπει να γίνονται δοκιμές για τουλάχιστον δύο ώρες μετά από το κυρίως γεύμα. Το κάπνισμα, αν και δεν θεωρείται απαγορευτικός παράγοντας, επιδρά αρνητικά στην ικανότητα αναγνώρισης. Για τον λόγο αυτό συνιστάται να μην καπνίζουν τουλάχιστον μισή με μία ώρα πριν από τη δοκιμή. Επειδή ένας δυνατός καφές έχει την ιδιότητα να καλύπτει τις γεύσεις, δεν θα πρέπει να καταναλώνεται μία ώρα πριν τη δοκιμή. Οι δοκιμαστές που λαμβάνουν μέρος στην αξιολόγηση θα πρέπει να είναι απολύτως υγιείς, διότι και ένα απλό κρύωμα μπορεί να επιδράσει αρνητικά. Επίσης stress και σωματική κόπωση είναι ανασταλτικοί παράγοντες. Ο δοκιμαστής είναι υποχρεωμένος να ενημερώνει τον υπεύθυνο για τη σωματική και ψυχολογική του κατάσταση.

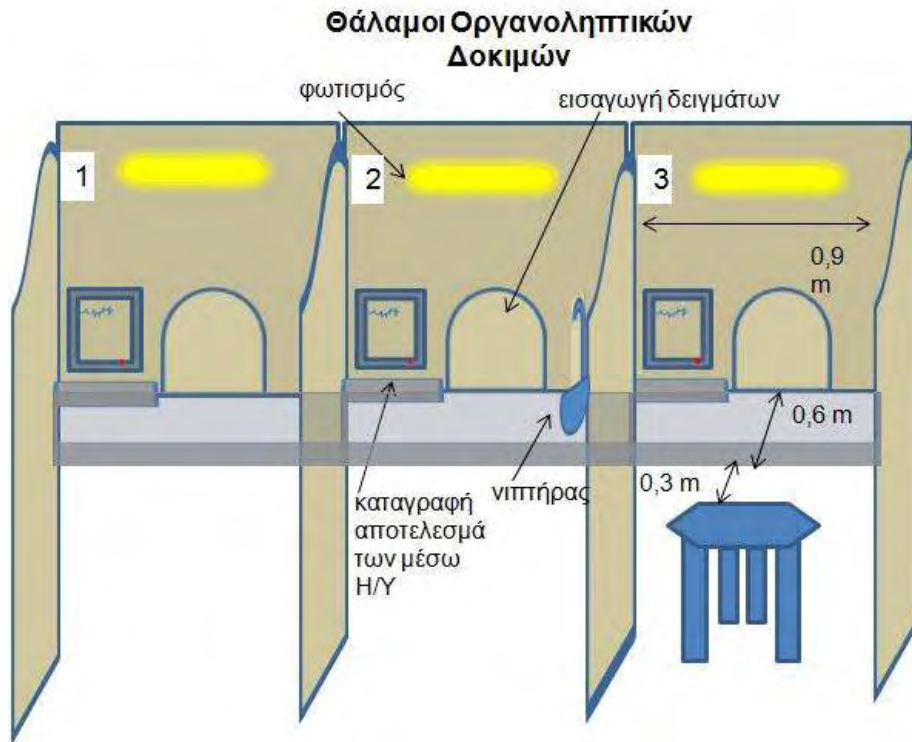
Γενικά, πριν την αξιολόγηση θα πρέπει να αποφεύγεται η κατανάλωση καφέ και διαφόρων τροφών. Επίσης, οι δοκιμαστές δεν θα πρέπει να φοράνε αρώματα, γιατί μπορεί να επηρεάσουν τη δική τους κρίση αλλά και των άλλων γύρω τους. Ο αριθμός των δοκιμών που μπορεί να λάβει μέρος ένας δοκιμαστής δεν είναι απεριόριστος, καθώς υπάρχει συσσώρευση κόπωσης και η κρίση επηρεάζεται από αυτό. Με το πέρας κάθε δοκιμής θα πρέπει να ξεπλένει το στόμα του με νερό, όταν πρόκειται για αξιολόγηση της γεύσης, ενώ αντίστοιχα, όταν πρόκειται για αξιολόγηση της οσμής, θα πρέπει να εισπνέει καθαρό αέρα (ISO 6658:2005).

10.3.4 Εγκαταστάσεις

Η οργανοληπτική αξιολόγηση θα πρέπει να λαμβάνει χώρα σε ειδικά διαμορφωμένες εγκαταστάσεις. Θα πρέπει να υπάρχει τουλάχιστον ένας χώρος όπου θα γίνονται οι δοκιμές και ένας δεύτερος όπου θα παρασκευάζονται τα δείγματα. Το δωμάτιο όπου γίνονται τα τεστ θα πρέπει να είναι εύκολα προσβάσιμο στους δοκιμαστές και με τέτοιο τρόπο δομημένο ώστε να μην απαιτείται να περνούν από το δωμάτιο παρασκευής. Ωστόσο το δεύτερο θα πρέπει να είναι κοντά με το πρώτο. Πέραν των δύο βασικών δωματίων μπορεί να υπάρχουν τουαλέτες, γραφείο δωμάτιο αναμονής, και χώρος αποθήκευσης.

Σκοπός είναι να παρέχεται στους δοκιμαστές ένα περιβάλλον που να μην τους αποσπά την προσοχή και να διευκολύνει τις εργασίες τους. Θερμοκρασία και υγρασία θα πρέπει να είναι ελεγχόμενες. Οι θόρυβοι θα πρέπει να περιορίζονται στο ελάχιστο και, ει δυνατόν, οι χώροι να είναι μονωμένοι. Ο αερισμός του χώρου είναι απαραίτητος ώστε να απομακρύνονται οι διάφορες οσμές, ενώ ακόμα και τα καθαριστικά που χρησιμοποιούνται δεν θα πρέπει να φέρουν αρώματα, κάτι που μπορεί να μπερδέψει τους δοκιμαστές. Ακόμα και η διακόσμηση του χώρου είναι σημαντική, αφού τα χρώματα στους τοίχους θα πρέπει να είναι ουδέτερα. Συνηθίζονται απαλές αποχρώσεις του γκρι ώστε να μην αποσπούν την προσοχή. Τέλος, ο φωτισμός και η ομοιομορφία του είναι αρκετά σημαντικά για την ορθή αξιολόγηση.

Πολλές φορές απαιτείται οι δοκιμαστές να είναι απομονωμένοι ο ένας από τον άλλο, ώστε να κρίνουν ανεπηρέαστα. Σε αυτή την περίπτωση υπάρχουν ειδικά διαμορφωμένοι θάλαμοι, μόνιμοι ή προσωρινοί (Σχήμα 3). Οι θάλαμοι αυτοί θα πρέπει να είναι άνετοι, να έχουν φωτισμό και ειδικό χώρο εισαγωγής των δειγμάτων. Εάν υπάρχει ηλεκτρονικός υπολογιστής για την καταγραφή των δεδομένων θα πρέπει να είναι έτσι τοποθετημένος ώστε να μην αποπροσανατολίζει τον δοκιμαστή από το τεστ. Χρήσιμο επίσης είναι να υπάρχει αρίθμηση στους θαλάμους για να διευκολύνονται δοκιμαστές και υπεύθυνοι του ελέγχου. Οι προτεινόμενες διαστάσεις για τους χώρους αυτούς είναι μήκος 0,9 m και πλάτος τραπεζιού 0,6 m. Οι θάλαμοι μπορεί να έχουν επίσης νιπτήρα. Σε αυτή την περίπτωση η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να είναι ελεγχόμενη. Οι θάλαμοι θα πρέπει να είναι χρώματος γκρι, σε απαλές αποχρώσεις (**ISO 8589:2007**).



Εικόνα 4. Θάλαμοι Οργανοληπτικών δοκιμών σύμφωνα με το ISO 8589:2007

10.4 Βασικές μέθοδοι στην Οργανοληπτική Αξιολόγηση Τροφίμων

Η αξιολόγηση των διαφόρων χαρακτηριστικών των τροφίμων που θα το κάνουν αποδεκτό ή όχι από τους καταναλωτές συνδυάζει τόσο την αξιολόγησή του με τις αντικειμενικές μεθόδους και τεχνικές ανάλυσης όσο και την οργανοληπτική τους αξιολόγηση. Η επιλογή ενός συγκεκριμένου τροφίμου έναντι κάποιων άλλων παρόμοιων στηρίζεται κατά πολύ στην προσωπική εκτίμηση του καταναλωτή η οποία προκύπτει από τις γευστικές και άλλες προτιμήσεις του. Αυτές με τη σειρά τους πηγάζουν από τις εμπειρίες του (γευστικές και άλλες), την εκπαίδευσή του στα θέματα της γεύσης, στη δεκτικότητα του και στη γνώση του σχετικά με το τρόφιμο που αξιολογούν. Τις περισσότερες φορές όμως η σχετική προτίμηση των καταναλωτών στηρίζεται σε κριτήρια που ούτε οι ίδιοι ξεκάθαρα αντιλαμβάνονται από πού προέρχονται και απλά

τους 'αρέσει' ή 'δεν τους αρέσει' χωρίς να μπορούν πάντα να εξηγήσουν το λόγο (**Rico et al. 2007**).

Οι παραγωγοί τροφίμων προσπαθούν να προσφέρουν ότι καλύτερο μπορούν προκειμένου να ικανοποιήσουν οργανοληπτικά όσο πιο ευρύ κοινό και να εξασφαλίσουν την εμπορική επιτυχία των προϊόντων τους. Η οργανοληπτική αξιολόγηση που εφαρμόζουν πρέπει όμως να δίνει και αποτελέσματα με σημασία ώστε να μπορούν να καταλάβουν την αιτία της επιτυχίας ή αποτυχίας έτσι ώστε να τα χρησιμοποιήσουν με σκοπό τη βελτίωση ή την ανάπτυξη προϊόντων με συγκεκριμένα αποδεκτά χαρακτηριστικά. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν για να προσεγγίσουν όσο το δυνατόν περισσότερο και καλύτερα τα αποδεκτά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά έχουν εξελιχθεί πάρα πολύ τα τελευταία χρόνια. Πλέον χρησιμοποιούν τεχνικές από τις νευροεπιστήμες προκειμένου να αντιληφθούν την προέλευση των προτιμήσεων αλλά και να τις μοντελοποιήσουν αν είναι δυνατόν ώστε να χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη των προϊόντων. Πολύ σημαντικό ρόλο σε αυτά παίζει η επιλογή των αξιολογητών, το μέγεθος του δείγματος των αξιολογητών και φυσικά η χρήση των κατάλληλων μαθηματικών εργαλείων για τη σωστή επεξεργασία και εξαγωγή συμπερασμάτων (**Verhagen and Engelen 2006**).

Στο σημείο αυτό περιγράφονται οι βασικότερες τεχνικές οργανοληπτικής αξιολόγησης που χρησιμοποιούνται και σε τι αποσκοπεί η καθεμία τους, αναλόγως του επιδιωκόμενου αποτελέσματος.

10.4.1 Αξιολογητές – Δοκιμαστές.

Οι δοκιμαστές σε ένα οργανοληπτικό τεστ αποτελούν πρακτικά το «όργανο μέτρησης» και αυτός είναι ο λόγος που η επιλογή τους είναι σημαντική. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες εκτιμητών: Απλός (Naive): είναι ο δοκιμαστής που δεν έχει κανένα ιδιαίτερο κριτήριο, καμία εκπαίδευση.

- Μυημένος (Initiated): είναι ο δοκιμαστής που έχει ήδη λάβει μέρος σε οργανοληπτικές δοκιμές.

- Επιλεγμένος (Selected): είναι ο δοκιμαστής που έχει την ικανότητα να εκτελεί ένα εύρος οργανοληπτικών δοκιμών.
- Ειδικός (Expert): είναι ο δοκιμαστής που έχει την εμπειρία και τη γνώση να γνωμοδοτεί στα πεδία για τα οποία ζητείται η γνώμη του.
- Ομάδα Οργανοληπτικού Ελέγχου (sensory panel): πρόκειται για μία ομάδα οργανοληπτικού ελέγχου αποτελούμενη από δοκιμαστές που συμμετέχουν σε κοινές οργανοληπτικές δοκιμές (**ISO 5492: 2008**).

10.4.2 Κλασικές Μέθοδοι Οργανοληπτικού Ελέγχου

Όπως έχει προαναφερθεί κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο χρησιμοποιούνται ως εργαλεία αξιολόγησης διάφορα τεστ. Υπάρχουν κάποιες βασικές κατηγορίες τεστ και οι υποκατηγορίες τους οι οποίες ορίζονται από τον ISO (International Organization for Standardization). Η επιλογή του κατάλληλου τεστ εξαρτάται κατά πολύ από τη φύση του στόχου του, αλλά και από το υπό εξέταση προϊόν, τους δοκιμαστές, το περιβάλλον και το επιθυμητό επίπεδο της απαιτούμενης ακρίβειας.

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα τεστ χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

1. Τεστ διαφοροποίησης.
2. Τεστ με χρήση διαβαθμίσεων και κατηγοριών.
3. Περιγραφικά τεστ.

Τα τεστ διαφοροποίησης (Discrimination test) χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό ομοιοτήτων και διαφορών ανάμεσα στα δείγματα. Μπορούν να πραγματοποιηθούν με διάφορους τρόπους:

- Σύγκριση κατά ζεύγη (paired comparison): Σε αυτή τη περίπτωση γίνεται σύγκριση μεταξύ δύο δειγμάτων ως προς συγκεκριμένα χαρακτηριστικά με καθορισμένα κριτήρια. Η σύγκριση κατά ζεύγη χρησιμοποιείται για τον καθορισμό διαφορών ως προς ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό (π.χ.

γλυκύτητα), για την επιλογή και επίβλεψη των δοκιμαστών και για τη σύγκριση δύο προϊόντων ως προς την προτίμηση στα πλαίσια δοκιμών για καταναλωτές. Όσον αφορά τη διαδικασία οι δοκιμαστές λαμβάνουν ένα σετ δύο δειγμάτων και καλούνται να επιλέξουν το δείγμα που φέρει πιο έντονα το υπό εξέταση χαρακτηριστικό. Ένα από τα δείγματα μπορεί να είναι πρότυπο. Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η απλότητα εφαρμογής της ενώ δεν συνίσταται σε περιπτώσεις που απαιτούνται πολλές επαναλήψεις (**ISO 11036:1994**).

- **Τριγωνική δοκιμή** (triangle test): Στη δοκιμή αυτή δίνονται τρία άγνωστα δείγματα, τα δύο είναι όμοια και οι δοκιμαστές καλούνται να βρουν το τρίτο, το διαφορετικό. Τα δείγματα προσφέρονται για δοκιμή κατά τυχαία σειρά. Είναι μία διαδικασία που χρησιμοποιείται για να καθοριστεί αν είναι αισθητή μία οργανοληπτική διαφορά ή ομοιότητα μεταξύ δύο προϊόντων και έχει την μορφή της αναγκαστικής επιλογής. Δύο από τα προϊόντα είναι απολύτως όμοια και οι δοκιμαστές καλούνται να αναγνωρίσουν ποιο είναι αυτό που διαφέρει. Χρησιμοποιείται κυρίως όταν η φύση της διαφοράς είναι άγνωστη, καθώς και για την εκπαίδευση και επιλογή των δοκιμαστών. Υστερεί ως προς το κόστος και την αυξημένη κόπωση που μπορεί να παρουσιάσουν οι δοκιμαστές εξαιτίας των πολλών δειγμάτων (**ISO 4120:2004**).
- **DUO/TRIO δοκιμή**. Δίνονται τρία δείγματα εκ των οποίων το ένα είναι γνωστό και χρησιμεύει ως βάση σύγκρισης και τα άλλα δύο άγνωστα, ο δοκιμαστής καλείται να προσδιορίσει πιο δείγμα είναι διαφορετικό από το πρότυπο. Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται για να καθοριστεί εάν υπάρχει κάποια διαφορά ή ομοιότητα μεταξύ του πρότυπου δείγματος και των άλλων. Είναι κατάλληλο όταν οι δοκιμαστές είναι εξοικειωμένοι με το πρότυπο δείγμα, όπως π.χ. εμπορικά δείγματα. Είναι ακατάλληλο για δείγματα που αφήνουν ισχυρή επίγευση.
- **Δοκιμή δύο από τα πέντε**. Σε αυτό το τεστ διαφοροποίησης δίνονται πέντε κωδικοποιημένα δείγματα. Τα δύο είναι ενός τύπου και τα άλλα τρία ενός άλλου και απαιτείται ομαδοποίησή τους σε δύο κατηγορίες. Στατιστικά αυτή η μέθοδος είναι πιο αποτελεσματική και πιο οικονομική. Το μειονέκτημα αυτού του τεστ

είναι η οργανοληπτική κόπωση. Χρησιμοποιείται κυρίως για αξιολόγηση της όρασης.

- **A – όχι A (A - not A) τεστ:** Αρχικά γίνεται εκπαίδευση των δοκιμαστών για την αναγνώριση του δείγματος A. Στη συνέχεια δίνεται μία σειρά δειγμάτων και οι δοκιμαστές καλούνται να πουν ποια από αυτά είναι A και ποια όχι. Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται για δείγματα με διαφορές στην εμφάνιση ή με ισχυρή επίγευση.

Η χρήση διαβαθμίσεων και κατηγοριών (Scales and categories) γίνεται για τον καθορισμό κατηγοριών, τάξεων και βαθμίδων όπου τα δείγματα μπορούν να τοποθετηθούν. Πιο συγκεκριμένα, αν για παράδειγμα υπάρχει δείγμα ψαριών

- Γίνεται κατηγοριοποίηση δείγματος στην πιο οικεία κατηγορία (classification) δηλαδή το είδος του ψαριού.

- Τακτοποίηση σε βαθμίδες (grading) π.χ. ανάλογα το πόσο φρέσκα είναι.

- Σειρά βάση έντασης ή βαθμού χαρακτηριστικού (ranking) π.χ. άρωμα, σε σειρά τα δείγματα βάσει της έντασης του αρώματος.

- Τοποθέτηση δειγμάτων σε μια γνωστή κλίμακα (rating & scoring) δίνεται κλίμακα και πρότυπα δείγματα ώστε να γνωρίζει ο δοκιμαστής που ανταποκρίνεται η κάθε διαβάθμιση και στη συνέχεια τοποθετεί το δείγμα του.

Τα περιγραφικά τεστ (Descriptive test) χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό, ποιοτικό και ποσοτικό, ενός ή περισσότερων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως:

- ***Απλό περιγραφικό***, δίνει ποιοτικά χαρακτηριστικά ενός προϊόντος.
- ***Ποσοτική περιγραφή*** και καθορισμός οργανοληπτικού προφίλ με χρήση λεξιλογίου που έχει οριστεί με χρήση απλού περιγραφικού τεστ.

- **Ελεύθερη επιλογή προφίλ**, χρησιμοποιείται από άπειρους δοκιμαστές για να αξιολογήσουν και να περιγράψουν προϊόντα με δική τους ορολογία.

Επειδή όμως όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η οργανοληπτική αξιολόγηση ενός προϊόντος είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που δεν περιορίζεται μόνο στην αντίληψη των χαρακτηριστικών ξεχωριστά το ένα από το άλλο, αλλά αλληλεπιδρούν με κάποιο τρόπο μεταξύ τους έχουν αναπτυχθεί τεχνικές οι οποίες αξιολογούν αυτές τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αισθήσεων και προσπαθούν να τις ποσοτικοποιήσουν ώστε να βγάλουν ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα (**ISO 11036:1994**).

10.5 Αξία οργανοληπτικού ελέγχου

Οι σημερινοί καταναλωτές είναι οξυδερκείς, απαιτητικοί και περισσότερο ενημερωμένοι σχετικά με τα τρόφιμα, επομένως, απαιτούν προϊόντα τα οποία να είναι όχι μόνο ασφαλή αλλά και υψηλής οργανοληπτικής αξίας. Ο οργανοληπτικός έλεγχος αποτελεί εργαλείο για την προσομοίωση της συμπεριφοράς των καταναλωτών, λειτουργεί ως δείκτης ασφάλειας και αποτελεί βάση για τη βελτίωση των ήδη υπαρχόντων προϊόντων αλλά και για την παραγωγή νέων.

11. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας είναι να αποδειχθεί πως το όζον φέρει αποτέλεσμα ως τεχνική απολύμανσης των λαχανικών (μαρούλι και μπρόκολο) μειώνοντας το μικροβιακό φορτίο που έχει αναπτυχθεί ή έχει προσκολληθεί επάνω τους. Παράλληλα στοχεύει στο να αναδείξει κατά πόσο ασφαλή είναι τα συγκεκριμένα λαχανικά που αγοράζουν οι καταναλωτές προτείνοντας απλούς και οικονομικούς τρόπους (χλώριο, όζον) για να την βελτίωση τους. Εκτός από τη μικροβιακή μείωση στα λαχανικά βασικός στόχος είναι και η παρατήρηση των αλλαγών στα ποιοτικά χαρακτηριστικά όπως το χρώμα, η φωτεινότητα, η τρυφερότητα, η παραμένουσα γεύση, η συνολική εντύπωση μέσω του οργανοληπτικού ελέγχου, αλλά και τι συμβαίνει κατά την διάρκεια συντήρησής τους αφού έχουν πλυθεί με νερό, χλωριωμένο και οζονοποιημένο νερό.

12. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

12.1 ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οργανικά χημικά αντιδραστήρια, θρεπτικά συστατικά ως μέσον καλλιέργειας, αλλά και σύνθετα υλικά υποστρωμάτων (culture media).

12.1.1 Θρεπτικά υποστρώματα

Στην ακολουθούμενη πειραματική διαδικασία εμπλέκονται τα παρακάτω θρεπτικά υποστρώματα και σύνθετα υλικά:

- ALOA εξειδικευμένο θρεπτικό υπόστρωμα Agar Listeria Ottaviani.
- VRBGA εξειδικευμένο θρεπτικό υπόστρωμα Violet Red Glucose Agar περιέχει την ουσία crystal violet.
- XLD είναι μετρίως εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα
- MacConkey είναι ένα μέσο που διαφοροποιεί την ζύμωση της λακτόζης.
- Kligler είναι ένα μέσο καλλιέργειας διαφοροποίησης της λακτόζης και της γλυκόζης, παράγωγης αερίου, παράγωγης H₂S.
- Tryptone Water είναι ένα μέσο πεπτόνης καζεΐνη (= τρυπτόνη) που περιέχει υψηλή αναλογία τρυπτοφάνης το οποίο αποικοδομείται από ινδολο-θετικούς οργανισμούς προς σχηματισμό ινδούς.
- Η ινδόλη μπορεί να ανιχνευθεί με το αντιδραστήριο KOVACS.

12.1.2 Οργανικά χημικά

- Οξειδάση
- Αντιδραστήριο KOVACS

12.2 ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας έγινε χρήση ενός ή περισσότερων από τα όργανα ή και σκεύη που περιγράφονται παρακάτω.

12.2.1 Σκεύη

1. Γυάλινες κωνικές φιάλες των 1.000ml.
2. Οογκομετρικός κύλινδρος των 1000ml.
3. Αποστειρωμένα τρυβλία.
4. Γλωσσοπίεστρες
5. Δοκιμαστικοί σωλήνες
6. Μαγνητικοί αναδευτήρες
7. Λύχνος Bunsen
8. Πλαστικοί περιέκτες Falcon (χωρητικότητας 15ml)
9. Πιπέτες μιας χρήσης των 10ml .
10. Πιπέτες μιας χρήσης των 1ml .
11. Στατό δοκιμαστικών σωλήνων
12. Σακούλες ομογενοποίησης του δείγματος με φίλτρο.
13. Μικροβιολογικοί κρίκοι μικρού και μεσαίου μεγέθους μιας χρήσης.

12.2.2 Όργανα και συσκευές

Για την εκτέλεση του πειράματος έγινε χρήση των οργάνων και συσκευών που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4. Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν

No	Όργανο-συσκευή	Μοντέλο	Εταιρεία
1	Ομογενοποιητής τύπου stomacher.	Bagmixer 200	Interscience
2	Αναλυτικός ζυγός		Shimadzu
3	Υδατόλουτρο	WBT 22	Medingen
4	Καταψύκτης	Form-86 ULT Freezer	Thermo Electron Corporation
5	Μετρητής αποικιών	Digital S	P Selecta
6	Επωαστικός κλίβανος	Incubig	P Selecta
7	Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας	ADE	Velp Scientifica
8	Φλόγα Εργασίας	IBS	Integra Biosciences
9	Οζονοποιητής		

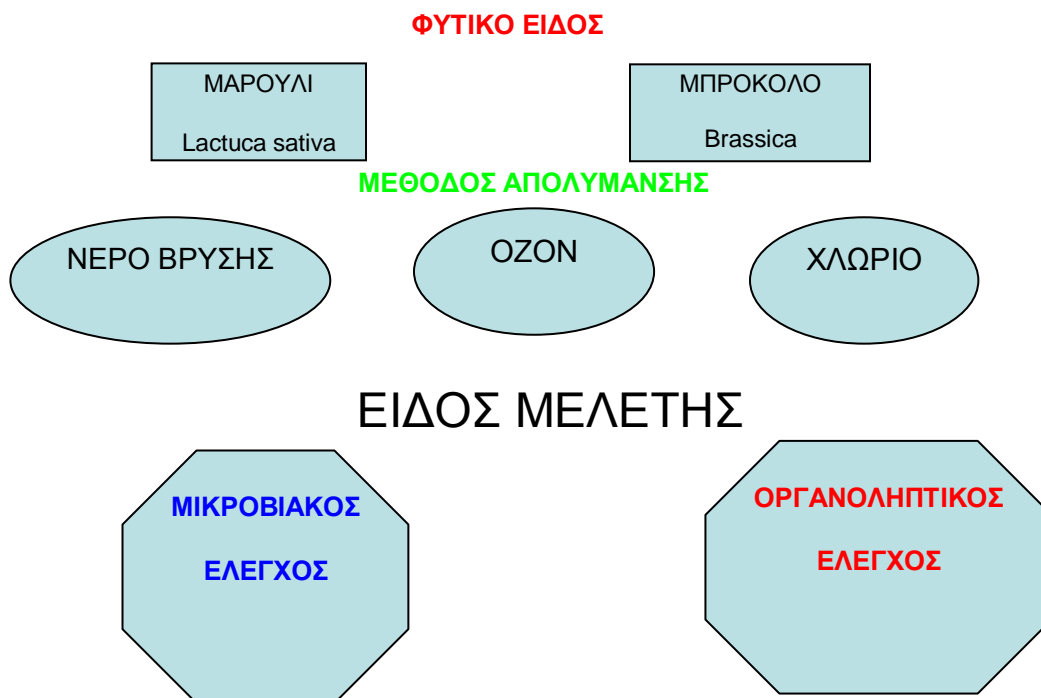
12.3 Μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν και μέθοδοι καταμέτρησης τους

Για το πειραματικό μέρος αυτής της μελέτης θα γίνει καταμέτρηση της *E. coli*, *L.monocytogenes*, *Salmonella Spp.* καθώς και των *Enterobacteriaceae* που πιθανώς θα ανιχνευτούν στα δείγματα που θα εξετάσουμε. Οι μέθοδοι καταμέτρησης είναι οι εξής :

- ❖ **Μέθοδος καταμέτρησης E. coli Health Protection Agency (HPA)**
- ❖ **Μέθοδος καταμέτρησης Listeria monocytogenes ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004**
- ❖ **Μέθοδος καταμέτρησης Salmonella spp. ΕΛΟΤ EN ISO 6579:2003 / TC1:2004**
- ❖ **Μέθοδος καταμέτρησης Enterobacteriaceae Statutory Instrument SI 2383,1989 και BS 4285:3.7.**

12.3.1 Σχεδιασμός του πειράματος

ΣΧΕΔΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ



Το πείραμα περιελάμβανε την εξέταση σαράντα οχτώ (48) δειγμάτων, που προέκυψαν από το συνδυασμό των 2 φυτικών ειδών (λαχανικών), τα οποία απολυμάνθηκαν με 3 τρόπους και αναλύθηκαν ως προς το μικροβιολογικό φορτίο μετά την απολύμανση και την οργανοληπτική τους κατάσταση από τους καταναλωτές.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν πιο αναλυτικά :

- Δώδεκα (12) δείγματα μαρουλιού από 3 σημεία δειγματοληψίας (1 λαϊκή και 2 σούπερ μάρκετ). Το κάθε δείγμα θα εξετάζεται σε 4 διαφορετικές μεταχειρίσεις. Μετά από δεκαπέντε ημέρες ακριβώς γίνεται επανάληψη από τα ίδια σημεία δειγματοληψίας. Για τον μικροβιολογικό έλεγχο, η ανάλυση έγινε κατά παρτίδα (5 μαρούλια) από το κάθε σημείο αγοράς και για τον οργανοληπτικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν τρία μαρούλια από το

κάθε σημείο αγοράς. Συνολικά αγοράστηκαν και αναλύθηκαν 48 μαρούλια. Η καλλιέργεια του μαρουλιού της λαϊκής αγοράς (δείγματα 1 και 4) έγινε στην περιοχή της Γιάννουλης (χωριό κοντά στην Λάρισα), του πρώτου σούπερ μάρκετ καλλιεργήθηκε στην περιοχή του Νομού Ημαθίας (δείγμα 2) και στη Θεσσαλονίκη (δείγμα 5) και του δευτέρου σούπερ μάρκετ στην περιοχή της Φαλάνης (επίσης χωριό κοντά στην Λάρισα, δείγματα 3 και 6).

- Δώδεκα (12) δείγματα μπρόκολου από 3 σημεία δειγματοληψίας (λαϊκή και 2 σούπερ μάρκετ). Το κάθε δείγμα θα εξετάζεται σε 4 διαφορετικές μεταχειρίσεις. Μετά από δεκαπέντε ημέρες ακριβώς γίνεται επανάληψη από τα ίδια σημεία δειγματοληψίας. Για τον μικροβιολογικό έλεγχο η ανάλυση έγινε κατά παρτίδα (5 μπρόκολα) από το κάθε σημείο αγοράς και για τον οργανοληπτικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν τρία μπρόκολα από το κάθε σημείο αγοράς. Συνολικά αγοράστηκαν και αναλύθηκαν 48 μπρόκολα. Η καλλιέργεια του μπρόκολου της λαϊκής αγοράς (δείγματα 1 και 4) έγινε στην περιοχή της Γιάννουλης (χωριό κοντά στην Λάρισα), του πρώτου σούπερ μάρκετ καλλιεργήθηκε στην περιοχή του Νομού Ημαθίας (δείγμα 2) και στην περιοχή του Νομού Πέλλας (δείγμα 5) και του δευτέρου σούπερ μάρκετ στον Νομό Λακωνίας (δείγμα 3 και 6).

12.3.2 Μεταχειρίσεις

- **1. Control** (εξετάζουμε το δείγμα χωρίς καμία επεξεργασία)
- **2. H₂O** (εξετάζουμε το δείγμα εφόσον έχει πλυθεί καλά τρεις φορές με πόσιμο νερό βρύσης όπως γίνεται και στα νοικοκυριά).
- **3. Χλώριο** (εξετάζουμε το δείγμα εφόσον έχει πλυθεί με χλωριωμένο νερό). Μετά πλένεται μια φορά με H₂O.
- **4. Οξον** (εξετάζουμε το δείγμα εφόσον έχει πλυθεί με οξονοποιημένο νερό).

12.3.3 Χλώριο

Για να γίνει το ξέπλυμα με χλωριωμένο νερό σε κάθε δείγμα χρειάστηκαν 2 σταγόνες υποχλωριώδες Na περιεκτικότητας 5% σε 1 λίτρο νερού. Το μείγμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά. Έπειτα έγινε εμβάπτιση του λαχανικού για 3 λεπτά στο μείγμα και εν συνεχεία ξέπλυμα μια φορά με πόσιμο νερό βρύσης. Ο απαιτούμενος χρόνος δράσης του χλωρίου

είναι από 30sec – 30min ανάλογα με την ποσότητά του. Εικόνα 5: Ανάδευση χλωρίου



12.3.4 Όζον

Η οζονοποίηση έγινε σε οικιακή συσκευή Ν cc 5 και το λαχανικό εμβάπτιστηκε σε 1 λίτρο οζονοποιημένου νερού για 10 λεπτά.



Εικόνα 6: Οζονοποίηση

12.3.5 Ομογενοποίηση των δειγμάτων

(Κοινός τρόπος για το μαρούλι και το μπρόκολο)

- Ποσότητα 10gr για κάθε δείγμα, από διάφορα μέρη του λαχανικού μεταφέρονται υπό ασηπτικές συνθήκες εντός πλαστικού περιέκτη stomacher.
- Στη συνέχεια μεταφέρονται 90ml αποστειρωμένου διαλύματος BPW (Buffer Peptone Water).
- Η σακούλα τοποθετείται στην συσκευή stomacher.
- Η ποσότητα του δείγματος υφίσταται ομογενοποίηση για συνολικό χρόνο 30sec σε χαμηλή ταχύτητα.

12.3.5.1 Διαδοχικές Αραιώσεις.

Οι διαδοχικές αραιώσεις είναι απαραίτητες για την περίπτωση που ένα τρόφιμο έχει υψηλό μικροβιακό φορτίο. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η ποσοτική ανάκτηση των μικροοργανισμών δεδομένου ότι σε κάθε τρυβλίο μπορούν να μετρηθούν μέχρι 100 – 150 αποικίες.

Σε 4 δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέτονται 9ml ισοτονικού διαλύματος MRD και επισημαίνουμε τους συντελεστές αραιώσης.

- Μεταφέρουμε ασηπτικά 1ml από το ομογενοποιημένο δείγμα (αραίωση -1) στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα (αραίωση -2)
- Αναδεύουμε με περιστροφικό αναδευτήρα προκειμένου να επιτύχουμε επαρκή διασπορά.
- Με τον ίδιο τρόπο συνεχίζουμε και με τους υπόλοιπους δοκιμαστικούς σωλήνες.

Στο μαρούλι έγιναν αραιώσεις μέχρι την 10^{-5} για όλα τα δείγματα και όλες τις μεταχειρίσεις στα εντεροβακτηριακά εκτός από το δείγμα 5A που έγιναν μέχρι την 10^{-6} .

Για το *E. coli*, οι αραιώσεις έφτασαν ως την 10^{-3} , ενώ για την *Salmonella spp.* και στην *L. monocytogene* ως τη 10^{-2} για όλα τα δείγματα και τις μεταχειρίσεις.

Στο μπρόκολο έγιναν αραιώσεις μέχρι την 10^{-5} για όλα τα δείγματα και όλες τις μεταχειρίσεις στα εντεροβακτηριακά. Για το *E. coli*, οι αραιώσεις έφτασαν ως την 10^{-3} , ενώ για τη *Salmonella spp.* και τη *L. monocytogenes* ως την 10^{-2} για όλα τα δείγματα και τις μεταχειρίσεις.

12.3.5.2 Ενοφθαλμισμός θρεπτικών υποστρωμάτων για *E. coli*, *L. monocytogenes* και *Salmonella Spp.*



Ο ενοφθαλμισμός του βακτηριακού εναιωρήματος έγινε με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης (spread plate technique).

Στην τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης γίνεται διασπορά μικρού γνωστού όγκου από το αραιωμένο δείγμα στην επιφάνεια του στερεοποιημένου θρεπτικού υποστρώματος σε τρυβλίο. Με ομοιόμορφη διασπορά του αιωρήματος στην επιφάνεια του στέρεου υποστρώματος, και έπειτα από επώαση σε κατάλληλες συνθήκες σχηματίζονται ευδιάκριτες αποικίες οι οποίες μπορούν να μετρηθούν.

Εικόνα 7 Επιφανειακή επίστρωση σε τρυβλίο με Aloa

- ☑ Η βάση των τρυβλίων επισημαίνεται με τους συντελεστές αραιώσεως τους οποίους θα ενοφθαλμιστεί το θρεπτικό υπόστρωμα.
- ☑ Τοποθετούμε, στο κέντρο του τρυβλίου με το στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό 1 mL βακτηριακού εναιωρήματος από τους δοκιμαστικούς σωλήνες με την αντίστοιχη αναγραφόμενη αραιώση.

- ☑ Με τη μικροβιολογική κεκκαμένη ράβδο εξαπλώνεται το βακτηριακό εναιώρημα σε όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού με κυκλικές κινήσεις.
- ☑ Τα τρυβλία αναποδογυρίζονται και τοποθετούνται προς επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία.

Στην *E. coli* χρησιμοποιήσαμε θρεπτικό υπόστρωμα MacConkey.

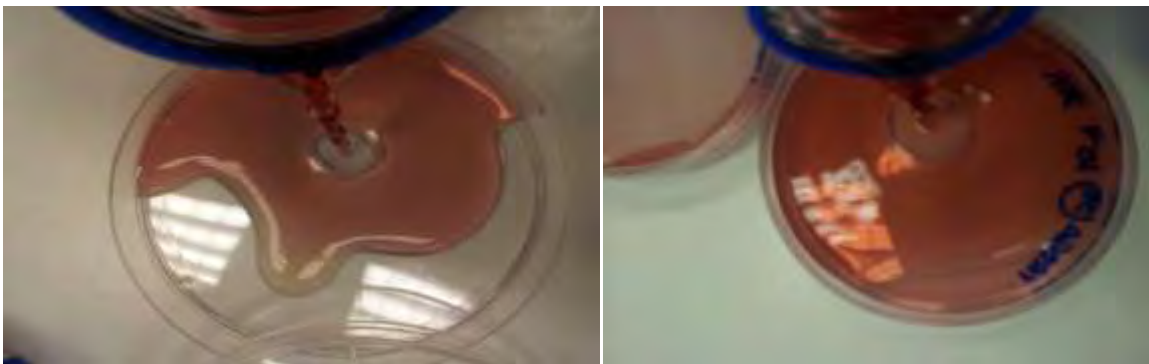
Στην *Listeria monocytogenes* χρησιμοποιήσαμε θρεπτικό υπόστρωμα A10a

Στην *Salmonella spp.* χρησιμοποιήσαμε θρεπτικό υπόστρωμα XLD.

12.3.5.3 Ενοφθαλισμός θρεπτικών υποστρωμάτων για Enterobacteriaceae.

Ο ενοφθαλισμός του βακτηριακού εναιωρήματος θα γίνει με την τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plate technique). Στην τεχνική της ενσωμάτωσης, οι μικροοργανισμοί διασπείρονται ομοιόμορφα στην μάζα ρευστού θρεπτικού υποστρώματος το οποίο αφήνεται στην συνέχεια να στερεοποιηθεί. Η τεχνική της ενσωμάτωσης προτιμάται σε περιπτώσεις προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών.

Στα Enterobacteriaceae χρησιμοποιήσαμε θρεπτικό υπόστρωμα VRBGA.



Εικόνα 8: Τεχνική ενσωμάτωσης VRBGA

12.3.5.4 Επώαση θρεπτικών υποστρωμάτων

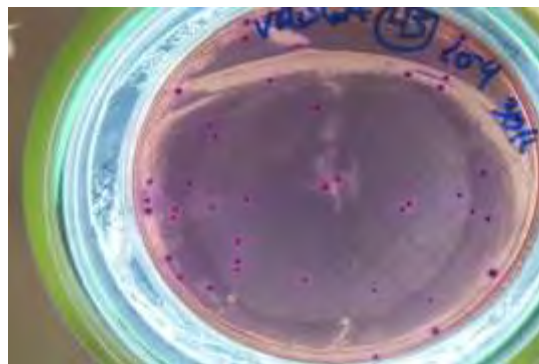
Οι συνθήκες επώασης πρέπει να εξασφαλίζουν τη βέλτιστη μικροβιακή αύξηση. Εκτός από τη χρήση του καταλλήλου μέσου αύξησης και τη κατάλληλη ατμόσφαιρα, οι υπόλοιπες απαιτούμενες συνθήκες είναι η θερμοκρασία και ο χρόνος επώασης.

Πίνακας 5. Θρεπτικών υποστρωμάτων ,θερμοκρασίας και χρόνου επώασης.

Θρεπτικό μέσο Ανάπτυξης	Μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται	Τεχνική ενοφθαλμισμού	Θερμοκρασία επώασης (°C)	Χρόνος επώασης
ALOA	<i>L. monocytogenes</i>	Spread plate	37±2	48h
VRBGA	<i>Enterobacteriaceae</i>	Pour plate	37±2	24h
TSA	Διάφοροι μικροοργανισμοί	Spread plate	37±2	24h
MacConkey	<i>E. coli</i>	Spread plate	37±2	24h
XLD	<i>Salmonella Spp.</i>	Spread plate	37±2	24h

12.3.5.5 Αρίθμηση αποικιών

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος προσδιορισμού του μικροβιακού φορτίου ενός προϊόντος αποτελεί η αρίθμηση των αποικιών (colony count) που σχηματίζονται σε ενοφθαλμισμένο στερεό θρεπτικό υλικό. Στηρίζεται στη θεωρία ότι ένα βακτηριακό κύτταρο ή μια ομάδα κυττάρων δημιουργούν μια αποικία. Εικόνα 9: αρίθμηση αποικιών



Έτσι ο αριθμός των αποικιών που αναπτύσσονται σε ένα ήδη ενοφθαλμισμένο θρεπτικό υλικό αντιπροσωπεύει τον πραγματικό μικροβιακό πληθυσμό. Η μέτρηση των αποικιών ανά τρυβλίο γίνεται με γυμνό μάτι και με τη χρήση εργαστηριακού οργάνου μέτρησης αποικιών.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε cfu/gr (cfu: colony forming units) μετά την επεξεργασία τους μέσω αριθμητικών τύπων.

12.3.5.6 Καλλιέργεια σε TSA άγαρ

Η θρεπτική σύνθεση του Άγαρ Σόγιας Trypticase (TSA) το έχει καταστήσει ένα δημοφιλές υλικό, τόσο στη μη συμπληρωμένη του μορφή όσο και ως βάση για υλικά που περιέχουν αίμα. Ο συνδυασμός πεπτονών καζεΐνης και σόγιας στη βάση του Άγαρ Σόγιας Trypticase (TSA II) καθιστούν το υλικό ιδιαίτερα θρεπτικό λόγω της παροχής οργανικού αζώτου και ιδιαίτερα αμινοξέων και πεπτιδίων μακρύτερης αλυσίδας. Το χλωριούχο νάτριο διατηρεί την οσμωτική ισορροπία.



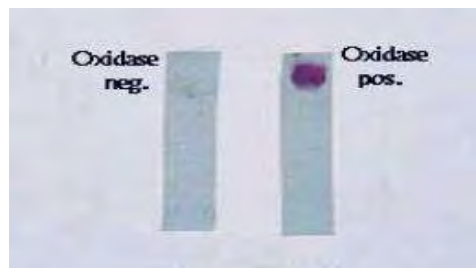
Εικόνα 10:καλλιέργεια σε TSA άγαρ

Οι παράγοντες ανάπτυξης που περιέχει βελτιώνουν τις αιμολυτικές αντιδράσεις. Το απινωδογονωμένο αίμα προβάτου είναι το πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενο αίμα για εμπλουτισμό των υλικών καλλιέργειας με βάση το άγαρ.

- Με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου παίρνουμε μια αποικία από το τρυβλίο.
- Κυλώντας τον κρίκο πάνω σε μια μικρή περιοχή της επιφάνειας στο άκρο, μετά επιστρώστε από αυτή την ενοφθαλμισμένη περιοχή.
- Επωάζουμε στους 37°C για 24±2 ώρες.

12.3.5.7 Δοκιμή Οξειδάσης

Η αρχή της δοκιμής βασίζεται στην παρουσία ενός ενδοκυττάριου συστήματος οξειδάσης κυτοχρώματος, το οποίο ενεργοποιεί την οξείδωση του αναγομένου κυτοχρώματος από το μοριακό οξυγόνο. Το κυτόχρωμα χρησιμεύει ως δέκτης ηλεκτρονίων στο τελικό στάδιο του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων.



Εικόνα 11. Δοκιμή οξειδάσης

Οι μικροοργανισμοί που παράγουν το ένζυμο της οξειδάσης, το οποίο παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου, του κυτοχρώματος c και του αντιδραστηρίου οξειδάσης, οξειδώνουν το αντιδραστήριο για το σχηματισμό μιας έγχρωμης ένωσης, της ινδοφαινόλης. Η αντίδραση γίνεται αντιληπτή, συνήθως εντός 10 δευτερόλεπτων, με την παράγωγη βαθύ μώβ χρώματος (MacFaddin, J.F. 2000). Κάτω από ασηπτικές συνθήκες, παίρνεται ποσότητα κυττάρων από το επωασμένο τρυβλίο με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου.

- Κάτω από ασηπτικές συνθήκες, παίρνεται ποσότητα κυττάρων από το επωασμένο τρυβλίο με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου.
- Το δείγμα των κυττάρων εξαπλώνεται στην εμποτισμένη με οξειδάση περιοχή.
- Μετά από σχεδόν 10-30 δευτερόλεπτα, γίνεται παρατήρηση της περιοχής για τυχόν αλλαγή χρώματος.

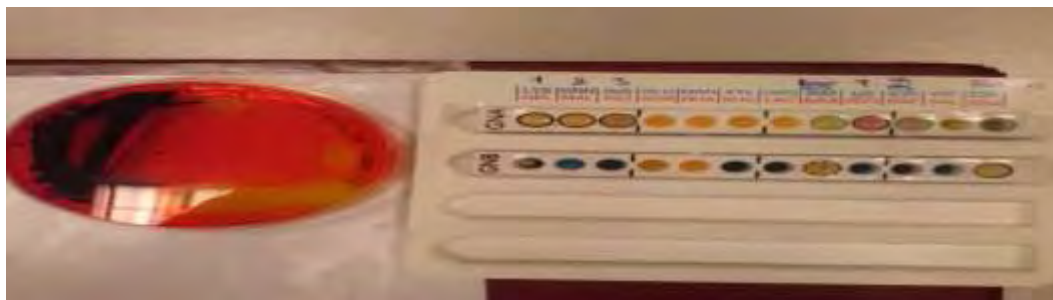
12.3.5.8. Ταυτοποίηση Σύστημα Microgen Listeria – ID και Σύστημα GN-ID A+B PANEL. για Salmonella.

Για τις ύποπτες αποικίες *L. monocytogenes* και *Salmonella* Spp. χρησιμοποιήσαμε API ταυτοποίησης Microgen Listeria – ID και GN-ID A+B PANEL αντίστοιχα. Αφού κάναμε ένα βακτηριακό εναιώρημα σε συγκριμένη ποσότητα που υποδεικνύεται από τον κατασκευαστή, το επώασαμε για 18-24h και αφού είχαν πραγματοποιηθεί οι αντιδράσεις προστέθηκαν σε κάποια σωληνάρια ορισμένα αντιδραστήρια (σύμφωνα πάντα με τον κατασκευαστή) και καταγράφηκαν τα αποτελέσματα. Οι αντιδράσεις διαβάστηκαν

σύμφωνα με τον πίνακα ανάγνωσης και η ταυτοποίηση έγινε χρησιμοποιώντας το λογισμικό ταυτοποίησης που παρέχεται από την εταιρεία.



Εικόνα 12: API LISTERIA



Εικόνα 13: API SALMONELLA

13. Διαδικασία Οργανοληπτικού ελέγχου

Μια ομάδα δέκα ατόμων αξιολόγησε τα χαρακτηριστικά των λαχανικών (χρώμα, γεύση, αλμυρότητα, τρυφερότητα κτλ.) χωρίς να γνωρίζουν την προέλευση ή την μεταχείριση τους. Τα λαχανικά ήταν ωμά χωρίς καμία προσθήκη (λάδι, αλάτι, ξύδι, λεμόνι) ώστε οι οργανολήπτες να αντιλαμβάνονται καλύτερα το κάθε χαρακτηριστικό του λαχανικού. Οι δοκιμές έγιναν στο εργαστήριο της ιατρικής Λάρισας σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο. Οι δοκιμαστές μετά από κάθε δοκιμή, έτρωγαν μια μπουκιά ψωμί και πίνανε νερό για να περάσουν στην επόμενη δοκιμή έχοντας καθαρή γεύση.

Για το μαρούλι η ομάδα αποτελούνταν από 7 (επτά) γυναίκες και 3 (τρεις) άντρες. Για το μπρόκολο η ομάδα αποτελούνταν από 10 (δέκα) γυναίκες εκ των οποίων οι 7 (επτά) ήταν οι ίδιες που συμμετείχαν και στην δοκιμή του μαρουλιού. Το μορφωτικό επίπεδο των οργανοληπτών είναι τριτοβάθμιας εκπαίδευσης και άνω. Όλοι οι δοκιμαστές είχαν μικρή εμπειρία σε οργανοληπτικό έλεγχο.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η φόρμα αξιολόγησης που συμπλήρωσαν οι δοκιμαστές. Η κλίμακα αξιολόγησης είναι από το 1 – 5.

Πίνακας 6. Φόρμα αξιολόγησης

A. ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΕΜΦΑΝΙΣΗ					
	Πολύ Έντονο	Έντονο	Μέτριο	Λίγο Έντονο	Καθόλου Έντονο
Χρώμα	5	4	3	2	1
Φωτεινότητα	5	4	3	2	1
B. ΓΕΥΣΗ					
	Πολύ Έντονο	Έντονο	Μέτριο	Λίγο Έντονο	Καθόλου Έντονο
Αλμυρότητα	1	2	3	4	5
Πικρή	1	2	3	4	5
Στυφή	1	2	3	4	5
Γλυκιά	5	4	3	2	1
Μεταλλική	1	2	3	4	5
Μουχλιασμένη	1	2	3	4	5
Όξινη	1	2	3	4	5
Παραμένουσα γεύση	1	2	3	4	5
Συνεκτικότητα	1	2	3	4	5
Προσκόλληση στα δόντια	1	2	3	4	5
Χυμώδης	5	4	3	2	1
Γ. ΟΣΜΗ					
	Πολύ Έντονο	Έντονο	Μέτριο	Λίγο Έντονο	Καθόλου Έντονο
	5	4	3	2	1
Δ. ΑΦΗ					
	Πολύ Έντονο	Έντονο	Μέτριο	Λίγο Έντονο	Καθόλου Έντονο
Τρυφερότητα	5	4	3	2	1
ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΝΤΥΠΩΣΗ					
	Πολύ καλό	Καλό	Μέτριο	Κακό	Πολύ κακό
	5	4	3	2	1

14. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αφού γίνει η καταμέτρηση των τρυβλίων καταγράφουμε τους αριθμούς και με τη χρήση μαθηματικών τύπων βγάζουμε τα αποτελέσματα.

Για τον προσδιορισμό των >15 cfu/ τρυβλίο χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$N = \frac{\Sigma a}{V} (n_1 + 0,1 + n_2) d$$

Όπου:

Σa = άθροισμα αποικιών από όλα τα τρυβλία ενός δείγματος (όλων των αραιώσεων).

V = είναι ο όγκος που ενοφθαλμίστηκε στο τρυβλίο.

n_1 = είναι ο αριθμός των τρυβλίων της 1^{ης} αραιώσης.

n_2 = είναι ο αριθμός των τρυβλίων της 2^{ης} αραιώσης.

d = ο συντελεστής αραιώσης της 1^{ης} χρησιμοποιηθείσας αραιώσης.

π.χ: τρυβλίο 1= Μη μετρήσιμο τρυβλίο 2=Μη μετρήσιμο τρυβλίο 3=29 τρυβλίο 4=
6

$$N = \frac{35}{1 \times (1 + 0,1 \times 1) \times 0,1} = \frac{35}{0,11} = 318,18182$$

Άρα N = 318,18182 cfu/gr

Για 0 cfu/τρυβλίο τότε:

$$N < 1/d \times v = \text{cfu/gr}$$

d= ο συντελεστής αραίωσης της αρχικής αραίωσης.

v= ο όγκος του ενοφθαλμισμένου δείγματος σε κάθε τρυβλίο.

π.χ: $N < 1/0,1 \times 1 = 1/0,1 = 10$

Άρα N<10 cfu/gr

Για τον προσδιορισμό <15cfu/ τρυβλίο χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$N = y/d \times v$$

y= ο αριθμητικός Μ.Ο των αποικιών που μετρήθηκαν σε όλα τα τρυβλία

d= ο συντελεστής αραίωσης της αρχικής αραίωσης.

v= ο όγκος του ενοφθαλμισθέντος δείγματος σε κάθε τρυβλίο.

π.χ: τρυβλίο 1= 12 τρυβλίο 2=0

$$N = 12/0,1 \times 1 = 12/0,1 = 120$$

Άρα N=120cfu/gr

14.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικού ελέγχου στο μαρούλι (Control, H₂O, Cl, O₃)

Πίνακας 7, συνολικά μικροβιολογικά αποτελέσματα για μαρούλι

Μαρούλι				
Αρ. Δείγματος	E. coli	L. Monocytogenes	Salmonella Spp.	Enterobacteriaceae
1Α	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	125.454,54 cfu/gr
1Β	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	31.818,188 cfu/gr
1Γ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	30.000 cfu/gr
1Δ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	26.363,6364 cfu/gr
2Α	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	117.272,727 cfu/gr
2Β	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	94.545,45 cfu/gr
2Γ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	78.181,8182 cfu/gr
2Δ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	9.090,90909 cfu/gr
3Α	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	800.000 cfu/gr
3Β	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	154.545,455 cfu/gr
3Γ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	145.454,545 cfu/gr
3Δ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	118.181,818 cfu/gr
4Α	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr
4Β	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr
4Γ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr
4Δ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr
5Α	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr
5Β	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr
5Γ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr

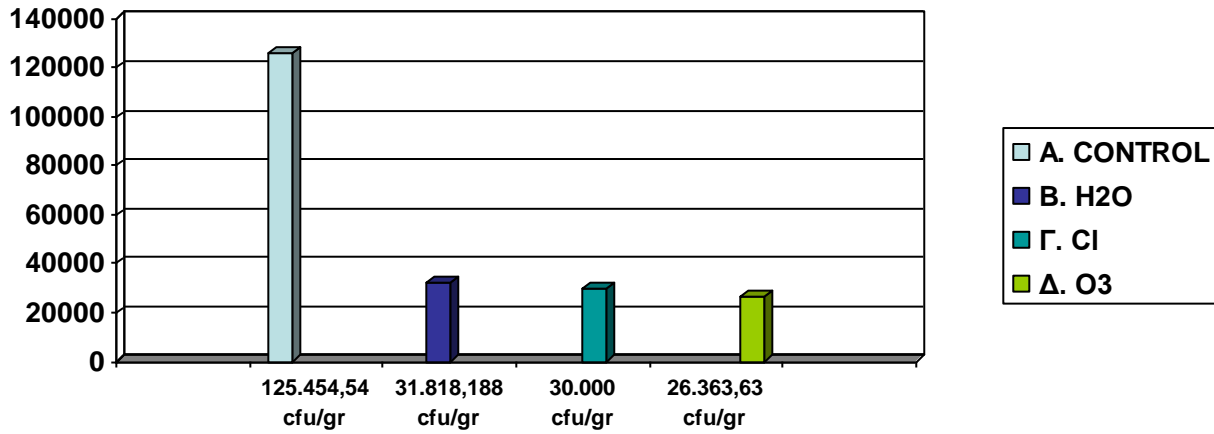
5Δ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr
6Α	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	45.454,5455 cfu/gr
6Β	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	19.727,2727 cfu/gr
6Γ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	18.181,8182 cfu/gr
6Δ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	14.545,4545 cfu/gr

Αξιολογώντας τα μικροβιολογικά αποτελέσματα παρατηρούμε πως τα λαχανικά (μαρούλι και μπρόκολο) είναι απαλλαγμένα τριών εκ των τεσσάρων μικροβίων που ελέγχθηκαν. *E. coli*, *L. monocytogenes* και *Salmonella Spp.* έχουν μηδενικό φορτίο και με τις τέσσερις μεταχειρίσεις (control, H₂O, Cl, O₃) που έγινε ο έλεγχος.

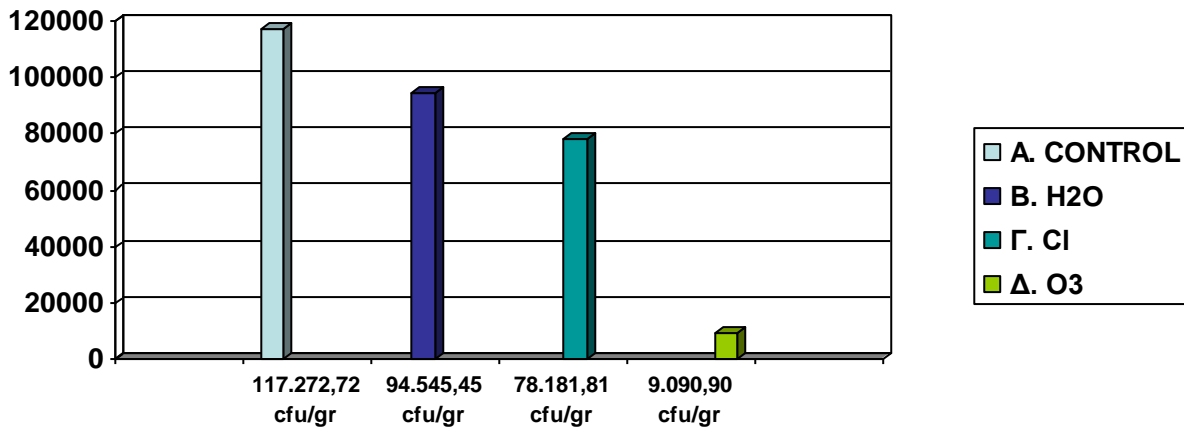
Αξίζει να σημειωθεί πως το δείγμα 5Α του μαρουλιού βρέθηκε ύποπτο για *Salmonella spp.* και *L. monocytogenes*. Τα αποτελέσματα του API για *Salmonella* δεν επαληθεύτηκαν και έδειξαν πως κατά 96,7% είναι *P. Agglomerans* (εντεροβακτηριακό). Η ύποπτη καλλιέργεια για *Listeria* μέσω του API LISTERIA επιβεβαιώθηκε ότι είναι *L. ivanovii* κατά 96,4%. Η ποσότητα της συγκεκριμένης προσβολής από *Listeria* ήταν πολύ μικρή, μόλις μια αποικία στην αρχική αραιώση (10⁻¹). Αυτό μεταφράζεται σε 10 cfu/gr. Ιδιαίτερα σημαντική παρατήρηση είναι ότι όταν το μαρούλι πλύθηκε με όποια από τις τρεις μεταχειρίσεις (H₂O, Cl, O₃), τότε το μικροβιακό φορτίο μηδενίστηκε.

Εντεροβακτηρία (Enterobacteriaceae) βρέθηκαν επίσης στα δείγματα μαρουλιού 1, 2, 3, και 6, έχοντας κλιμακωτή μείωση στις τέσσερις μεταχειρίσεις.

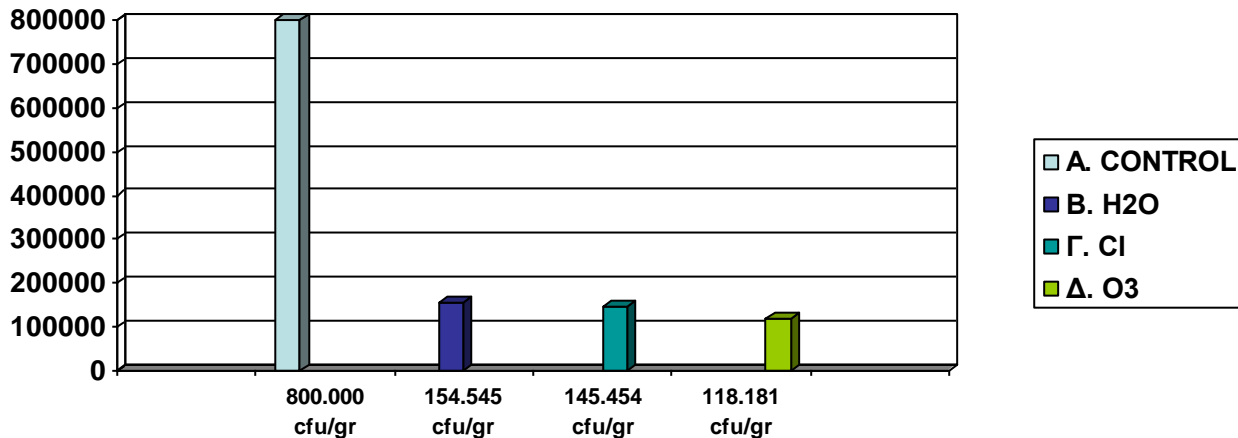
Εικόνα 14. Διάγραμμα 3, Μαρούλι 1Α, 1Β, 1Γ, 1Δ



Εικόνα 15. Διάγραμμα 4, Μαρούλι 2Α, 2Β, 2Γ, 2Δ



Εικόνα 16. Διάγραμμα 5, Μαρούλι 3Α, 3Β, 3Γ, 3Δ

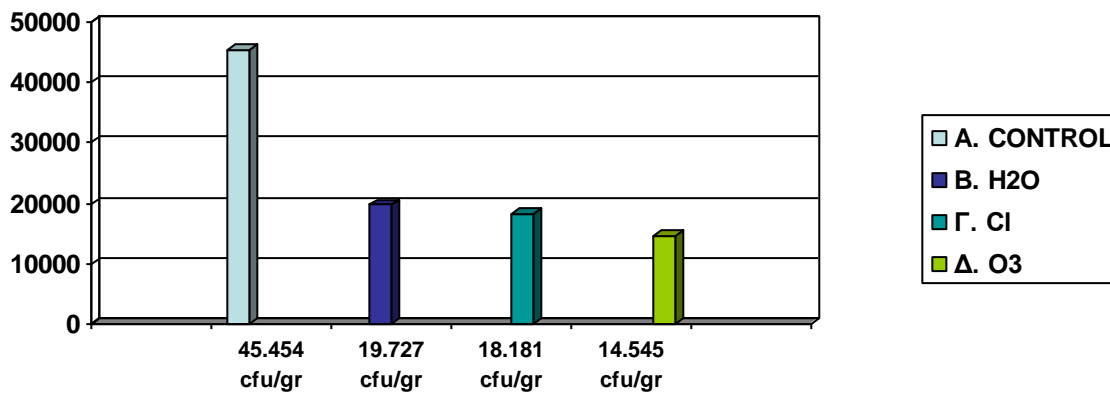


Στο 3^ο και 5^ο διάγραμμα άνωθεν (εικόνα 14 και 16), παρατηρείται σημαντική μείωση ανάμεσα στην μεταχείριση Α. και στην μεταχείριση Β. Το καλό ξέπλυμα με νερό είναι βασικός παράγοντας για τη μείωση των εντεροβακτηριακών. Το χλώριο (μεταχείριση Γ) βοήθησε στην περαιτέρω μείωση σε σχέση με το απλό ξέπλυμα και το όζον (μεταχείριση Δ) ελαχιστοποίησε τον αριθμό των εντεροβακτηριακών στο μαρούλι 1 κατά 5.455 cfu/gr , σε σχέση με το απλό ξέπλυμα και κατά 3.637 cfu/gr σε σχέση με το χλώριο. Στο 3^ο δείγμα μαρουλιού, το όζον έδειξε μείωση 36.000 cfu/gr και 27.000 cfu/gr αντίστοιχα.

Στο 4^ο διάγραμμα (μαρούλι 2), η μείωση με το η μείωση με το απλό ξέπλυμα νερού σε σχέση με τη μεταχείριση Α δεν είναι τόσο μεγάλη όσο στο 1^ο και το 3^ο μαρούλι (εικόνα 14 ,16). Η μεταχείριση Δ με το όζον είναι αυτή που έχει πάλι την μεγαλύτερη μείωση με ακόμα καλύτερα αποτελέσματα καθώς έδειξε 85.000 cfu/gr λιγότερα εντεροβακτηριακά σε σχέση με την μεταχείριση Β και 69.000 cfu/gr σε σχέση με την μεταχείριση Γ.

Μετά από δεκαπέντε ημέρες έγινε η επανάληψη της διαδικασίας από τα ίδια σημεία δειγματοληψίας (Δυο σουπερμάρκετ και λαϊκή αγορά). Αξιοσημείωτο είναι ότι παρά τον μεγάλο αριθμό εντεροβακτηριακών της πρώτης δειγματοληψίας (1^ο και 2^ο μαρούλι) στην επανάληψη τα μαρούλια 4 και 5 έφεραν μηδενικό φορτίο στο φύλλωμά τους. Στο 4^ο διάγραμμα (μαρούλι 6) υπήρχε ποσότητα εντεροβακτηριακών μικρότερη όμως σε σχέση με την πρώτη φορά (μαρούλι 3).

Εικόνα 17. Διάγραμμα 6, Μαρούλι 6A, 6B, 6Γ, 6Δ



Και σε αυτή την περίπτωση, η μεταχείριση Δ. με το όζον είναι αυτή με την μεγαλύτερη μείωση. Ο αριθμός των εντεροβακτηριακών μειώθηκε κατά 5.182 cfu/gr σε σχέση με τη μεταχείριση B και κατά 3.637 cfu/gr σε σχέση με τη μεταχείριση Γ.

14.2 Αποτελέσματα μικροβιολογικού ελέγχου στο μπρόκολο (Control, H₂O, Cl, O₃)

Πίνακας 8, συνολικά μικροβιολογικά αποτελέσματα για μπρόκολο

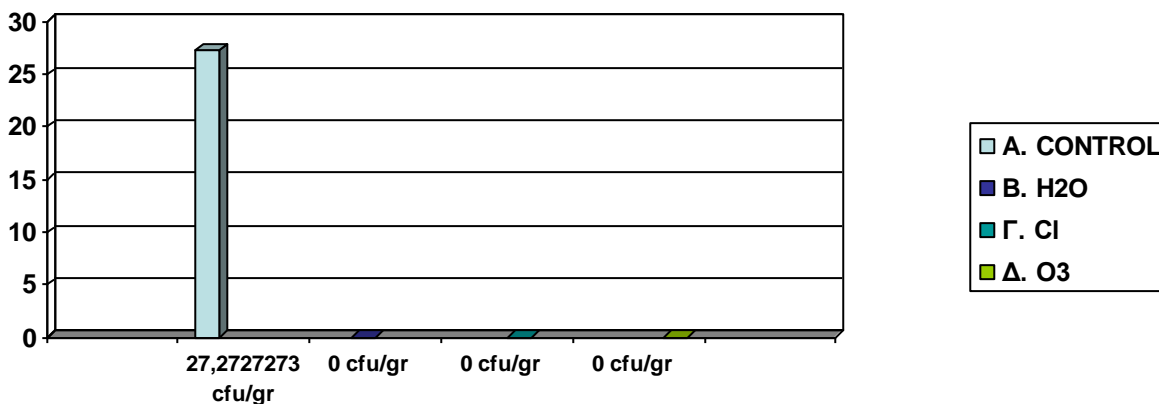
Μπρόκολο				
Αρ. Δείγματος	E. coli	L. Monocytogenes	Salmonella Spp.	Enterobacteriaceae
1A	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	27,2727273 cfu/gr
1B	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr
1Γ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr
1Δ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr
2A	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	536,363636 cfu/gr
2B	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	272,7272273 cfu/gr
2Γ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	145,454545 cfu/gr
2Δ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	100 cfu/gr
3A	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	263,636364 cfu/gr
3B	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	200 cfu/gr
3Γ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	100 cfu/gr
3Δ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	45,4545455 cfu/gr
4A	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	445,454545 cfu/gr
4B	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	200 cfu/gr
4Γ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	145,454545 cfu/gr
4Δ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	90,90909 cfu/gr
5A	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	945,454545 cfu/gr
5B	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	845,545455 cfu/gr

5Γ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	772,272773 cfu/gr
5Δ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	9,0909090909 cfu/gr
6Α	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	272,727273 cfu/gr
6Β	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	227,272727 cfu/gr
6Γ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	90,9090909 cfu/gr
6Δ	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr	<10 cfu/gr

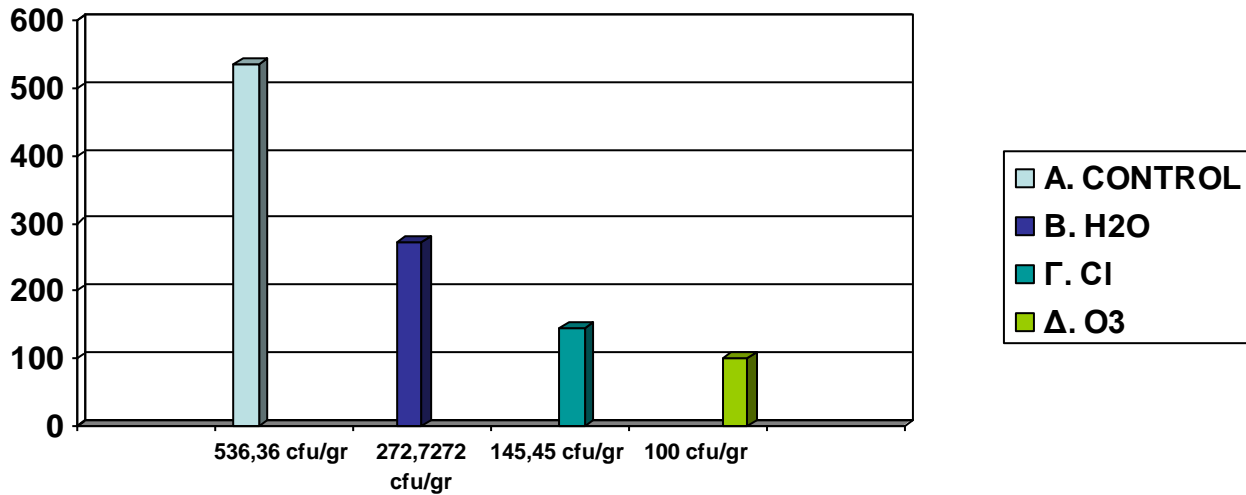
Αντίστοιχα, εντεροβακτήρια βρέθηκαν και στα έξι μπρόκολα έχοντας κλιμακωτή μείωση στις τέσσερις μεταχειρίσεις.

Στο 7^ο διάγραμμα (μπρόκολο 1, εικόνα 18), το αρχικό φορτίο ήταν τόσο μικρό που μηδενίστηκε όχι μόνο με το χλώριο και το όζον (μεταχείριση Γ. και Δ. αντίστοιχα) αλλά και με το πλύσιμο νερού βρύσης (μεταχείριση Β.)

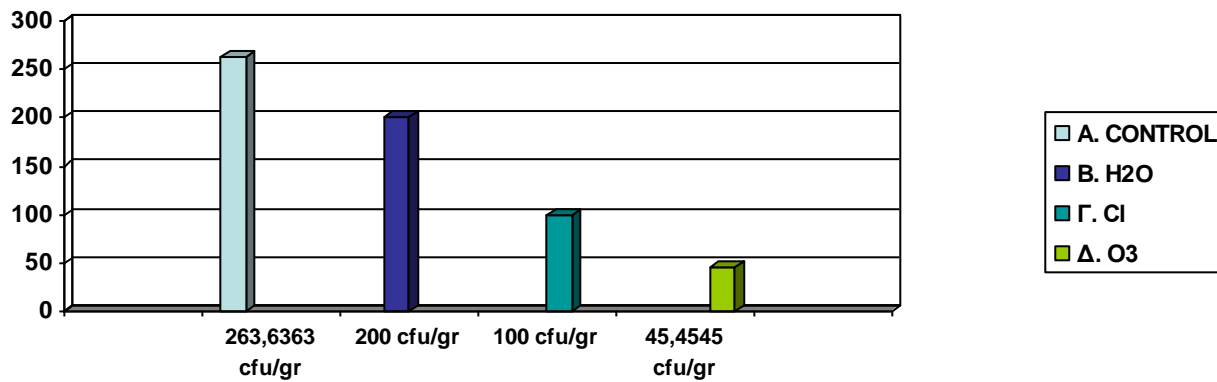
Εικόνα 18. Διάγραμμα 7, Μπρόκολο 1Α, 1Β, 1Γ, 1Δ



Εικόνα 19. Διάγραμμα 8, Μπρόκολο 2Α, 2Β, 2Γ, 2Δ



Εικόνα 20. Διάγραμμα 9, Μπρόκολο 3Α, 3Β, 3Γ, 3Δ

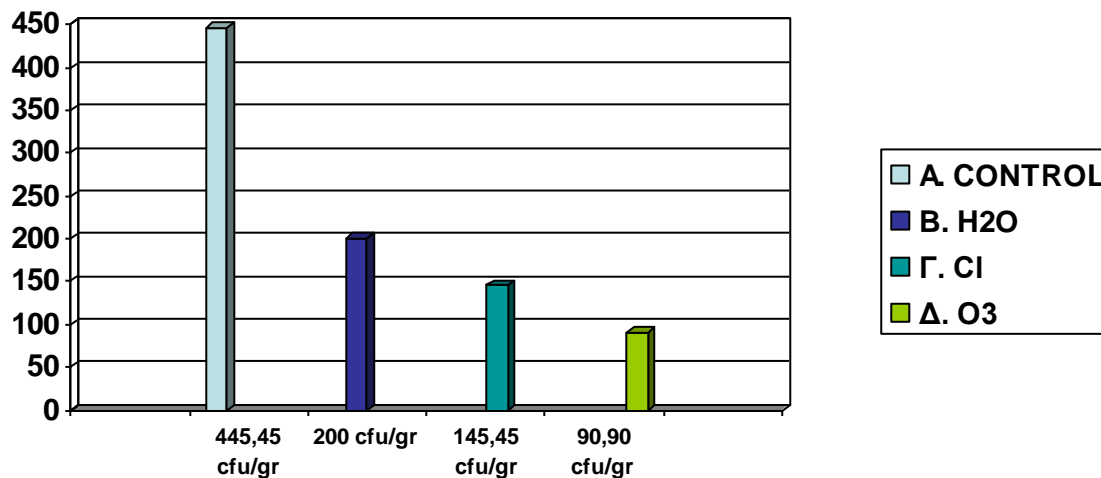


Στο 8^ο διάγραμμα (μπρόκολο 2, εικόνα 19) το φορτίο των εντεροβακτηριακών με το πλύσιμο νερού βρύσης (μεταχείριση Β.) είναι 272,72 cfu/gr, με το πλύσιμο του χλωριωμένου νερού είναι 146,46 cfu/gr και με το οζονοποιημένο νερό 100 cfu/gr. Το όζον έχει την μεγαλύτερη μείωση από τις μεταχειρίσεις. 172 cfu/gr λιγότερα από την μεταχείριση Β. και 46 cfu/gr από την μεταχείριση Γ.

Στο 9^ο διάγραμμα (μπρόκολο 3, εικόνα 20), το φορτίο των εντεροβακτηριακών με το πλύσιμο νερού βρύσης (μεταχείριση Β.) είναι 200 cfu/gr, με το πλύσιμο του χλωριωμένου νερού είναι 100 cfu/gr και με το οζονοποιημένο νερό 45,45 cfu/gr. Το όζον έδειξε μείωση 154 cfu/gr σε σχέση με την μεταχείριση Β. και 55 cfu/gr με την μεταχείριση Γ.

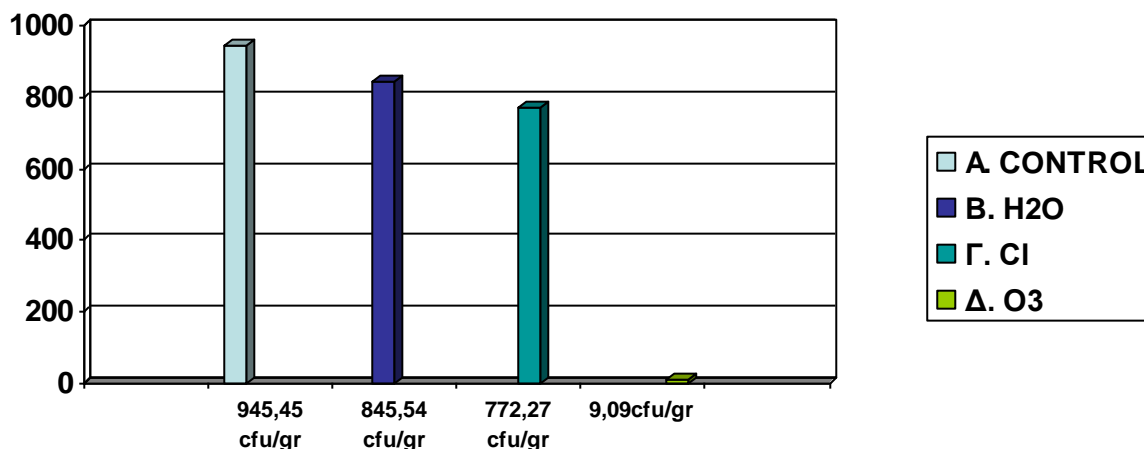
Μετά από δεκαπέντε ημέρες έγινε η επανάληψη της διαδικασίας από τα ίδια σημεία δειγματοληψίας (2 σουπερμάρκετ και λαϊκή αγορά). Εντεροβακτηριακά βρέθηκαν και στα τρία μπρόκολα (4, 5, 6). Η μείωση είναι και εδώ κλιμακωτή καθώς το πλύσιμο με το νερό βρύσης (μεταχείριση Β) λιγόστεψε το φορτίο των εντεροβακτηριακών από το αρχικό φορτίο χωρίς πλύσιμο (μεταχείριση Α), εν συνεχεία το χλώριο (μεταχείριση Γ) κατέστρεψε ακόμη περισσότερα εντεροβακτηριακά και τέλος το όζον (μεταχείριση Δ) απομάκρυνε μεγαλύτερο αριθμό εντεροβακτηριακών από όλες τις μεταχειρίσεις.

Εικόνα 21. Διάγραμμα 10, Μπρόκολο 4Α, 4Β,4Γ, 4Δ



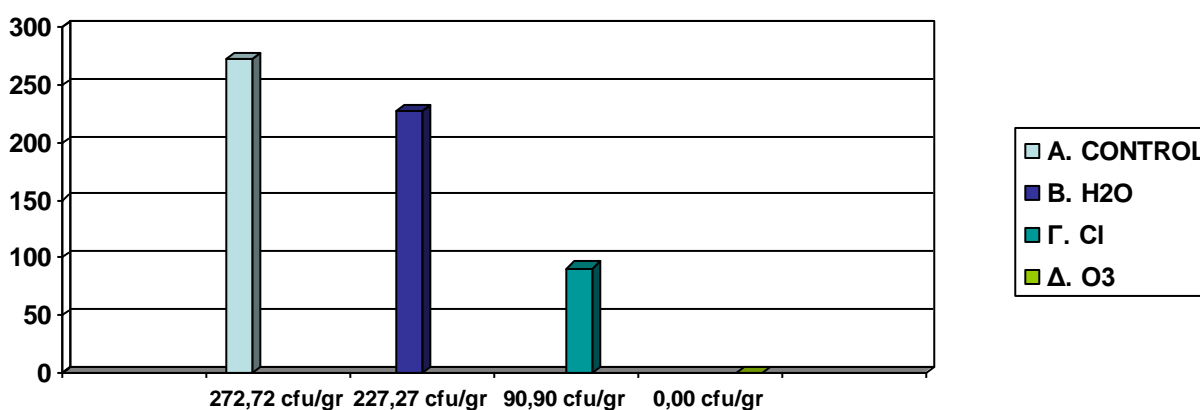
Το 10^ο διάγραμμα (μπρόκολο 4, εικόνα 21) δείχνει μεγαλύτερο αριθμό εντεροβακτηριακών σε σχέση με το 1^ο μπρόκολο. Το όζον (μεταχείριση Δ) έδειξε την μεγαλύτερη μείωση, 110 cfu/gr από την μεταχείριση Β. και 55 cfu/gr από την μεταχείριση Γ.

Εικόνα 22. Διάγραμμα 11, Μπρόκολο 5Α, 5Β, 5Γ, 5Δ



Το 11^ο διάγραμμα (μπρόκολο 5, εικόνα 22), δείχνει μεγαλύτερο αρχικό φορτίο (μεταχείριση Α) εντεροβακτηριακών από το 2^ο, όπως και στις μεταχειρίσεις Β και Γ επίσης. Η μεταχείριση Δ. (όζον) έχει τον μικρότερο αριθμό εντεροβακτηριακών (μόλις 9,09 cfu/gr) στο 5^ο μπρόκολο παρά το μεγαλύτερο φορτίο των άλλων μεταχειρίσεων (Β και Γ) σε σχέση με το 2^ο μπρόκολο (μεταχείριση Δ = 100 cfu/gr).

Εικόνα 23. Διάγραμμα 12, Μπρόκολο 6Α, 6Β, 6Γ, 6Δ



Στο 12^ο διάγραμμα (μπρόκολο 6, εικόνα 23) οι τιμές είναι ίδιες περίπου με το 3^ο στις μεταχειρίσεις Α, Β, και Γ. Η μεταχείριση Δ στο 6^ο μπρόκολο έχει μηδενίσει τα εντεροβακτηριακά, αποδεικνύοντας πως φέρει τα καλύτερα αποτελέσματα από το πλύσιμο με νερό βρύσης αλλά και από το χλωριωμένο νερό.

14.3 Στατιστική ανάλυση οργανοληπτικού ελεγχου

Η ταξινόμηση με βάση τη μεταχείριση σε ομάδες των λαχανικών του πειράματος έγινε με την βοήθεια της διαχωριστικής ανάλυσης(Discriminant analysis) . Για την εκτέλεση της μεθόδου και την εξαγωγή των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 21.

Για να συμπεράνουμε ποιοι είναι οι παράγοντες που επηρεάζονται-συσχετίζονται κατά κύριο λόγο από την μεταχείριση των λαχανικών με απλό νερό, χλωριωμένο νερό και οξονοποιημένο νερό και να χτίσουμε ένα μοντέλο που θα ταξινομεί τα λαχανικά με βάση την μεταχείρισή του τοποθετήσαμε ως εξαρτημένη μεταβλητή την μεταχείριση και ως ανεξάρτητες όλες τις υπόλοιπες του πειράματος

- i. Παρτίδα
- ii. Προέλευση
- iii. Οργανολήπτης
- iv. Επανάληψη
- v. Χρώμα
- vi. Φωτεινότητα
- vii. Αλμυρότητα
- viii. Πικρή
- ix. Στυφή
- x. Γλυκιά
- xi. Μεταλλική
- xii. Μουχλιασμένη
- xiii. Όξινη
- xiv. Παραμένουσα Γεύση
- xv. Συνεκτικότητα
- xvi. Προσκόλληση στα δόντια
- xvii. Χυμώδης
- xviii. Οσμή
- xix. Αφή/Τρυφερότητα
- xx. Συνολική Εντύπωση

Εφαρμόζοντας την μέθοδο stepwise βλέπουμε στον παρακάτω πίνακα 1 ποίες μεταβλητές οι μέσοι όροι δεν είναι στατιστικά ίσοι και για της τρεις περιπτώσεις μεταχείρισης.

14.3.1 Ανάλυση οργανοληπτικού ελέγχου για το μαρούλι

Πίνακας 9

Variables Entered/Removed^{a,b,c,d}

Step	Entered	Wilks' Lambda							
		Statistic	df1	df2	df3	Exact F			
						Statistic	df1	df2	Sig.
1	Συνολική Εντύπωση	,743	1	2	537,000	92,703	2	537,000	,000
2	Φωτεινότητα	,704	2	2	537,000	51,360	4	1072,000	,000
3	Επανάληψη	,650	3	2	537,000	42,864	6	1070,000	,000
4	Αλμυρότητα	,639	4	2	537,000	33,525	8	1068,000	,000
5	Συνεκτικότητα	,632	5	2	537,000	27,479	10	1066,000	,000
6	Μεταλλική	,624	6	2	537,000	23,575	12	1064,000	,000

At each step, the variable that minimizes the overall Wilks' Lambda is entered.

- a. Maximum number of steps is 40.
- b. Maximum significance of F to enter is .05.
- c. Minimum significance of F to remove is .10.
- d. F level, tolerance, or VIN insufficient for further computation.

Από τις 20 μεταβλητές που υπήρχαν στο πείραμα, 6 από αυτές είναι στατιστικά σημαντικές αφού απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση του στατιστικού ελέγχου.

Αυτές είναι οι Συνολική εντύπωση, η φωτεινότητα, η επανάληψη, η αλμυρότητα, η συνεκτικότητα και η μεταλλική γεύση.

Πίνακας 10

Classification Function Coefficients

	Μεταχείριση		
	Πλυμένα με νερό	Πλυμένα με χλωριωμένο νερό	Πλυμένα με οζονοποιημένο νερό
Επανάληψη	7,970	8,433	9,234
Φωτεινότητα	5,875	6,446	7,239
Αλμυρότητα	4,509	4,801	4,832
Μεταλλική	4,283	4,416	4,023
Συνεκτικότητα	3,272	3,291	3,647
Συνολική Εντύπωση	7,109	7,804	9,230
(Constant)	-49,875	-56,338	-65,139

Fisher's linear discriminant functions

Στον Πίνακα 10 έχουν υπολογιστεί οι συντελεστές των γραμμικών συναρτήσεων με την μέθοδο του Fisher. Το γραμμικό μοντέλο για την κατηγοριοποίηση «Πλυμένα με νερό είναι»:

$$x_1 = (7,970 * \text{Επανάληψη}) + (5,875 * \text{φωτεινότητα}) + (4,509 * \text{Αλμυρότητα}) + (4,283 * \text{Μεταλλική}) + (3,272 * \text{Συνεκτικότητα}) + (7,109 * \text{Συνολική Εντύπωση}) - 49,875$$

Για την δεύτερη «Πλυμένα με χλωριωμένο νερό» είναι:

$$x_2 = (9,234 * \text{Επανάληψη}) + (7,239 * \text{φωτεινότητα}) + (4,832 * \text{Αλμυρότητα}) + (4,832 * \text{Μεταλλική}) + (3,291 * \text{Συνεκτικότητα}) + (7,804 * \text{Συνολική Εντύπωση}) - 56,338$$

Για την τρίτη «Πλυμένα με οζονοποιημένο νερό» είναι:

$$x_3 = (8,433 * \text{Επανάληψη}) + (6,446 * \text{φωτεινότητα}) + (4,832 * \text{Αλμυρότητα}) + (4,023 * \text{Μεταλλική}) + (3,67 * \text{Συνεκτικότητα}) + (9,230 * \text{Συνολική Εντύπωση}) - 65,139$$

Πίνακας 11
Classification Results^{a,c}

	Μεταχείριση	Predicted Group Membership			Total	
		Πλυμένα με νερό	Πλυμένα με χλωριωμένο νερό	Πυμμένα με οξονοποιημένο νερό		
Original	Count	Πλυμένα με νερό	115	42	23	180
		Πλυμένα με χλωριωμένο νερό	61	68	51	180
		Πλυμένα με οξονοποιημένο νερό	14	35	131	180
Cross-validated ^b	%	Πλυμένα με νερό	63,9	23,3	12,8	100,0
		Πλυμένα με χλωριωμένο νερό	33,9	37,8	28,3	100,0
		Πλυμένα με οξονοποιημένο νερό	7,8	19,4	72,8	100,0
	Count	Πλυμένα με νερό	112	44	24	180
		Πλυμένα με χλωριωμένο νερό	65	64	51	180
		Πλυμένα με οξονοποιημένο νερό	14	35	131	180
	%	Πλυμένα με νερό	62,2	24,4	13,3	100,0
	Πλυμένα με χλωριωμένο νερό	36,1	35,6	28,3	100,0	
	Πλυμένα με οξονοποιημένο νερό	7,8	19,4	72,8	100,0	

a. 58,1% of original grouped cases correctly classified.

b. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

c. 56,9% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Στον Πίνακα 11 παρατηρούμε τον υπολογισμό της επιτυχίας της διαχωριστικής ανάλυσης μας. Πιο συγκεκριμένα εδώ βλέπουμε ότι έχουμε 58,1% σωστού διαχωρισμού για την συνολική διαχωριστική ανάλυση και 56,9% για την προσέγγιση διασταυρωμένης επικύρωσης. Τα ποσοστά είναι σχετικά μικρά αλλά αν κοιτάξουμε αναλυτικότερα την ταξινόμηση ανά κατηγορία παρατηρούμε ότι 63,9% των μαρουλιών που πλένονται με νερό και το 72,8% αυτών που πλένονται με οξονοποιημένο νερό ταξινομούνται σωστά. Τα ποσοστά ταξινόμησης των δύο κατηγοριών είναι αρκετά ικανοποιητικά, το πρόβλημα υπάρχει στην μεταχείριση με χλωριωμένο νερό που το ποσοστό είναι μόλις 37,8%. Οι τιμές του δείγματος γι' αυτή την μεταχείριση μοιάζουν αρκετά και με τις άλλες δύο κατηγορίες και ειδικά με την μεταχείριση «πλυμένα με νερό» οπότε ο διαχωρισμός τους είναι δύσκολος, ίσως αν προσθέταμε κάποιες επιπλέον μεταβλητές στο πείραμα να πετυχαίναμε καλύτερο διαχωρισμό αυτής της κατηγορίας.

Πίνακας 12

Wilks' Lambda

Test of Function(s)	Wilks' Lambda	Chi-square	df	Sig.
1 through 2	,624	252,041	12	,000
2	,988	6,419	5	,268

Ο πίνακας 12 χρησιμοποιώντας το Wilks' Lambda υπολογίζει το ποσοστό της διακύμανσης που ερμηνεύει το μοντέλο. Το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης ερμηνεύεται μέσω της πρώτης συνάρτησης. Μπορούμε να παραβλέψουμε την δεύτερη καθώς αφού η p value = 0.268 > 0.05 και 'συνεισφέρει' ελάχιστα στο μοντέλο.

Πίνακας 13

Standardized Canonical Discriminant Function

Coefficients

	Function	
	1	2
Επανάληψη	,561	-,049
Φωτεινότητα	,554	,183
Αλμυρότητα	,148	,674
Μεταλλική	-,132	,808
Συνεκτικότητα	,212	-,516
Συνολική Εντύπωση	,796	-,310

Πίνακας 14

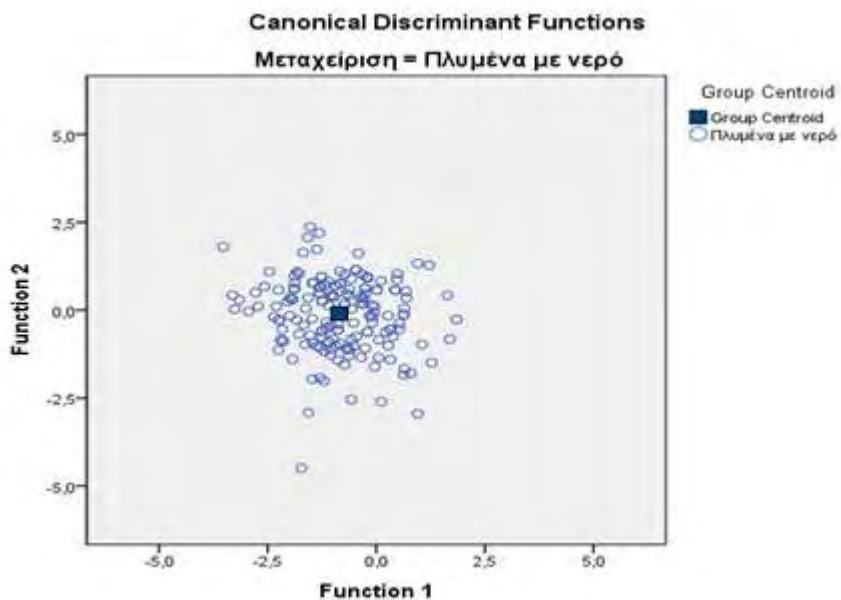
Functions at Group Centroids

Μεταχείριση	Function	
	1	2
Πλυμένα με νερό	-,848	-,096
Πλυμένα με χλωριωμένο νερό	-,151	,153
Πλυμένα με οζονοποιημένο νερό	,999	-,058

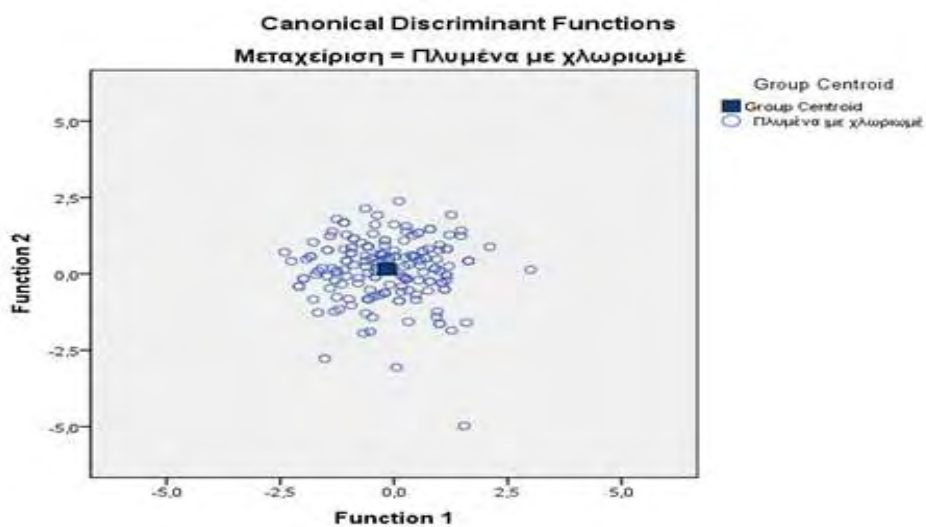
Unstandardized canonical discriminant functions evaluated at group means

Τέλος ο πίνακας 13 μας δίνει τις τιμές των συντελεστών των στατιστικά σημαντικών μεταβλητών του πειράματος των κανονικοποιημένων συναρτήσεων 1,2 και ο πίνακας 14 τους μέσους όρους- κέντρα των τριών κατηγοριών που προκύπτουν από την μεταχείριση. Με την βοήθεια των δύο συναρτήσεων και των κέντρων τους μπορούμε να κάνουμε διαγραμματική ανάλυση την εξαρτημένης μας μεταβλητής (μεταχείριση).

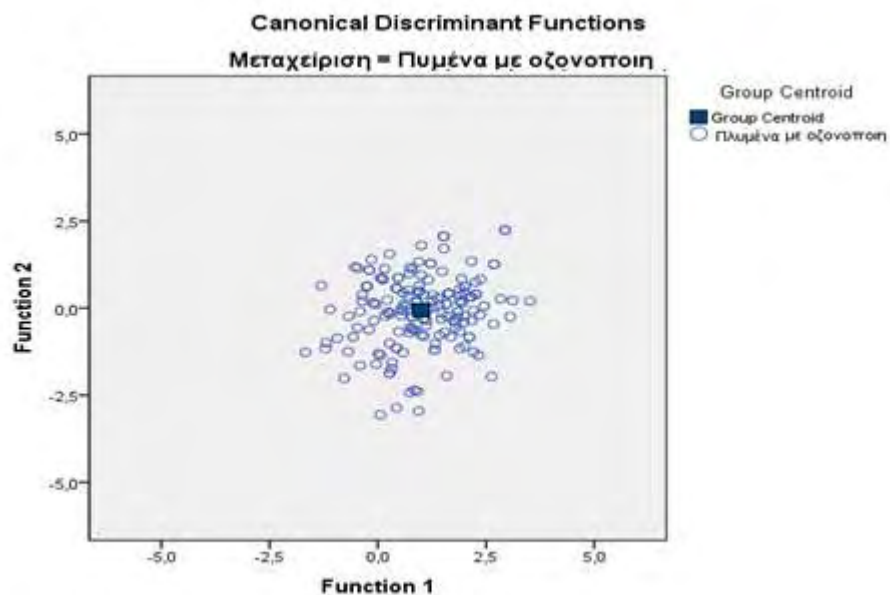
Εικόνα 24, Διάγραμμα 13



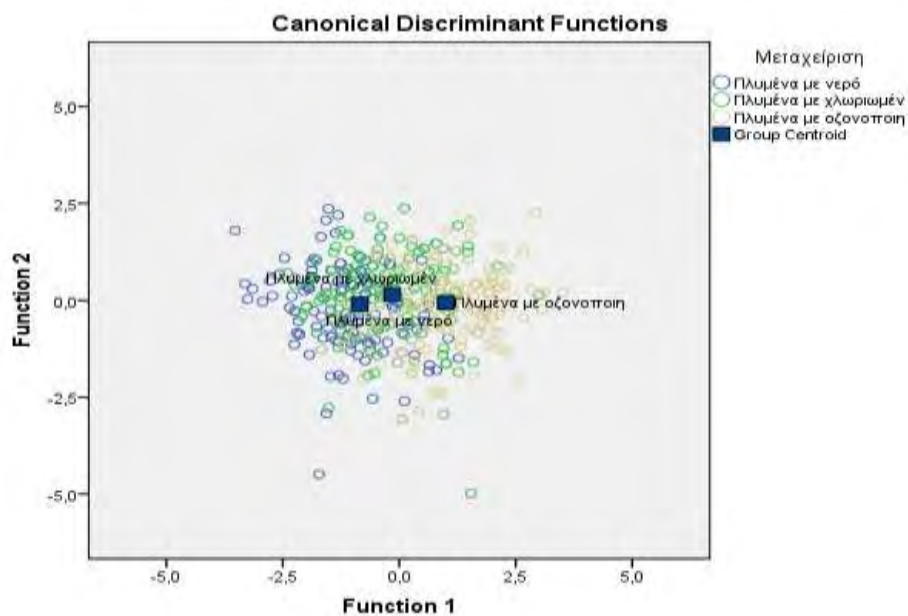
Εικόνα 25, Διάγραμμα 14



Εικόνα 26 Διάγραμμα 15



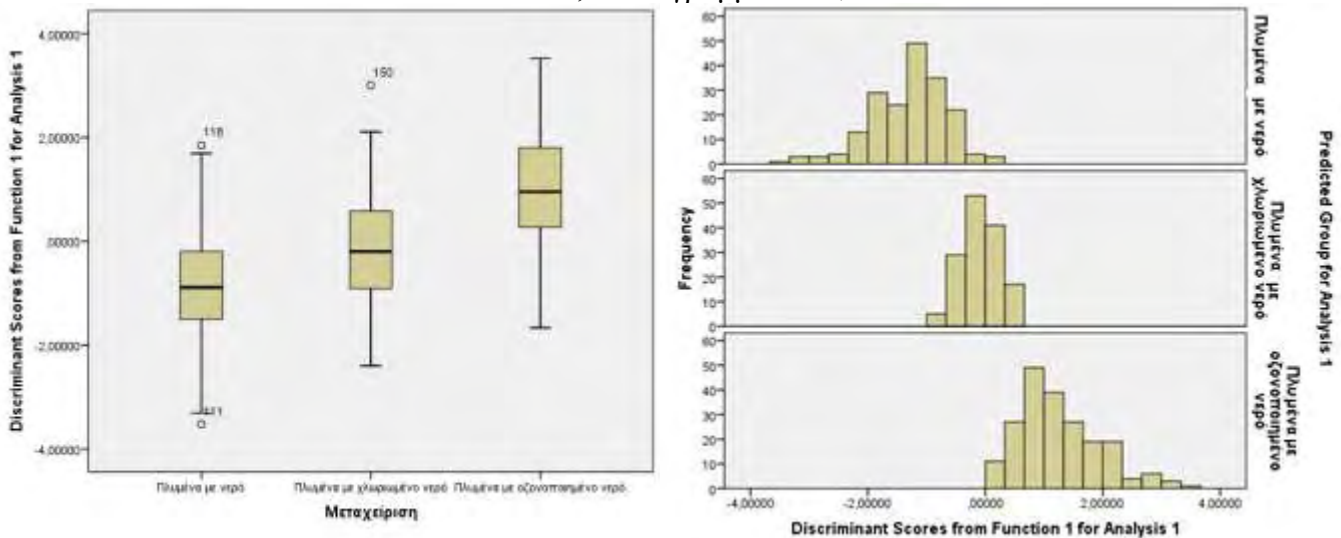
Εικόνα 27, Διάγραμμα 16



Το συμπέρασμα από τον πίνακα 11 επιβεβαιώνεται και από τα παραπάνω διαγράμματα. Ειδικότερα στο διάγραμμα 16 παρατηρούμε ότι οι παρατηρήσεις ως προς

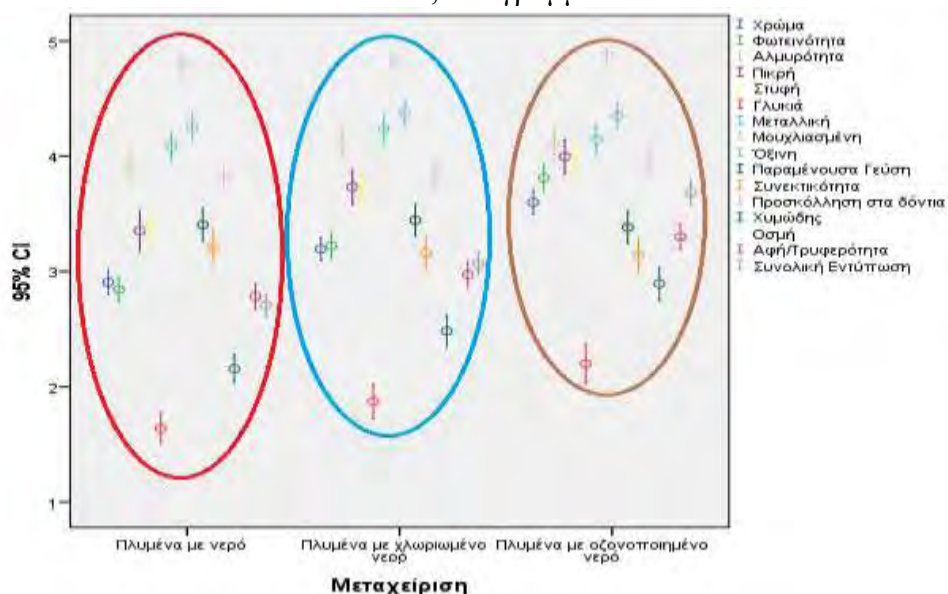
την μεταχείριση πλυμένα με νερό, πλυμένα με χλωριωμένο νερό είναι πολύ κοντά σχεδόν επικαλύπτονται γεγονός που είναι ορατό παρατηρώντας και πόσο κοντά βρίσκονται τα κέντρα τους σε σχέση με το κέντρο της τρίτης κατηγορίας (πλυμένα με οζονοποιημένο νερό). Παράλληλα όμως γίνεται αντιληπτό ότι η μεταχείριση με οζονοποιημένο νερό έχει αρκετά μεγαλύτερους μέσους όρους στις μεταβλητές του πειράματος σε σχέση με τις άλλες δύο, με την μεταχείριση «πλυμένα με νερό» να έχει με τους μικρότερους μέσους όρους για όλες τις μεταβλητές με βάση την function 1.

Εικόνα 28,29 Διαγράμματα 17,18



Στα Διαγράμματα 17, 18 παρατηρούμε ότι πράγματι η συνάρτηση 1 κάνει πολύ καλή δουλειά στο διαχωρισμό των κατηγοριών την μεταχείρισης. Αναλυτικότερα στο 5 παρατηρούμε την αύξηση των score από κατανομή σε κατανομή. Με την μεταχείριση «πλυμένα με οζονοποιημένο νερό» να ουσιαστικά η καλύτερη μεταχείριση ως προς όλα τα χαρακτηριστικά της διαχώρισης.

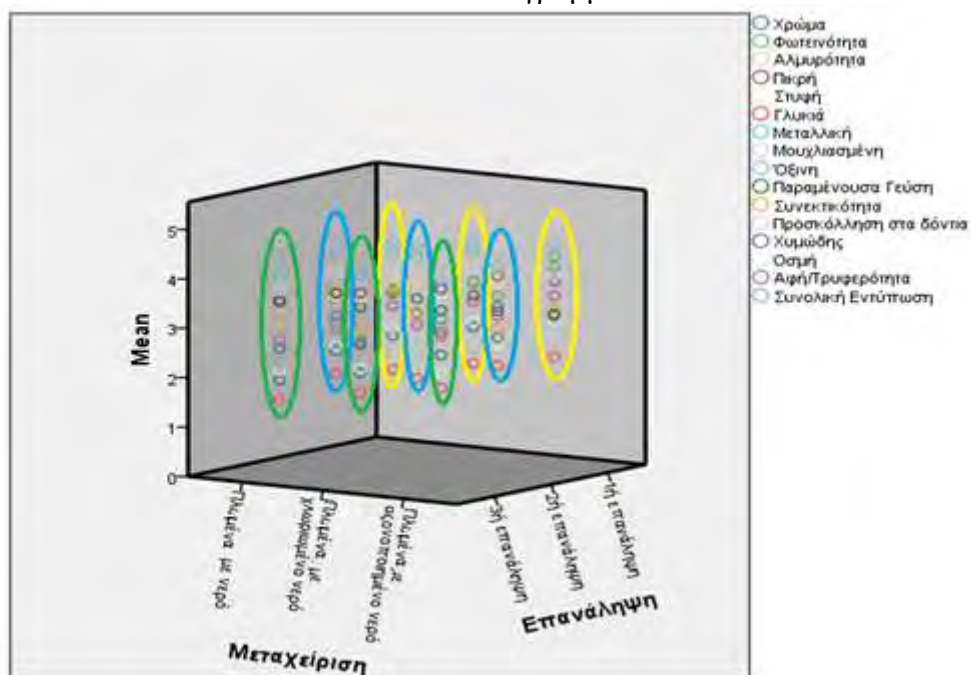
Εικόνα 30, Διάγραμμα 19



Στο διάγραμμα 19 παρατηρούμε τις τιμές των μέσων όρων για τις τρεις συστάδες της μεταχείρισης. Η πρώτη συστάδα έχει τις χαμηλότερες τιμές σχεδόν για όλα τα χαρακτηριστικά του οργανοληπτικού ελέγχου ενώ η συστάδα πλυμένα με οξονοποιημένο νερό έχει τις μεγαλύτερες. Οι μεγαλύτερες μεταβολές παρατηρούνται στη φωτεινότητα στη γλυκιά και πικρή γεύση και στην συνολική εντύπωση. Αυτό σημαίνει πως τα μαρούλια που πλύθηκαν με οξονοποιημένο νερό έχουν μεγαλύτερη φωτεινότητα, λιγότερο πικρή και περισσότερο γλυκιά γεύση και καλύτερη συνολική εντύπωση. Μικρότερη αύξηση των τιμών παρατηρείται στο χρώμα, την τρυφερότητα, τη στυφή γεύση και την χυμώδη, δηλαδή τα μαρούλια με όζον έχουν πιο πράσινο χρώμα, είναι πιο χυμώδης και τρυφερά, ενώ παράλληλα είναι και λιγότερο στυφά. Τα χαρακτηριστικά όπως μεταλλική, μουχλιασμένη, όξινη, παραμένουσα γεύση, συνεκτικότητα, αλμυρότητα, προσκόλληση στα δόντια και οσμή δεν έχουν σημαντικές μεταβολές στους μέσους όρους.

Τέλος στο διάγραμμα 20 έχουμε μια απεικόνιση σε συστάδες της μεταχείρισης σε σχέση με την επανάληψη που όπως αποδείχτηκε από το μοντέλο της discriminant ανάλυσης είναι πολύ σημαντικός παράγοντας αλλά και ως προς τους μέσους όρους των χαρακτηριστικών του οργανοληπτικού ελέγχου.

Εικόνα 31 Διάγραμμα 20



Παρατηρούμε ότι οι μέσοι όροι των περισσότερων χαρακτηριστικών μειώνονται καθώς περνάει ο χρόνος (συστάδες επαναλήψεων) ενώ παράλληλα τ' αποτελέσματα των συστάδων με βάση μεταχείριση συμπεριφέρονται με τον ίδιο τρόπο σε κάθε μία επανάληψη ξεχωριστά όπως στο διάγραμμα 19. Ειδικότερα ενώ οι τιμές των μέσων όρων μειώνονται κατά τη διάρκεια των επαναλήψεων για όλες της κατηγορίες των μεταχειρίσεων οι συστάδες της κατηγορίας «Πλυμένα με οξονοποιημένο νερό» διατηρούν τους υψηλότερους μέσους όρους σε σχέση με τις άλλες δύο κατηγορίες καθ' όλη την διάρκεια εκτέλεσης του πειράματος.

14.3.2 Στατιστική ανάλυση οργανοληπτικού ελέγχου για μπρόκολο.

Πίνακας 15

Variables Entered/Removed^{a,b,c,d}

Step	Entered	Wilks' Lambda							
		Statistic	df1	df2	df3	Exact F			
						Statistic	df1	df2	Sig.
1	Συνολική Εντύπωση	,516	1	2	537,000	251,979	2	537,000	,000
2	Επανάληψη	,405	2	2	537,000	153,014	4	1072,000	,000
3	Φωτεινότητα	,351	3	2	537,000	122,734	6	1070,000	,000
4	Χρώμα	,334	4	2	537,000	97,593	8	1068,000	,000
5	Στυφή	,326	5	2	537,000	80,088	10	1066,000	,000
6	Μουχλιασμένη	,322	6	2	537,000	67,684	12	1064,000	,000
7	Αφή/Τρυφερότητ α	,317	7	2	537,000	58,808	14	1062,000	,000
8	Όξινη	,313	8	2	537,000	52,075	16	1060,000	,000
9	Παρτίδα	,310	9	2	537,000	46,800	18	1058,000	,000
10	Συνεκτικότητα	,306	10	2	537,000	42,625	20	1056,000	,000
11	Γλυκιά	,302	11	2	537,000	39,239	22	1054,000	,000

At each step, the variable that minimizes the overall Wilks' Lambda is entered.

- a. Maximum number of steps is 40.
- b. Maximum significance of F to enter is .05.
- c. Minimum significance of F to remove is .10.
- d. F level, tolerance, or VIN insufficient for further computation.

Από τις 20 μεταβλητές που υπήρχαν στο πείραμα, 11 από αυτές είναι στατιστικά σημαντικές αφού απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση του στατιστικού ελέγχου για ισότητα των μέσων όρων.

Αυτές είναι οι Συνολική εντύπωση, η φωτεινότητα, το χρώμα, η στυφή γεύση, η μουχλιασμένη, η γλυκιά, η τρυφερότητα, η όξινη γεύση, η συνεκτικότητα, η επανάληψη του πειράματος και η παρτίδα από την οποία δοκίμασαν οι οργανολήπτες.

Πίνακας 16

Classification Function Coefficients

	Μεταχείριση		
	Πλυμένα με νερό	Πλυμένα με χλωριωμένο νερό	Πλυμένα με οζονοποιημένο νερό
Παρτίδα	5,391	5,011	4,273
Επανάληψη	12,320	13,962	16,910
Χρώμα	3,019	3,759	4,968
Φωτεινότητα	4,403	5,394	6,507
Στυφή	-,136	,263	-,288
Γλυκιά	1,664	1,545	1,115
Μουχλιασμένη	10,587	10,233	9,438
Όξινη	3,307	2,972	3,249
Συνεκτικότητα	3,048	3,299	3,725
Αφή/Τρυφερότητα	3,482	3,888	4,541
Συνολική Εντύπωση	1,982	2,953	5,926
(Constant)	-69,385	-79,300	-99,976

Fisher's linear discriminant functions

Στον Πίνακα 16 έχουν υπολογιστεί οι συντελεστές των γραμμικών συναρτήσεων με την μέθοδο του Fisher για την μεταχείριση του μπρόκολου. Το γραμμικό μοντέλο ανά κατηγοριοποίηση είναι:

Για την πρώτη «Πλυμένα με νερό»

α)

$$x_1 = (5,391 * \text{παρτίδα}) + (12,320 * \text{Επανάληψη}) + (4,403 * \text{φωτεινότητα}) + (3,019 * \text{χρώμα}) + (-0,136 * \text{στυφή}) + (1,664 * \text{γλυκιά}) + (10,587 * \text{μουχλιασμένη}) + (3,307 * \text{όξινη}) + (3,048 * \text{Συνεκτικότητα}) + (3,482 * \text{αφή}) + (1,982 * \text{Συνολική Εντύπωση}) - 69,385$$

Για την δεύτερη «Πλυμένα με χλωριωμένο νερό» είναι:

β)

$$x_2 = (5,011 * \text{παρτίδα}) + (13,962 * \text{Επανάληψη}) + (5,394 * \text{φωτεινότητα}) + (3,759 * \text{χρώμα}) + (0,263 * \text{στυφή}) + (1,545 * \text{γλυκιά}) + (10,233 * \text{μουχλιασμένη}) + (2,972 * \text{όξινη}) + (3,299 * \text{Συνεκτικότητα}) + (3,888 * \text{αφή}) + (2,953 * \text{Συνολική Εντύπωση}) - 79,300$$

Για την τρίτη «Πλυμένα με οζονοποιημένο νερό» είναι:

γ)

$$x_3 = (4,273 * \text{παρτίδα}) + (16,910 * \text{Επανάληψη}) + (6,507 * \text{φωτεινότητα}) + (4,968 * \text{χρώμα}) + (-0,288 * \text{στύφη}) + (1,115 * \text{γλυκία}) + (9,438 * \text{μουχλιασμένη}) + (3,249 * \text{όξινη}) + (3,725 * \text{Συνεκτικότητα}) + (4,541 * \text{αφή}) + (5,926 * \text{Συνολική Εντύπωση}) - 99,976$$

Πίνακας 17

Classification Results^{a,c}

	Μεταχείριση	Predicted Group Membership			Total	
		Πλυμένα με νερό	Πλυμένα με χλωριωμένο νερό	Πλυξκλμένα με οξονοποιημένο νερό		
Original	Count	Πλυμένα με νερό	131	48	1	180
		Πλυμένα με χλωριωμένο νερό	42	117	21	180
		Πλυμένα με οξονοποιημένο νερό	0	19	161	180
	%	Πλυμένα με νερό	72,8	26,7	,6	100,0
		Πλυμένα με χλωριωμένο νερό	23,3	65,0	11,7	100,0
		Πλυμένα με οξονοποιημένο νερό	,0	10,6	89,4	100,0
Cross-validated ^b	Count	Πλυμένα με νερό	128	51	1	180
		Πλυμένα με χλωριωμένο νερό	47	110	23	180
		Πλυμένα με οξονοποιημένο νερό	0	21	159	180
	%	Πλυμένα με νερό	71,1	28,3	,6	100,0
		Πλυμένα με χλωριωμένο νερό	26,1	61,1	12,8	100,0
		Πλυμένα με οξονοποιημένο νερό	,0	11,7	88,3	100,0

a. 75,7% of original grouped cases correctly classified.

b. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

c. 73,5% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Στον Πίνακα 17 παρατηρούμε τον υπολογισμό της επιτυχίας της διαχωριστικής ανάλυσης μας. Πιο συγκεκριμένα βλέπουμε ότι έχουμε 75,7% σωστού διαχωρισμού για την συνολική διαχωριστική ανάλυση και 73,5% για την προσέγγιση διασταυρωμένης

επικύρωσης. Τα ποσοστά είναι ικανοποιητικά. Εστιάζοντας τώρα στην ταξινόμηση ανά κατηγορία παρατηρούμε ότι 72,8% των μαρουλιών που πλένονται με νερό και το 89,4% αυτών που πλένονται με οζονοποιημένο νερό ταξινομούνται σωστά. Τα ποσοστά ταξινόμησης των δύο κατηγοριών είναι εξαιρετικά, το ποσοστό της μεταχείρισης με χλωριωμένο νερό είναι 65,0% που δεν είναι άσχημο ειδικά σε σχέση με την ταξινόμηση που επέτυχε το αντίστοιχο μοντέλο σε αυτή την κατηγορία στο μαρούλι. Έτσι παρατηρούμε ότι οι τιμές του δείγματος γι' όλες τις κατηγορίες μεταχείρισης είναι αρκετά διακριτές σε αντίθεση με το μαρούλι που για την δεύτερη κατηγορία υπήρχε πρόβλημα.

Πίνακας 18

Wilks' Lambda

Test of Function(s)	Wilks' Lambda	Chi-square	df	Sig.
1 through 2	,302	636,597	22	,000
2	,964	19,233	10	,037

Ο πίνακας 18 χρησιμοποιώντας το Wilks' Lambda υπολογίζει το ποσοστό της διακύμανσης που ερμηνεύει το μοντέλο. Το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης ερμηνεύεται μέσω της πρώτης συνάρτησης αλλά και η δεύτερη συνάρτηση είναι στατιστικά σημαντικά αφού $\text{sig} > 0.05$.

Πίνακας 19

Standardized Canonical Discriminant Function

Coefficients

	Function	
	1	2
Παρτίδα	-,158	,016
Επανάληψη	1,053	,060
Χρώμα	,431	,106
Φωτεινότητα	,461	,489
Στυφή	-,062	1,012
Γλυκιά	-,147	,167
Μουχλιασμένη	-,195	,072
Όξινη	,001	-,646
Συνεκτικότητα	,165	,027
Αφή/Τρυφερότητα	,198	,055
Συνολική Εντύπωση	,753	-,671

Πίνακας 20

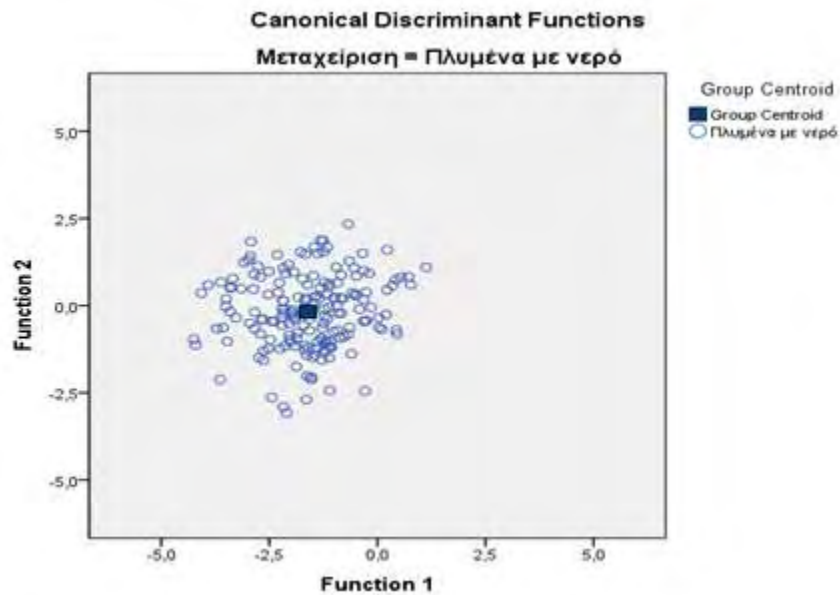
Functions at Group Centroids

Μεταχείριση	Function	
	1	2
Πλυμένα με νερό	-1,605	-,173
Πλυμένα με χλωριωμένο νερό	-,354	,267
Πλυμένα με οζονοποιημένο νερό	1,959	-,094

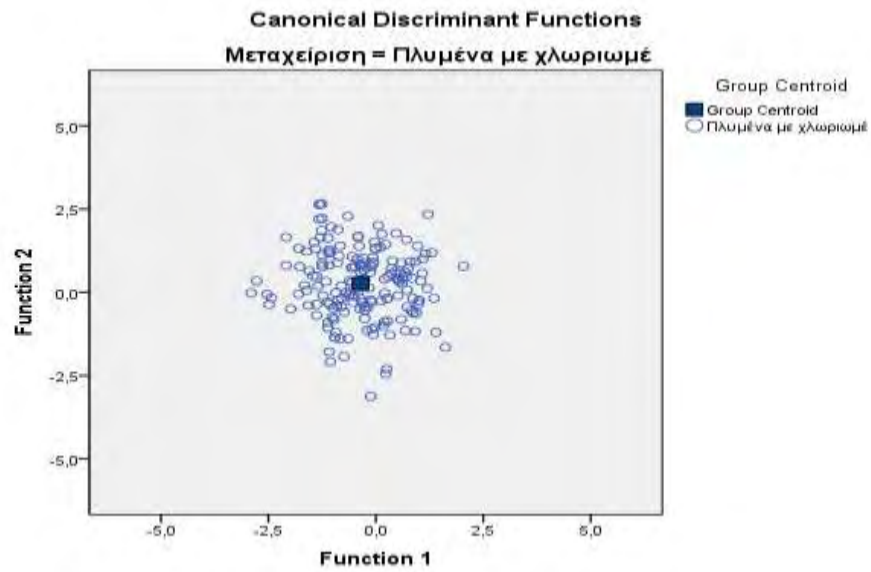
Unstandardized canonical discriminant functions evaluated at group means

Τέλος ο πίνακας 19 μας δίνει τις τιμές των συντελεστών των στατιστικά σημαντικών μεταβλητών του πειράματος των κανονικοποιημένων συναρτήσεων 1,2. Για να θεωρείται και ο πίνακας 20 τους μέσους όρους- κέντρα των τριών κατηγοριών που προκύπτουν από την μεταχείριση. Με την βοήθεια των δύο συναρτήσεων και των κέντρων τους μπορούμε να κάνουμε διαγραμματική ανάλυση την εξαρτημένης μας μεταβλητής (μεταχείριση).

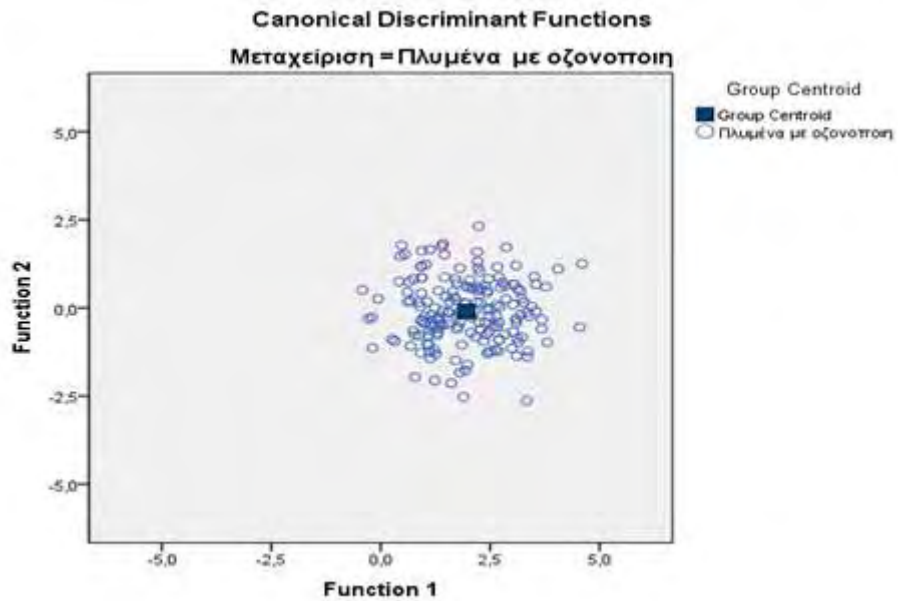
Εικόνα 32, Διάγραμμα 21



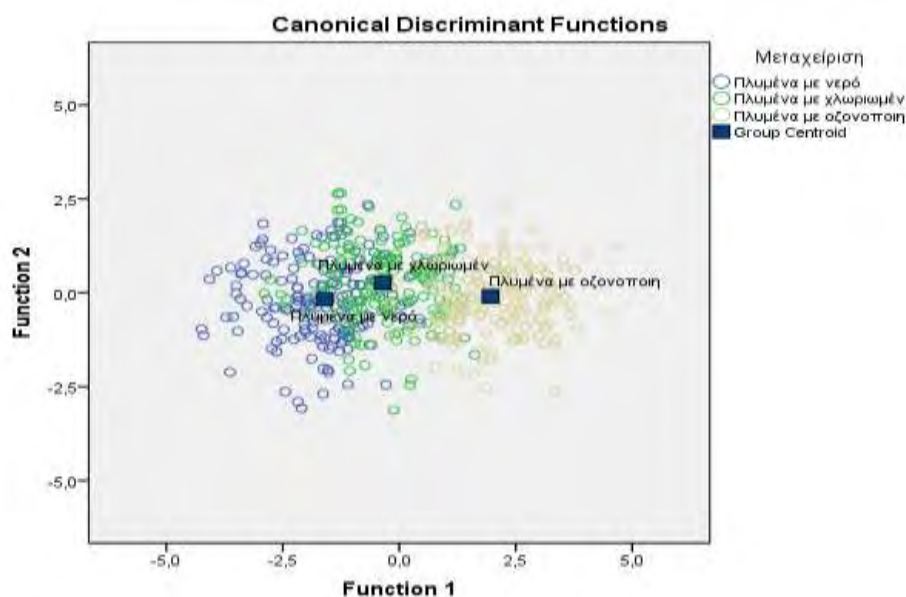
Εικόνα 33, Διάγραμμα 22



Εικόνα 34, Διάγραμμα 23



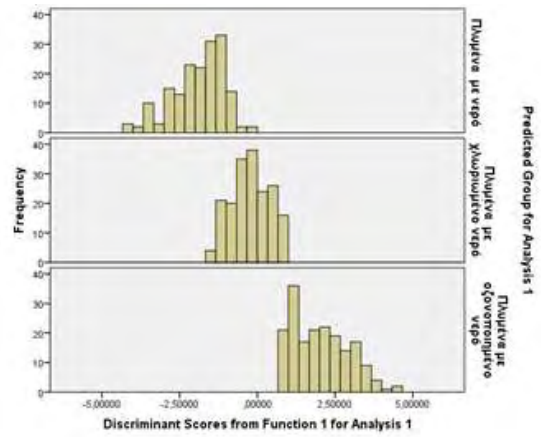
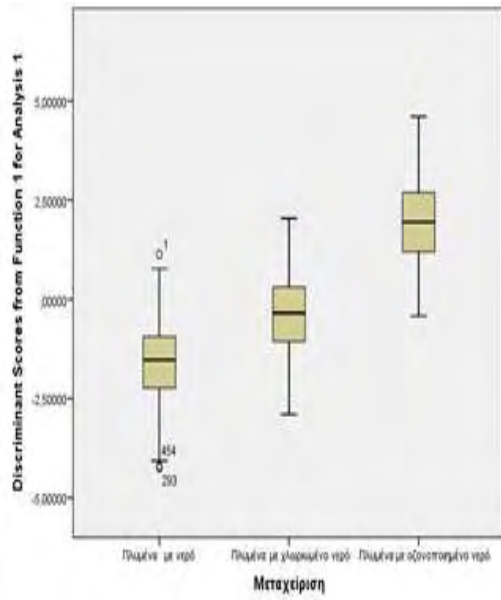
Εικόνα 35, Διάγραμμα 24



Το συμπέρασμα από τον πίνακα ταξινόμησης των παρατηρήσεων επιβεβαιώνεται και από τα παραπάνω διαγράμματα. Ειδικότερα στο διάγραμμα 24 παρατηρούμε ότι οι παρατηρήσεις ως προς όλες τις κατηγορίες μεταχείρισης είναι σχετικά διακριτές άρα το μοντέλο κάνει αρκετά καλή δουλειά. Επιπλέον γίνεται αντιληπτό ότι η μεταχείριση με οζονοποιημένο νερό έχει αρκετά μεγαλύτερους μέσους όρους στις μεταβλητές του μοντέλου για την διαχωριστική function 1(που είναι και η πιο σημαντική) σε σχέση με τις άλλες δύο κατηγορίες, με την μεταχείριση «πλυμένα με νερό» να έχει με τους μικρότερους μέσους όρους για όλες τις μεταβλητές.

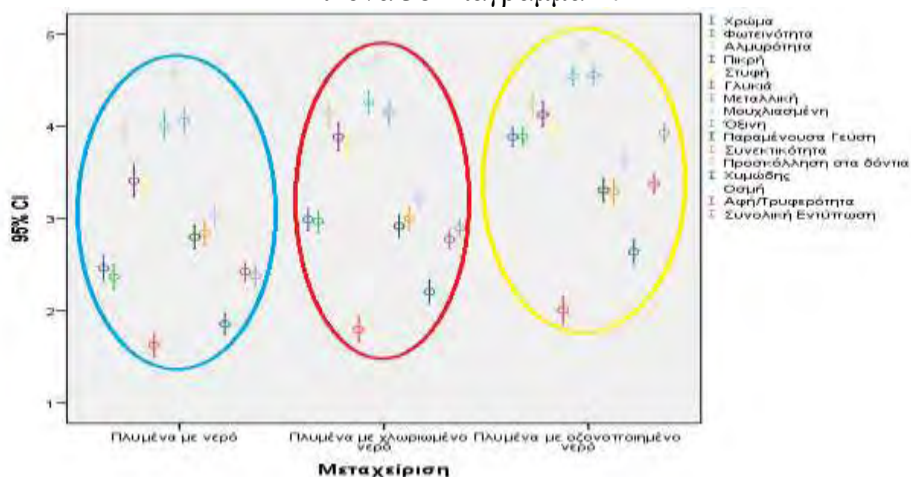
Για την δευτερεύουσα function 2 η μεταχείριση «πλυμένα με χλωριωμένο νερό» έχει ελαφρώς μεγαλύτερη τιμή από την κατηγορία «πλυμένα με οζονοποιημένο νερό».

Εικόνες 36, 37 Διαγράμματα 25-26



Στα Διαγράμματα 25, 26 παρατηρούμε ότι πράγματι η function 1 κάνει πολύ καλή δουλειά στο διαχωρισμό των κατηγοριών την μεταχείρισης. Αναλυτικότερα στο 5 παρατηρούμε την αύξηση των score από κατανομή σε κατανομή. Με την μεταχείριση «πλυμένα με οξονοποιημένο νερό» να ουσιαστικά η καλύτερη μεταχείριση ως προς όλα τα χαρακτηριστικά της διαχώρισης. Ενώ στο διάγραμμα 6 η κατανομές που προκύπτουν από την διαχωριστική ανάλυση με βάση τη μεταχείριση επικαλύπτονται σε πολύ μικρό βαθμό με την πρώτη και την Τρίτη να είναι εντελώς διαχωρισμένες.

Εικόνα 38 Διάγραμμα 27



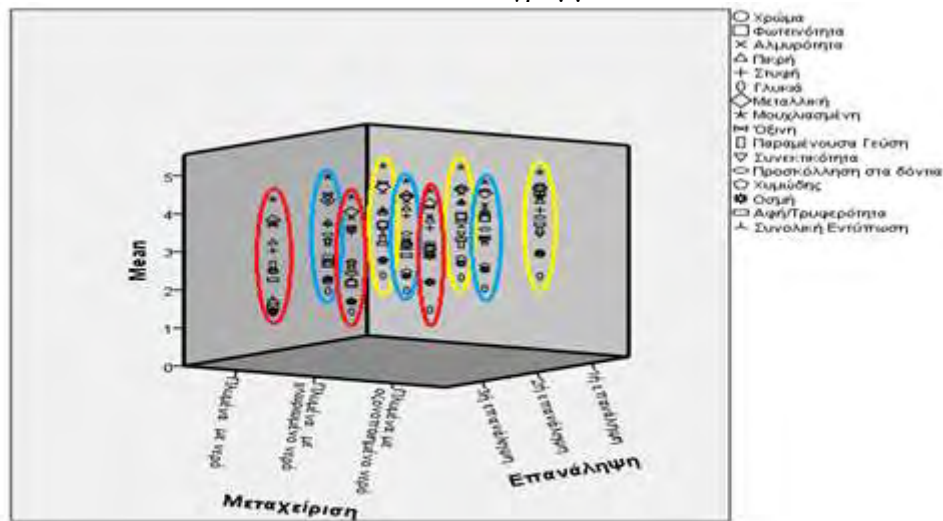
Στο διάγραμμα 27 παρατηρούμε τις τιμές των μέσων όρων για τις τρεις συστάδες της μεταχείρισης. Η πρώτη συστάδα έχει τις χαμηλότερες τιμές για όλα τα χαρακτηριστικά του οργανοληπτικού ελέγχου ενώ η συστάδα πλυμένα με οξονοποιημένο νερό έχει τις μεγαλύτερες. Οι μεγαλύτερες μεταβολές παρατηρούνται στη φωτεινότητα και το χρώμα, στη γλυκιά γεύση στην αφή/τρυφερότητα και στην συνολική εικόνα.

Η μεταβολή προς τα πάνω των μέσων όρων που παρατηρείται στην μεταχείριση «πλυμένα με οξονοποιημένο νερό» για το μπρόκολο είναι κατά πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με το μαρούλι που και εκεί τα αποτελέσματα για την 3^η κατηγορία ήταν τα καλύτερα αλλά με τόση μεγάλη διαφορά από τις υπόλοιπες δύο κατηγορίες.

Τέλος στο διάγραμμα 8 έχουμε μια τρισδιάστατη απεικόνιση σε συστάδες με άξονες την μεταχείριση την επανάληψη που όπως αποδείχτηκε από το μοντέλο της

discriminant ανάλυσης για το μπρόκολο είναι πολύ σημαντικός παράγοντας και τους μέσους όρους των χαρακτηριστικών του οργανοληπτικού έλεγχου.

Εικόνα 39 Διάγραμμα 28



Παρατηρούμε ότι οι μέσοι όροι των περισσότερων χαρακτηριστικών μειώνονται κατά την διάρκεια του χρόνου (συστάδες επαναλήψεων) αφού φθείρεται όσο είναι στη συντήρηση ενώ παράλληλα τ' αποτελέσματα σύμφωνα με την μεταχείριση συμπεριφέρονται με τον ίδιο τρόπο σε όλες τις επαναλήψεις όπως στο διάγραμμα 7. Αναλυτικότερα ενώ οι τιμές των μέσων όρων μειώνονται κατά τη διάρκεια των επαναλήψεων για όλες της κατηγορίες των μεταχειρίσεων η συστάδες της κατηγορίας «Πλυμένα με οξονοποιημένο νερό» διατηρεί τους υψηλότερους μέσους όρους σε σχέση με τις άλλες δύο κατηγορίες καθ' όλη την διάρκεια εκτέλεσης του πειράματος.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συνεχής εξέλιξη στις βιομηχανίες τροφίμων οδηγεί στην αναζήτηση νέων και καινοτόμων μεθόδων ώστε να παρέχονται ποιοτικά και ασφαλή προϊόντα. Η χρήση του όζοντος αποτελεί πλέον μια σίγουρη λύση όχι μόνο σε βιομηχανικό επίπεδο αλλά και σε επαγγελματικό. Μικρές επιχειρήσεις και παραγωγοί τροφίμων χρησιμοποιούν το οζονοποιημένο νερό στα στάδια της παραγωγής για την βελτίωση των προϊόντων τους. Επίσης πολλοί καταναλωτές πλέον είναι ενήμεροι για τα οφέλη της οζονοποίησης. Με χιλιάδες μικρόβια στα τρόφιμα που αποτελούν κίνδυνο για την δημόσια υγεία όλοι θέλουν μεγαλύτερη ασφάλεια και περισσότερη ποιότητα στην καθημερινή τους διατροφή χωρίς όμως μεγάλο κόστος επιβάρυνσης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όσον αφορά τον μικροβιολογικό έλεγχο, προέκυψε ότι :

Τα λαχανικά (μαρούλι και μπρόκολο) που εξετάστηκαν επέδειξαν μηδενικό φορτίο σε *E. coli*, *L. monocytogenes* και *Salmonella spp.*

- Αντίθετα στα περισσότερα δείγματα μαρουλιών βρέθηκαν Enterobacteriaceae και με τις τέσσερις μεταχειρίσεις (control, H₂O, Cl, O₃).
- Επίσης όλα τα δείγματα μπρόκολου βρέθηκαν να είναι θετικά σε Enterobacteriaceae και με τις τέσσερις μεταχειρίσεις (εκτός από το δείγμα 1B, 1Γ, 1Δ, 6Δ που το φορτίο έχει μηδενιστεί).
- Η συγκέντρωση των Enterobacteriaceae στα μαρούλια ήταν πολύ υψηλότερη σε σχέση με τα μπρόκολα. Οι αριθμοί στο μαρούλι είναι χιλιάδες cfu/gr, ενώ στο μπρόκολο κάτω από 100 cfu/gr.
- Η επιτυχία της απολύμανσης και στα δύο λαχανικά όσον αφορά τα Enterobacteriaceae και η μείωση της συγκέντρωσης τους ήταν σημαντική και κλιμακωτή σε σχέση με τη μέθοδο απολύμανσης (Control <H₂O <Cl< O₃) αντίστοιχα.
- Το οζονοποιημένο νερό είχε τα καλύτερα αποτελέσματα σε όλα τα δείγματα.
- Όσο πιο μεγάλος ήταν ο αριθμός των Enterobacteriaceae στο δείγμα τόσο μεγαλύτερη ήταν αναλογικά και η μείωση που επιτυγχάνονταν. Ιδιαίτερα στη περίπτωση του όζοντος και δευτερευόντως του χλωρίου, τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα επιτυχή ενώ ικανοποιητική ήταν και η μείωση με την απλή χρήση ξεπλύματος με τρεχούμενο νερό.
- Η περιοχή προέλευσης των λαχανικών πιθανόν να έχει σημαντικό ρόλο στην επιβάρυνση σε μικροβιολογικό φορτίο ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τον τόπο δειγματοληψίας.
- Αν πλύνουμε καλά τα λαχανικά μπορούμε να μειώσουμε τον αριθμό των μικροβίων χωρίς όμως αυτό να είναι ικανοποιητικό στην περίπτωση του μαρουλιού. Αντίθετα στο μπρόκολο τα αποτελέσματα είναι περισσότερο ικανοποιητικά ενώ το όζον και το χλώριο αποδίδουν άριστα ως απλές τεχνικές απολύμανσης.

Για τον οργανοληπτικό έλεγχο αξιολογώντας τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως:

- Το οζονοποιημένο νερό φέρει καλύτερα αποτελέσματα (από χλωριωμένο νερό και νερό) και στα δύο λαχανικά.
- Το χλωριωμένο νερό φέρει καλύτερα αποτελέσματα από το νερό και στα δύο λαχανικά.
- Τα μαρούλια που πλύθηκαν με οζονοποιημένο νερό έχουν μεγαλύτερη φωτεινότητα, λιγότερο πικρή και περισσότερο γλυκιά γεύση και καλύτερη συνολική εντύπωση. Επίσης έχουν πιο έντονο πράσινο χρώμα, είναι περισσότερο χυμώδης και τρυφερά, ενώ παράλληλα είναι και λιγότερο στυφά.
- Στο μαρούλι οι μέσοι όροι των χαρακτηριστικών με χλωριωμένο νερό είναι ελαφρώς καλύτεροι από το πλύσιμο με νερό.
- Τα μπρόκολα που πλύθηκαν με οζονοποιημένο νερό έχουν την καλύτερη βελτίωση στο χρώμα, την φωτεινότητα, την γλυκιά γεύση, την τρυφερότητα και την συνολική εντύπωση. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά είναι βελτιωμένα σε μικρότερο βαθμό όμως.
- Στο μπρόκολο οι μέσοι όροι των χαρακτηριστικών με χλωριωμένο νερό είναι αρκετά καλύτεροι από το πλύσιμο με νερό.
- Όσο περνάνε οι μέρες αποθήκευσης τα λαχανικά αλλοιώνονται. Κυρίως με το πλύσιμο νερού και μετά με το πλύσιμο χλωριωμένου νερού. Στο πλύσιμο με το οζονοποιημένο νερό παρατηρείται η μικρότερη αλλοίωση και στην δεύτερη αλλά και στην τρίτη επανάληψη.

Γενικά συμπεράσματα:

- Τα λαχανικά που αγοράζει και καταναλώνει ο Έλληνας πολίτης δεν αποτελούν κίνδυνο για την δημόσια υγεία.
- Όλοι μπορούν εύκολα και γρήγορα να βελτιώσουν την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων (χρήση όζοντος).
- Η προέλευση των λαχανικών δεν είναι κριτήριο ασφάλειας και ποιότητας, καθώς είτε από σούπερ μάρκετ είτε από λαϊκή αγορά μπορεί να αγοραστεί ακατάλληλο προϊόν.
- Η προέλευση των λαχανικών δεν παίζει κανένα ρόλο για τον οργανοληπτικό έλεγχο αλλά μόνο η μεταχείριση.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

- Το οζονοποιημένο νερό προτείνεται ανεπιφύλακτα για το πλύσιμο των τροφίμων και κυρίως των φρέσκων οπωροκηπευτικών. Τα πλεονεκτήματα του είναι το χαμηλό σχετικά κόστος αγοράς (μια οικιακή συσκευή κοστίζει 50 – 100 ευρώ) και ο χρόνος οζονοποίησης (10 λεπτά αρκούν).
- Το χλωριωμένο νερό προτείνεται ως τεχνική απολύμανσης έχοντας ως βασικό του πλεονέκτημα το μηδαμινό κόστος. Οι καταναλωτές είναι δύσπιστοι στην χρήση χλωρίου για το πλύσιμο των τροφίμων.
- Μεγαλύτερη διάρκεια οζονοποίησης πιθανώς να φέρει ακόμη καλύτερα αποτελέσματα τόσο στη μείωση του μικροβιολογικού φορτίου (έχει αποδειχθεί από την βιβλιογραφία) όσο και στα χαρακτηριστικά των τροφίμων.
- Το πολύ καλό πλύσιμο ακόμα και με απλό νερό μπορεί να μειώσει τον αριθμό των μικροβίων αλλά όχι να τον εξαλείψει.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R., Ammar, M.S. (1993) “Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables” *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1999 – 2006.
2. Abbott, S. (2003) “*Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas* and other *Enterobacteriaceae*. In: Murray, PR. Baron EJ., Jorgensen, JH., Tenover, MA., Tenover, RH.” *Manual of Clinical Microbiology* 8th edition ASM Press Washington D,C.
3. Akbas, M.Y., Ozdemir, M. (2008) “Effect of gaseous ozone on microbial inactivation and sensory of flaked red peppers” *International Journal of Food Science and Technology* 43, 1657–1662.
4. Akbas, M.Y., Olmez, H. (2007) “Effectiveness of organic acid, ozonated water and chlorine dippings on microbial reduction and storage quality of fresh cut iceberg lettuce” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 2609 – 2616.
5. Anonymous. (1992) “Food as a source of listeriosis” *Infect. Dis. Alert.* 11, 102 – 104.
6. Anonymous. (1992) “Listeriosis in normal and immunocompromised hosts” *Infect. Dis. Alert.* 11, 101 – 102.
7. Bailey and Scott. (2002) “*Enterobacteriaceae*. In: Betty, A. Forbes, Daniel, F. Sahm, Alice, S. Welssfeld” *Diagnostic Microbiology*. 11th Edition. By Mosby Inc, Missouri.

8. Baur, S., Klaiber, R., Hammes, W.P., Carle, R. (2004) "Sensory and microbiological quality of shredded, packaged iceberg lettuce as affected by pre-washing procedures with chlorinated and ozonated water" *Innovative Food and Emerging Technologies* 5, 45-55.
9. Beltran, D., Selma V.M., Tudela J.A., Gil, M.I (2005a) "Effect of different sanitizers on microbial and sensory quality of fresh – cut potato strips stored under modified atmosphere or vacuum packaging" *Postharvest Biology and Technology* 37, 37 – 46.
10. Beltran, D., Selma V.M., Marin, A., Gil, M.I. (2005b) "Ozonated Water Extends the Self Life of Fresh – Cut Lettuce" *J. Agric Food Chem.* 53, 5654 – 5663.
11. Bitzan, M., Moebius, E, Ludwing, K, Muller – Wiefel J, Heeseman, J, Karch, H. (1991) "High incidence of serum antibodies to Escherichia coli 0157 lipopoly-saccharide in children with haemolytic-uremic syndrome" *J Pediatr.* 119, 380 – 385.
12. Breener, D.J. (1984) "Family I Enterobacteriaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1." Williams & Wilkins, Baltimore 408 – 420.
13. Burners, A., Boss, P., Orskov, F., Orskov, I., Schaad, U. et al. (1992) "Occurrence of phenotypic properties of verotoxin producing Escherichia coli in sporadic cases of gastroenteritis" *Eur. J Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11, 631 – 634.
14. CDC, Center for Disease Control (1985) "Listeriosis out-break associated with Mexican-type cheese California" *MMWR* 34, 357 – 359.

15. CDC, Center for Disease Control and Prevention (2010). Outbreak surveillance data. http://www.cdc.gov/outbreaknet/surveillance_data.html.
16. Chaicumpa, W., Ruankunaporn, Y., Burr, D., Chongsa – nguan M., Escheveria, P. (1992) “Diagnosis of typhoid fever by detection of Salmonella typhi antigen in urine” J. Clin. Microbiol. 30, 2513 – 2515.
17. Chalker, R., Blaser, M. “A review of human salmonellosis : III. Magnitude of Salmonella infection in United States” Rev. Infect. Dis. 10, 111 – 114.
18. Ciesilki, C., Broome, C. (1987) “Listeria monocytogenes. A foodborne pathogen” Clin. Microbiol. Newstl. 9, 149 – 152.
19. Clawla, A.S. (2006) “Application of ozonated water technology for improving quality and safety of peeled shrimp meat” Food Science.
20. Conner, D.E., Brackett, R.E., Beuchat, L.R., (1986) “Effect of temperature sodium chloride and ph on growth of Listeria Monocytogenes in cabbage juice” Applied and Environmental Microbiology 52, 59 – 63.
21. Cullen, P.J., Tiwari, B.K., O’ Donell, C.P., Muthukumarappan, K. (2009) “Modeling approaches to ozone processing of liquid foods” Trends in Foods Science & Technology 20, 125-136.
22. Das, E., Gurakan., C.G., Byindirli, A. (2006) “Effect of controlled atmosphere storage, modified atmosphere, packaging and gaseous ozone treatment on the survival of Salmonella Enteritidis on cherry tomatoes” Food Microbiology 23, 430-438.

23. Dealler, S., Collins, J., James, A. (1992) "A rapid heat – resistant technique for presumptive identification of Salmonella on desoxycholate – citrate – agar" *Eur. J. Microbiol.* 11, 249 – 252.
24. Del Rosario, B.A., Beauchat, L.R. (1995) "Survival and growth of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in cantaloupe and watermelon" *J. Food Prot.* 58, 105 – 107.
25. Dove, W.E. (1946) "Developing food acceptance research" *Science* 103, 187.
26. Dove, W.E. (1947) "Food acceptability: Its determination and evaluation" *Food Technology* 1, 39.
27. Echeveria, P., Sethaburt, O., Pitrangsi., C. (1991) "Microbiology and diagnosis of infections with Shigella and enteroinvasive Escherichia coli" *Rev. Infect. Dis.* 13, S220 – 225.
28. [EPA] 1991. Alternative disinfectants and oxidants guidance manual. Available From <http://www.watercache.com/docs/ozone-uv.pdf>. Accessed [12/29/2005](#).
29. Ewing, W.H. (1986) "Identification of Enterobacteriaceae" 4th ed. New York.
30. Fan, L., Song, J., Hildebrand, P.H., Forney, C.F. (2002) "Interaction of ozone and negative air ions to control micro-organisms" *Journal of Applied Microbiology* 93, 144-148.
31. Farmer, J.J., Kelly, M. (1991) "Enterobacteriaceae. In Manual of Clinical Microbiology" *Amer Society Microbiol.* 360 – 382.

32. Farmer, J.J. III, Davis, B., Hickman-Brenner et al. (1985) "Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens" J Clin. Microbiol. 21, 46 – 47.
33. Farmer, J.J. (2003) "*Enterobacteriaceae* : Introduction and Identification. In Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A., Tenover, R.H." Manual of clinical Microbiology, 8th edition ASM Press, Washington D.C.
34. Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., et al. (1985) "Pasteurised milk as a vehicle of infection an outbreak of listeriosis" N Engl. J Med. 312, 404 – 407.
35. Garcia, A., Mount, J.R., Davidson, P.M. (2003) "Ozone and chlorine treatment of minimally processed lettuce" Journal of Food Science 68(9), 2747 – 2751.
36. Gellin, B.G., Broome, C.V. (1989) "Listeriosis" J Am. Med. Assoc. 261, 1313 -1320.
37. Giron, J., Jones, T., Millan-Velasco, F., Castro-Munoz, E., Zarate, L., Fry, J., et al. (1991) "Diffuse – adhering Escherichia coli (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan Children in Mexico" J Infect. Dis. 163, 507 – 513.
38. Gomez, C., Moreira, R.G., Castell-Perez, E. (2011) "Radiosensitization of Salmonella spp. And Listeria spp. In Ready-to-Eat Baby Spinach Leaves" Journal of Food Science Vol.76, Nr 1.
39. Gordillo, M., Reeve, G., Pappas, J., Mathewson, J., Du Pont, H., Murray, B. (1992) "Molecular characterization of strains of enteroinvasive Escherichia coli 0143, including, isolates from a large outbreak in Houston, Texas" J Clin. Microbiol. 30, 889 – 893.

40. Guzel-Sedim, Z.B., Greene, A.K., Seydim, A.C. (2004) "Use of ozone in food industry" *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 37, 453-460.
41. Habibi Najafi, M.B., Haddad Khodaparast, M.H. (2009) "Efficacy of ozone to reduce microbial populations in date fruits" *Food Control* 20, 27-30.
42. Hoigne, J., Bader, H. (1983a) "Rate constants of reaction of ozone with organic and inorganic compounds in water – I. Non dissociating Organic Compounds" *Water Res.* 17, 173-183.
43. Hoigne, J., Bader, H. (1983b) "Rate constants of reaction of ozone with organic and inorganic compounds in water – II. Dissociating Organic Compounds" *Water Res.* 17, 185-194.
44. Inan, F., Pala, M., Doymaz, I. (2007) "Use of ozone in detoxification of aflatoxin B1 in red pepper" *Journal of Stored Products Research* 43, 425–429.
45. ISO (2008) "Sensory analysis –Vocabulary (ISO 5492)" International Organization for Standardization, Geneva (Switzerland).
46. ISO (2007) "Sensory Analysis. General guidance for the design of test rooms (ISO 8589)" International Organization for Standardization, Geneva (Switzerland).
47. ISO (2005) "Sensory Analysis. Methodology. General guidance (ISO 6658)" International Organization for Standardization, Geneva (Switzerland).
48. ISO (2004) "Sensory Analysis. Methodology. Triangle test (ISO 4120)" International Organization for Standardization, Geneva (Switzerland).

49. ISO (1994) “Sensory analysis – Methodology –Texture profile (ISO 11036)” International Organization for Standardization, Geneva (Switzerland).
50. Izumi, H. (2007) “Current status of the fresh-cut produce industry and sanitizing technologies in Japan proceedings of the International Conference on Quality Management of Fresh Cut Produce, Bangkok, Thailand” *Acta – Horticulture* 746, 45 – 52.
51. Karaka, H., Velioglu, Y.S. (2007) “Ozone Applications in Fruit and Vegetables Processing” *Food Reviews International* 23, 91-106.
52. Kells, A.S., Manson, L.J., Maier, D.E., Woloshuk, C.P. (2001) “Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize” *Journal of Stored Products Research* 37, 371-382.
53. Klockow, P.A., Keener, K.M., (2009) “Safety and quality of packaged spinach treated with a novel ozone-generation system” *LWT-Food and Technology* 42, 1047-1053.
54. Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P.H., McNeish, A.S. (1989) “Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells; the basis of a diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*” *Infect Immunol.* 57, 1290 – 1298.
55. Laureati, M., Morin-Audebrand, L., Paglianni, E., Sulmont-Rosse, C., Koster, E.P., Mojet, J. (2008) “Food memory and its relation with age and liking: An incidental learning experiment with children, young and elderly people” *Appetite* 51, 273 - 282.

56. Lawless, H.T., Heymann, H. (2003) “Sensory Evaluation of Food, Principles and Practices” 2nd Edition 57 – 76.
57. Le Minor, L. (1984) “Genus III Salmonella” In Bergey’s Manual 4th ed. Williams & Wilkins p. 427 – 458.
58. Le Minor, L. Veron, M., Popof M. (1982) “Taxonomie de Salmonella” Ann. Microbiol. 133B, 223 – 243.
59. Maki – Ikola, O., Leirisato – Repo, M., Kantele, A., Toivanen, P., Granfors, K. (1991) “Salmonella specific antibodies in reactive arthritis” J. Infect. Dis. 164, 1143 – 1148.
60. Martinez-Murcia, A. J, Beniloch, S., Collins, M.D. (1992) “Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing : lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations” Int J. Syst. Bacteriol.
61. Methodology of Health Protection Agency (HPA)
62. Meilgaard, C.M., Civille, V.G., Carr, T.B. (2007) “Sensory Evaluation Techniques” 1 – 25.
63. Moller, P., Wulff, C., Koster, E.P. (2004) “Do age differences in odor memory depend on differences in verbal memory?” Learning and memory 15(5), 915 - 917.
64. Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S., Pfaller, M.A. (1998) “*Enterobacteriaceae* in Medical Microbiology” Third edition, by Mosby Inc, Missouri.
65. Müller, H. E., Brenner, D. J., Fanning, G. R., Grimont, P. A. D., Kampfler, P. (1996) “Emended description of *Buttiauxella argestis* with recognition of six

new species of *Buttiauxella* and two new species of *Kluyvera*: *Buttiauxella ferragutiae* sp.nov, *Buttiauxella gagginiae* sp. No. *Buttiauxella brennerae* sp. nov, *Buttiauxella izardii* sp. nov, *Buttiauxella noackiae* sp. no., *Buttiauxella wormboldiae* sp. no. *Kluyvera cochleae* sp. nov. and *Kluyvera Georgiana* sp.”
Int J.Syst Bacteriology.

66. O' Hanley, P., Low, D., Romero, I., Lark, D., Vosti, K., Falkow, S., Schoolnick, G. (1985) “Gal-Gal binding and haemolysin phenotypes associated with uropathogenic *Escherichia coli*” N Engl. J Med. 313, 414 – 420.
67. O' Hara, C., Rhoden, D., Miller J. (1992) “Reevaluation of the API 20E identification system versus conventional biochemicals for identification of members of the Family Enterobacteriaceae: a new look at an old product” J. Clin. Microbiol. 30, 123 – 125.
68. Olmez, H., Akbas, M.Y. (2009) “Optimization of ozone treatment of fresh-cut green leaf lettuce” Journal of Food and Engineering 90, 487-494.
69. Ong, K.C., Cash, J.N., Zabik, M.J., Siddiq, M., Jones A.L. (1996) “Chlorine and ozone washes for pesticide removal from apples and processed apple sauce” Food Chemistry Vol. 55, No 2, 153-160.
70. Ozkan, R., Smilanick, J.L., Karabulut, O.A. (2011) “Toxicity of ozone gas to conidia of *Penicillium digitatum*, *Penicilium italicum* and *Botrytis Cinerea* and control of grax mold on table grapes” Postharvest Biology and Technology 60, 47-51.
71. Palou, L., Crisosto, C.H., Smilanick, J.L., Adaskaveg, J.E., Zoffoli, J.P. (2002) “Effects of continuous 0.3ppm ozone exposure on decay development and

- physiological responses of peaches and table grapes in cold storage”
Postharvest Biology and Technology 24, 39-48.
72. Perez, A.G., Sanz, C., Rios, J.J., Olias, R., Olias, J.M. (1999) “Effects of Ozone Treatment on Postharvest Strawberry Quality” J. Agric. Food Chem. 47, 1652-1656.
73. Rico, D., Martin-Diana, A.B., Barat, J.M., Barry-Ryan, C. (2007) “Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review” Trends in Food Science and Technology 18, 373-386.
74. Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargett, N.T., Blake, P.A, Cohen, M.L. (1983) “Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype” N Eng. J Med. 308, 681 – 685.
75. Rodoni, L., Casadei, N., Concellon, A., Chaves Alicia, A.R., Vicente, A.R. (2010) “Effects of Short-Term Ozone Treatments on Tomato (*Solanum lycopersium* L.) Fruit Quality and Cell Wall Degradation” J. Agric. Food Chem. 58, 594-599.
76. Ryan, K.J., (1990) “Corynebacteria and other aerobic facultative gram positive rods” In Medical Microbiology ed. J.C. Sheris, 313 – 323.
77. Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., et al. (1983) “Epidemic listeriosis. Evidence for transmission by food” N Engl. J Med. 308, 203 -206.

78. Selma, M.V., Beltran, D., Allede, A., Chacon-Vera, E. (2007) "Elimination by ozone of *Shigella sonnei* in shredded lettuce and water" *Food Microbiology* 24, 492-499.
79. Seow, J., Agoston, R., Phua, L., Yuk, H.G. (2012) "Microbiological quality of fresh vegetables and fruits in Singapore" *Food Control* 25, 39-44.
80. Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K., Strohshine, R.L. (2002) "Efficacy of Chlorine Dioxide, Ozone, and Thyme Essential Oil or a Sequential Washing in Killing *Escherichia coli* O157:H7 on Lettuce and Baby Carrots" *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 35, 720–729.
81. Smilanick, J.L, Crisosto, C., Mlikota, F. (1999) "Postharvest Use of Ozone on Fresh Fruit" *Perishables Handling Quarterly Issue*. No. 99.
82. Spica, J.S., Parsons, J.E., Nordenberg, D., Wells, J.G., Gunn R.A., Blake, P.A. (1994) "Hemolytic uremic syndrome and diarrhea associated with *Escherichia coli* O157:H7 in a day care center" *J Pediatr.* 109, 287 – 291.
83. Thaller, M., Dainelli, B., Berlutti, F., Schippa, S., Fontana, C., Pezzi, R. (1992) "Double sugar – tyrosine medium improves O – 1 phage *Salmonella* screening. *J. Clin. Microbiol.* 30, 533 – 534.
84. Tiwari, B.K., Muthukumarappan, K. (2012a) "Ozone in Food Processing" Blackwell Publishing Ltd, chapter 5, 67-68.
85. Tiwari, B.K., Muthukumarappan, K. (2012b) "Ozone in Food Processing" Blackwell Publishing Ltd, chapter 5, 69-70.

86. Trinetta, V., Vaidya, N., Linton, R., Morgan, M. (2011) “A comparative study on the effectiveness of chlorine dioxide gas, ozone gas and e-beam irradiation treatments for inactivation of pathogens inoculated onto tomato, cantaloupe and lettuce seeds” *International Journal of Food Microbiology* 146, 203-206.
87. Tzortzakis, N., Borland, A., Singleton., I., Barnes, J. (2007) “Impact of atmospheric ozone-enrichment on quality-related attributes of tomato fruit” *Postharvest Biology and Technology* 45, 317-325.
88. Tzortzakis, N., Taybi, T., Roberts, R., Singleton., I., Barland, A., Barnes, J. (2011) “Low-level atmospheric ozone exposure induces protection against *Botrytis Cinerea* with down regulation of ethylene-, jasmonate- and pathogenesis-related genes in tomato fruit” *Postharvest Biology and Technology* 61, 152-159.
89. Venta, M.B., Broche, S.S.C., Torres, I.F., Perez, M.G., Lorenzo, E.V., Rodriguez., Y.R., Cepero, S.M. (2010) “Ozone Application for Postharvest Disinfection of Tomatoes” *Science and Engineering* 32, 361-371.
90. Verhagen, J.V., Engelen, L. (2006) “The neurocognitive bases of human multimodal food perception: Sensory integration” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 30, 613 - 650.
91. Verhagen, J.V. (2007) “The neurocognitive bases of human multimodal food perception: Consciousness” *Brain Research Reviews* 53, 271 – 286.
92. Waites, K.B. (2002) “Manual of Commercial Methods of Clinical Microbiology” American Society for Microbiology Washington, D.C.
93. Xu, L., (1999) “Use of Ozone to Improve the Safety of Fresh Fruits and Vegetables” *Food Technology* vol.53, No. 10.

94. Yam, W.C., Lung M.L., Hon, N.G.M. (1992) "Evaluation of optimization of a Latex agglutination assay for detection of cholera toxin and Escherichia coli heat-labile toxin" *J Clin. Microbiol.* 30, 2518 – 2520.
95. Zhang, L., Lu, Z., Yu, Z., Gao, X. (2005) "Preservation of fresh-cut celery by treatment of ozonated water" *Food Control* 16 (2005) 279–283.

