

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

Μελέτη φυσιολογικών χαρακτηριστικών στελεχών του
μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* απομονωθέντων
από γαλακτοκομικές επιχειρήσεις

Χαραλαμπία-Ειρήνη Α. Μπέλεση

Διδακτορική διατριβή

Επιβλέπων
Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης, Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2014

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

Μελέτη φυσιολογικών χαρακτηριστικών στελεχών του
μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* απομονωθέντων
από γαλακτοκομικές επιχειρήσεις

Χαραλαμπία-Ειρήνη Α. Μπέλεση

Διδακτορική διατριβή

Επιβλέπων
Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης, Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2014

Μελέτη φυσιολογικών χαρακτηριστικών στελεχών του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* απομονωθέντων από γαλακτοκομικές επιχειρήσεις

Χαραλαμπία-Ειρήνη Α. Μπέλεση

Χημικός, Τμήμα Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Msc, Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου, ΓΠΑ

Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπων

Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης, Επίκουρος Καθηγητής
Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συμβουλευτική Επιτροπή

Γεώργιος- Ιωάννης Ε. Νυχάς, Καθηγητής
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ελευθέριος Χ. Δροσινός, Αναπληρωτής Καθηγητής

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μέλη

Πέτρος Σ. Ταούκης, Καθηγητής

Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων
Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο

Απόστολος Σ. Αγγελίδης, Επίκουρος Καθηγητής

Υγιεινή και Τεχνολογία του Γάλακτος και των Προϊόντων του
Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Ιωάννης Σ. Μποζιάρης, Επίκουρος Καθηγητής

Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών
Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αναστάσιος Ακτύπης, Λέκτορας

Εργαστήριο Γαλακτοκομίας
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Στους γονείς μου

Στη γιαγιά μου, Μέλπω

Thus, the task is, not so much to see what no one has yet seen; but to think what nobody has yet thought, about that which everybody sees.

Erwin Schrödinger

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων και Ποτών την περίοδο μεταξύ Ιουνίου 2007 και Ιουλίου 2010, με την χρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού προγράμματος Biotracer. Μέρος της, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων του ερευνητικού κέντρου Mooserpark, στην Ιρλανδία. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όσους με βοήθησαν τόσο κατά τη διάρκεια εκπόνησης του πειραματικού μέρους, όσο και κατά τη συγγραφή της διατριβής και ιδιαίτερα:

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Σκανδάμη για την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπό μου, την υποστήριξη και την καθοδήγηση σε όλες τις μικρές ή μεγάλες δυσκολίες κατά τη διάρκεια της διατριβής. Πάντα παρών, με καινοτόμο και συμβουλευτική ματιά με βοήθησε να εστιάσω στην ουσία των θεμάτων που πραγματεύτηκα με στόχο πάντα την πρακτικότητα και την καινοτομία. Η συμπεριφορά του ως καθηγητής αποτέλεσε το πρότυπο της δικής μου συμπεριφοράς προς τους φοιτητές με τους οποίους συνεργάστηκα.

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ελευθέριο Δροσινό, διευθυντή του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Νυχά, υπεύθυνο του προγράμματος Biotracer, για την ευκαιρία που μου προσέφεραν να πραγματοποιήσω την παρούσα διατριβή και την συνδρομή τους κατά την συγγραφή της.

Ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Καθηγητή κ. Π.Σ. Ταούκη, Επίκουρο Καθηγητή κ. Α.Σ. Αγγελίδη, Επίκουρο Καθηγητή κ. Ι. Μποζιάρη και Λέκτορα κ. Αν. Ακτύπη, για τα σχόλια και τις διευκρινήσεις τους.

Ευχαριστώ θερμά την Δρ. Αντωνία Γουναδάκη για την πολύτιμη συμβολή της στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή της διατριβής, καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου για την συνδρομή του στην κατανόηση της Μικροβιολογίας Πρόρρησης.

Ευχαριστώ θερμά τους διδακτορικούς, μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου, καθώς και το μόνιμο προσωπικό για την συμβολή τους τόσο σε ηθικό, όσο και σε πρακτικό επίπεδο στην ολοκλήρωση της διατριβής και κυρίως για την δημιουργία ενός φιλικού και δημιουργικού περιβάλλοντος εργασίας. Ιδιαίτερη μνεία θα ήθελα να κάνω στους Δρ. Νατάσα Καπετανάκου, Δρ. Σταύρο Μανιό και Δρ. Νικόλαο Ανδρίτσο για την άψογη συνεργασία και την φιλική τους αντιμετώπιση. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες μου τα μέλη του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας Τροφίμων για την πρακτική τους υποστήριξη.

Η παρούσα μελέτη δεν θα μπορούσε να ολοκληρώσει τους σκοπούς της χωρίς την συνδρομή των Σοφία Ποιμενίδου, Σοφία Μερκούρη, Σόνια Αραπάκη, Σοφία Πούχα, Έλενα Σταυροπούλου, Αφροδίτη Μακρυπούλια και Βάσω Σάτμαρη, τις οποίες ευχαριστώ θερμά.

Τέλος, θα ήθελα να αναφερθώ από καρδιάς εκφράζοντας αμέριστη ευγνωμοσύνη στην οικογένειά μου. Στους γονείς μου Αναστάσιο και Κυριακή, γιατί χάρη στην υποστήριξή τους είχα την δυνατότητα να ακολουθήσω τα όνειρά μου και τη γιαγιά μου Μέλπω, με την ακάματη βοήθεια της οποίας στα "καθημερινά" μπόρεσα να εστιάσω απρόσκοπτη στην έρευνά μου. Ευχαριστώ τις αδερφές μου Μένη και Ειρήνη, για την συμπαράστασή τους και τον σύντροφό μου Χρήστο, οποίος μοιράστηκε μαζί μου αυτή την πορεία και μου προσέφερε ηρεμία και ισορροπία για να συνεχίσω. Τους ευχαριστώ όλους για την αγάπη τους και τους αφιερώνω αυτή τη διατριβή.

Χαραλαμπία-Ειρήνη Α. Μπέλεση

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ABSTRACT	iv
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	vi
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	xii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Γαλακτοκομικά προϊόντα	1
1.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	5
1.3. Βιοϋμένια	22
1.4. Μικροβιολογία Πρόρρησης	26
1.5. Σκοπός	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΓΙΕΙΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΥΡΟΚΟΜΕΙΩΝ ΜΕΣΑΙΑΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥΣ	43
2.1. Εισαγωγή	43
2.2. Υλικά και μέθοδοι	45
2.3. Αποτελέσματα και συζήτηση	50
2.4. Συμπεράσματα	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΪΜΕΝΙΩΝ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ <i>Listeria monocytogenes</i> ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ ΑΝΟΞΕΙΔΩΤΟΥ ΧΑΛΥΒΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ ΣΕ ΑΠΟΛΥΜΑΝΤΕΣ	63
3.1. Σχηματισμός βιοϋμενίων της <i>Listeria monocytogenes</i> σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα σε δύο θερμοκρασίες παρουσία γαλακτοκομικών προϊόντων και προσδιορισμός της κινητικής των αποκολλημένων κυττάρων σε γάλα και κρέμα.	63
3.1.1. Εισαγωγή	63
3.1.2. Υλικά και μέθοδοι	65
3.1.3. Αποτελέσματα και συζήτηση	71
3.1.4. Συμπεράσματα	79
3.2. Ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων της <i>Listeria monocytogenes</i> σε πρακτικές εξυγίανσης.....	80
3.2.1. Εισαγωγή	80
3.2.2.Υλικά και Μέθοδοι	82
3.2.3. Αποτελέσματα και συζήτηση	86
3.2.4. Συμπεράσματα	94

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΟΡΙΩΝ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ <i>Listeria monocytogenes</i> ΣΕ ΥΓΡΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΚΑΙ ΣΕ ΓΑΛΑ ΚΑΤΑ ΤΑ ΠΡΩΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΤΥΡΟΚΟΜΗΣΗΣ	95
4.1 Εκτίμηση της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του πληθυσμού των κυττάρων της <i>Listeria monocytogenes</i> σε αιώρηση, αποκολλημένων από βιοϋμένια ή προσκολλημένων σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα, σε σχέση με το pH και το NaCl.....	95
4.1.1. Εισαγωγή.....	95
4.1.2. Υλικά και μέθοδοι	97
4.1.3. Αποτελέσματα και συζήτηση	103
4.1.4. Συμπεράσματα	112
4.2. Επίδραση του pH, της ενεργότητας ύδατος και του επιπέδου επιμόλυνσης στα όρια ανάπτυξης του πληθυσμού της <i>Listeria monocytogenes</i> σε πρότυπο τυρί, γάλα και υγρό θρεπτικό μέσο	113
4.2.1. Εισαγωγή.....	113
4.2.2. Υλικά και μέθοδοι	115
4.2.3. Αποτελέσματα και συζήτηση	120
4.2.4. Συμπεράσματα	130
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΟΞΙΝΗΣ ΚΑΙ ΩΣΜΩΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΕΚΑΤΕΡΩΘΕΝ ΤΗΣ ΔΙΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΗΣ <i>Listeria monocytogenes</i> ΣΤΗΝ ΜΕΤΕΠΕΙΤΑ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΟΥ	131
5.1. Εισαγωγή	131
5.2. Υλικά και μέθοδοι	134
5.3. Αποτελέσματα και συζήτηση	142
5.4. Συμπεράσματα	156
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ (ΛΟΓΩ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ) ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ <i>Listeria monocytogenes</i> ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΣΤΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΣΗ ΦΕΤΑΣ ΚΑΙ ΓΡΑΒΙΕΡΑΣ	157
6.1. Εισαγωγή	157
6.2. Υλικά και μέθοδοι	161
6.3. Αποτελέσματα και Συζήτηση	168
6.4. Συμπεράσματα	187
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	188
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	195
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ	225
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ- ΟΡΟΛΟΓΙΑ.....	228

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Υψηλό ποσοστό των θανατηφόρων κρουσμάτων παγκοσμίως, που σχετίζονται με την κατανάλωση τροφίμων και ιδιαίτερα γαλακτοκομικών προϊόντων, οφείλονται στον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*. Η γνώση της ικανότητας του παθογόνου να αυξάνεται ή να επιβιώνει στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι σημαντική για την αποτίμηση της επικινδυνότητας των εν λόγω τροφίμων, καθώς έτοιμα προς κατανάλωση (δεν αναμένεται θερμική επεξεργασία). Ανάμεσα στις παραμέτρους που επιδρούν στη συμπεριφορά της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα (όρια ανάπτυξης, επιβίωσης, κινητική ανάπτυξης/θανάτωσης), είναι η θερμοκρασία του περιβάλλοντος επεξεργασίας και αποθήκευσης, οι φυσικοχημικές παράμετροι των προϊόντων (pH, a_w), η τεχνολογία παρασκευής τους και η φυσιολογία των κυττάρων του παθογόνου. Στόχο της διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της συμπεριφοράς απομονωμένων από τυροκομεία στελεχών της *L. monocytogenes* σε γαλακτοκομικά προϊόντα και σε συνθήκες που απαντώνται στο περιβάλλον μιας γαλακτοβιομηχανίας ή ενός τυροκομείου κατά την παραγωγική διαδικασία.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έρευνα για την εκτίμηση της υγιεινολογικής κατάστασης των προϊόντων και των επιφανειών παραγωγής Ελληνικών τυροκομείων μεσαίας κλίμακας και του επιπολασμού της *L. monocytogenes*. Οι υψηλοί πληθυσμοί των μικροοργανισμών δεικτών που μετρήθηκαν, έδειξαν την ανάγκη βελτίωσης των διαδικασιών που ακολουθούνται από τις επιχειρήσεις κατά την παραγωγή προϊόντων και την εξυγίανση των επιφανειών. Ο επιπολασμός των παθογόνων μικροοργανισμών (*L. monocytogenes*, *Salmonella* spp, *S. aureus* και *E. coli* 0157:H7) βρέθηκε χαμηλός σε τρόφιμα, τα οποία όμως ήταν αυξημένης επικινδυνότητας (δηλ. μαλακά τυριά, γάλα, τυρόγαλα) και σε επιφάνειες επεξεργασίας που έρχονταν σε άμεση επαφή με αυτά (παγολεκάνες, καλούπι μυζήθρας). Τα αποτελέσματα της έρευνας τόνισαν την ανάγκη για τακτικό έλεγχο των επιχειρήσεων παραγωγής τροφίμων και των προμηθευτών τους.

Με σκοπό την προσομοίωση σεναρίων μεταφοράς του παθογόνου μικροοργανισμού (επιμόλυνση) από τις επιφάνειες επεξεργασίας στα τρόφιμα και το αντίθετο, έλαβαν χώρα πειράματα σχηματισμού, αποκόλλησης (μηχανικής ή ακούσιας [αυθόρμητης]) βιοϋμενίων της *L. monocytogenes* και κινητικής τους σε γάλα, κρέμα και γιαούρτι στους 5 και 20°C. Ως βέλτιστη θερμοκρασία σχηματισμού βιοϋμενίων αποδείχθηκαν οι 20°C και ως ευνοϊκότερα για μικροβιακή ανάπτυξη υποστρώματα το γάλα και η κρέμα. Στο γιαούρτι δεν σχηματίστηκαν μετρήσιμα βιοϋμένια, ωστόσο όταν μεταφέρθηκαν κουπόνια από το γιαούρτι σε φρέσκο γάλα και κρέμα παρατηρήθηκε εκούσια αποκόλληση κυττάρων και ανάπτυξη του παθογόνου. Η κινητική ανάπτυξης των πλαγκτονικών κυττάρων (δηλ. αυτών που ουδέποτε προσκολλήθηκαν σε μεταλλικές επιφάνειες) στα νέα υποστρώματα υπερέιχε αυτής των αποκολλημένων. Ακολούθησαν πειράματα

θερμικής επεξεργασίας και χημικής απολύμανσης βιοϋμενικών και πλαγκτονικών κύτταρων της *L. monocytogenes* με διαφορετική φυσιολογική κατάσταση με βάση την προσαρμογή τους σε όξινη καταπόνηση, προσομοιάζοντας συνθήκες που δύναται να απαντηθούν στη βιομηχανία. Παρατηρήθηκε διαφορετική ικανότητα επιβίωσης του παθογόνου, ανάλογα με το είδος και τον χρόνο εφαρμογής του απολυμαντικού, τις συνθήκες σχηματισμού των βιοϋμενίων (pH, a_w , T, χρόνος) και το είδος των κυττάρων. Τα αποτελέσματα συνεισφέρουν στην υπάρχουσα γνώση για την ανθεκτικότητα του παθογόνου έναντι των μεθόδων απολύμανσης και των ευρέως χρησιμοποιούμενων απολυμαντικών ουσιών με την συγκριτική θεώρηση βιοϋμενίων και πλαγκτονικών κύτταρων.

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι συνθήκες που επιτρέπουν την αύξηση προσκολλημένων, αποκολλημένων και πλαγκτονικών κυττάρων της *L. monocytogenes* σε περίπτωση που αυτός βρεθεί σε υγρό θρεπτικό μέσο, γάλα και φρέσκο τυρί. Οι παράγοντες που εξετάστηκαν ήταν η οξύτητα και η αλατότητα του υποστρώματος και το επίπεδο επιμόλυνσης. Βρέθηκε ότι τα πλαγκτονικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχύτερα και έχουν υψηλότερη πιθανότητα ανάπτυξης σε δυσμενείς συνθήκες και χαμηλά επίπεδα επιμόλυνσης, σε σχέση με τα αποκολλημένα και τα προσκολλημένα κύτταρα. Σε υψηλά επίπεδα επιμόλυνσης και σε συνθήκες που πλησιάζουν τις άριστες αμβλύθηκαν οι διαφορές μεταξύ των τριών ειδών κυττάρων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα όρια ανάπτυξης σε φρέσκο τυρί και σε γάλα ήταν μετατοπισμένα προς τις άριστες συνθήκες σε σχέση με αυτά σε υγρού μέσου (TSBYE). Η χρήση ενός υγρού και ενός στερεού τροφίμου στη μελέτη, οδήγησε σε ακριβέστερη περιγραφή της πιθανότητας ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, καθώς συμπεριέλαβε την αυξημένη παραλλακτικότητα της συμπεριφοράς του παθογόνου στο περιβάλλον τροφίμων με διαφορετικά ρεολογικά χαρακτηριστικά.

Ακολούθως, μελετήθηκε η κινητική ανάπτυξης του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε συνθήκες προσομοίωσης μιας διασταυρούμενης επιμόλυνσης στο περιβάλλον ενός τυροκομείου, μέσω της μεταφοράς του μικροοργανισμού σε υποστρώματα με διαφορετικές τιμές pH ή a_w . Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων (Q) της *L. monocytogenes* στις εξεταζόμενες συνθήκες. Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης προσαρμόστηκε άμεσα στο νέο περιβάλλον, ανεξάρτητα από την προϋστορία των κυττάρων. Αντίθετα, η φάση προσαρμογής του παθογόνου επηρεάστηκε τόσο από την διεύθυνση όσο και από το εύρος των μεταβολών, ιδιαίτερα στις μεταβολές αλατότητας. Με την τροποποίηση του κλασσικού μοντέλου Baranyi βάση των αποτελεσμάτων, ώστε να περιλαμβάνει τόσο την μεταβολή της φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων (Q) σε καταστάσεις μη ανάπτυξης, όσο και το έργο προσαρμογής τους σε νέο περιβάλλον με συνθήκες που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του μικροβίου, προβλέφτηκε με ακρίβεια η συμπεριφορά του παθογόνου κατά την διάρκεια δυναμικών συνθηκών

οξύτητας ή αλατότητας σε γάλα. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι κατά την επιβίωση του παθογόνου σε συνθήκες μη ανάπτυξης, λαμβάνουν χώρα διεργασίες προσαρμογής ή τραυματισμού σε επίπεδο κυττάρου, οι οποίες επηρεάζουν την συμπεριφορά του όταν βρεθεί εκ νέου σε περιβάλλον ανάπτυξης, μέσω διασταυρούμενης επιμόλυνσης των τροφίμων.

Τέλος, με βάση τη γνώση που αποκτήθηκε από τα προηγούμενα πειράματα, μελετήθηκε η συμπεριφορά στελεχών της *L. monocytogenes* με διαφορετική φυσιολογία, όταν αυτά βρεθούν σε παστεριωμένο γάλα, τυρόπηγμα και νωπό τυρί, κατά τη διάρκεια τυροκόμησης και ωρίμασης Φέτας και Γραβιέρας. Πρωτίστως το στάδιο επιμόλυνσης και δευτερευόντως η τεχνολογία παρασκευής επηρέασαν σημαντικά την πιθανότητα ανάπτυξης και την κινητική του παθογόνου στα δύο τυριά. Σημαντικό ρόλο στην τεχνολογία της Γραβιέρας διαδραμάτισε η αναθέρμανση του πήγματος, αποτρέποντας την ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά τα πρώτα στάδια της τυροκόμησης. Η φυσιολογία των κυττάρων, όπως διαμορφώθηκε από βραχεία ή μακροχρόνια έκθεσή τους σε υποθανάτιες ή θανατηφόρες συνθήκες αλατότητας και οξύτητας, ανάλογα με το στάδιο της τυροκόμησης που έλαβε χώρα ο ενοφθαλμισμός, καθόρισε την κινητική τους. Συγκεκριμένα διακρίθηκαν συνθήκες που ευνοούσαν την ανάπτυξη (ενοφθαλμισμός μετά την παστερίωση) ή τη θανάτωση (ενοφθαλμισμός μετά την πρώτη ωρίμαση) του μικροοργανισμού. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι απαιτείται μεγαλύτερη προσοχή στα πρώτα στάδια της τυροκόμησης, καθώς η επιμόλυνση των προϊόντων ακόμα και με χαμηλούς πληθυσμούς της *L. monocytogenes*, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή τυριών με υψηλούς πληθυσμούς του παθογόνου. Συμπερασματικά, η γνώση της συμπεριφοράς της *L. monocytogenes* κατά μήκος της γραμμής παραγωγής και διάθεσης των γαλακτοκομικών προϊόντων μπορεί να βοηθήσει στην ορθότερη αποτίμηση της επικινδυνότητάς τους και την ευκολότερη διερεύνηση των πηγών επιμόλυνσης κατά τις επιδημιολογικές μελέτες.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία Τροφίμων, Υγιεινή Τροφίμων, Μικροβιολογία Πρόρρησης

Λέξεις κλειδιά: *Listeria monocytogenes*, γαλακτοκομικά προϊόντα, τυροκομεία, φυσιολογία, δειγματοληπτική έρευνα, βιοϋμένια, σχηματισμός, ανθεκτικότητα, κινητική ανάπτυξης, πιθανότητα ανάπτυξης, μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης, τυροκομήσεις, Φέτα, Γραβιέρα

ABSTRACT

Study of the physiological characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated from dairy plants

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen involved in numerous outbreaks with high fatality rates, many of them associated with dairy products. Dairy products are commonly ready-to-eat (RTE) food and the evaluation of their ability to support growth of the pathogen is crucial for risk assessment. Important factors that affect the behavior of *L. monocytogenes* in food (kinetics, growth interface, etc) are their intrinsic physicochemical parameters (pH, a_w), the environmental parameters (T, atmosphere), the production procedure and the physiology of pathogen's cells. The aim of the study was to evaluate the behavior of *L. monocytogenes* cells isolated from the environment and products of cheese factories in situations that occur during cheesemaking in a typical dairy plant.

A survey of the surfaces and products of 6 Greek dairy plants was conducted during 2007-2009 for the occurrence of *L. monocytogenes*, as well as other foodborne pathogens and indicators. It resulted in 4 *L. monocytogenes* isolates (1%), 8 *Listeria sp* isolates (2%) and 4 *Salmonella spp.* isolates (4,5%). Additionally, 5,1% and 8,9% of tested samples were found above detection limit for *S. aureus* and *E. coli* respectively. The overall results suggest that there is a window of improvement, in order for them to meet the limits of European regulation 1441/2007. Furthermore, the results stress the need of constant audit of the producers and their suppliers.

In the following experiments, the ability of the pathogen to form biofilms on soiled stainless steel surfaces (milk, custard and yogurt) and then detach (mechanically or voluntary) and grow in a new environment was evaluated, in correlation with the cells physiology and the environmental conditions. Better attachment of the cells was found in milk and cream at 20°C, even though their kinetics in milk at 5°C was slower of those formed at 5°C. In yogurt no countable attachment of cells was measured but when the coupons transferred in milk and cream, growth occurred after 7 days of incubation. The commonly used methods of cleaning and disinfection evaluated in this study, including chlorine solution, peracetic acid and QAC, on *L. monocytogenes* cells with different history (pH, a_w , T) resulted in different survival levels of the pathogen depending on its physiology and the disinfection procedure. The results contribute to the knowledge on *L. monocytogenes* resistance against disinfection, with the comparative study of biofilms and planktonic cells.

Moreover, the probability of growth initiation of *L. monocytogenes* in TSBYE, milk and fresh cheese, depending on inoculum size, physiological state, pH and a_w of substrate was evaluated by using logistic regression models. At low inoculation levels biofilms and detached cells interface was towards more favorable conditions than the interface of planktonic cells. At higher inoculums both

planktonic and detached cells had similar probabilities of growth. At the comparison between the three substrates, growth boundaries of fresh cheese were the highest (higher a_w , pH), followed by the ones of milk and TSBYE, which stressed the importance of model validation on food substrates of different rheological properties.

The effect of acid and osmotic shifts within the range of pH and a_w levels that allow growth of *L. monocytogenes* after habituation at no-growth conditions and shift to growth-permitting conditions was evaluated on the growth of the pathogen at 10°C. Maximum specific growth rate of *L. monocytogenes* was adapted quickly to the new environment while the lag time of the organism increased with all osmotic downshifts, as well as by the reduction of pH to 5.1. Extended habituation at no-growth conditions results suggest that there is an adaptation or injury rate induced at conditions inhibiting the growth of the pathogen depending on the condition. The modified Baranyi model, to include the results of the present study, proved suitable to describe the effect of acid and osmotic shifts in the kinetics of *L. monocytogenes* in milk.

Finally, the effect of the contamination stage and cell physiology on *L. monocytogenes* behavior during production and ripening of Graviera and Feta cheese was evaluated. *L. monocytogenes* cells inoculated in pasteurized milk managed to grow during the first days of production of both cheeses, at high level of (10^{6-7} CFU/g). Conversely, inoculation during curd section at Graviera lead to prolonged survival of the pathogen at 10^3 CFU/g. In both cheeses TSBYE biofilms and milk planktonic cells survived longer than other inoculum preparations. The cells that originated from TSBYE and milk, reached higher concentration than those originated from the Graviera and Feta cheese. The results may address safety implications relevant to the adaptive responses of *L. monocytogenes* in a dairy processing environment and their ability to survive and proliferate in dairy products, which might pose risks to public health. In conclusion, knowledge of *L. monocytogenes* behavior during production and distribution of dairy products may assist in quantitative risk assessment and biotraceability, through association of an epidemic strain with its source (i.e., source attribution based on downstream information). Such knowledge may further be useful in systematic epidemiological investigations.

Scientific Field: Food Microbiology, Food Hygiene, Predictive Microbiology

Key words: *Listeria monocytogenes*, dairy plants, dairy products, physiology, survey, biofilms, formation, resistance, growth kinetics, probability of growth, predictive modeling, cheese manufacturing, Feta, Graviera

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1.1.** (α) Φυλογενετικό δένδρο του γένους *Listeria* βασισμένο στα 16S και 23S rRNA, *iap*, *prs*, *vicB* και *ldh*. Τα κόκκινα είδη εμφανίζουν παθογένεια, ενώ τα μπλε έχουν χαρακτηριστεί ως μη παθογόνα. (β) Εικόνα μικροσκοπικού ανοσοφθορισμού ενός μολυσμένου μικροφάγου με το άγριο στέλεχος EGD-e (μεγέθυνση x63, **Hain et al., 2006**)..... 6
- Σχήμα 1.2.** (α) Σχηματική απεικόνιση του ενδοκυτταρικού κύκλου ζωής της *L. monocytogenes*, των παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με διαδικασία της κυτταρικής εισβολής και λοίμωξης και (β) του συμπλέγματος των παθογόνων γονιδίων της *L. monocytogenes* EGD-e και των ομολόγων του στο γένος *Listeria*. Τα γονίδια του ίδιου χρώματος έχουν >50% ομοιότητα, με βάση την ανάλυση blastp και >75% κάλυψη στο μέγεθος των πρωτεϊνών (**Hain et al., 2006**) 11
- Σχήμα 1.3.** Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών που ενεργοποιούνται, με σκοπό την προστασία του κυττάρου, παρουσία διαφορετικών καταπονήσεων (**Hill et al., 2002**). 15
- Σχήμα 1.4.** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φυσιολογικών καταστάσεων ενός μικροβιακού κυττάρου, όταν αυτό υποβάλλεται σε διάφορες καταπονήσεις (stresses, **Yousef και Courtney, 2003**) 17
- Σχήμα 1.5.** Τρόπος σχηματισμού των βιοϋμενίων στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα. Αρχικά, οργανικά μόρια τροφίμων αποτίθενται στην επιφάνεια του εξοπλισμού σχηματίζοντας ένα υπόστρωμα, στο οποίο προσκολλούνται οι μικροοργανισμοί. Μετά από κύκλους καθαρισμού κι απολύμανσης, τα κύτταρα που παραμένουν πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν αρχικά την μικροαποικία και στη συνέχεια, μέσω έκφρασης γονιδίων και κυτταρικής επικοινωνίας, το βιοϋμένιο (**Shi και Zhu, 2009**)..... 23
- Σχήμα 1.6.** Εικόνες από την ανάλυση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) του στελέχους *L. monocytogenes* M39503A (υψηλή ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου) σε επιφάνεια ανοξειδωτού χάλυβα (α) και PVC (γ) και του στελέχους *L. monocytogenes* M35584A (χαμηλή ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου) σε επιφάνεια ανοξειδωτού χάλυβα (β) και PVC (δ, **Borucki et al., 2003**). 24
- Σχήμα 1.7.** Καμπύλη μικροβιακής ανάπτυξης βασισμένη στο μοντέλο Baranyi και Roberts (1994), όπου μ_{max} είναι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (1/χρόνος), λ είναι η διάρκεια της φάσης προσαρμογής (χρόνος) και h_0 είναι η μετασχηματισμένη παράμετρος της φυσιολογικής κατάστασης (**McKellar και Lu, 2004**)..... 30
- Σχήμα 1.8.** Τυπικές καμπύλες θανάτωσης των μικροοργανισμών. 1. Γραμμική, 2. Γραμμική με ουρά, 3. Γραμμική με ώμο και ουρά, 4. Γραμμική με ώμο. 5. Διφασική, 6. Κυρτή, 7. Διφασική με ώμο, 8. Κοίλη (**Geeraerd et al., 2005**). 31
- Σχήμα 1.9.** Επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό ανάπτυξης του *Listeria*, όπως έχει εξαχθεί από το μοντέλο των θεμελιωδών παραμέτρων (Cardinal Parameters Model, CPM, **Le Marc et al., 2002**). 33
- Σχήμα 1.10.** Δυσδιάστατη (α) και τρισδιάστατη (β) απεικόνιση των ορίων ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, μετά από προσαρμογή ενός Πολυωνυμικού μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης (OLRM) στα πειραματικά δεδομένα ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του παθογόνου, συναρτήσεως των pH, ενεργότητας ύδατος και συγκέντρωσης οξικού οξέος. Οι γραμμές (2D) και οι επιφάνειες (3D) που εμφανίζονται στα σχήματα, αντιστοιχούν σε πιθανότητες $p=0.9$ (- ή χαμηλότερη επιφάνεια), σε

$p=0.5$ (- - ή μεσαία επιφάνεια), και $p=0.1$ (··· ή ανώτερη επιφάνεια), ενώ τα δεδομένα αντιστοιχούν σε πιθανότητες: $p=0$ (○), $p=1$ (+), $p \in]0, 1[$ (△) (Gysemans et al., 2007)..... 35

Σχήμα 1.11. Σχηματική απεικόνιση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *L. monocytogenes* υπολογισμένο από μοντέλο που συνυπολογίζει την αλληλεπίδραση επίδραση μεταξύ των ελαχίστων θεμελιωδών τιμών, συναρτήσει της θερμοκρασίας και του pH (Augustin και Carlier, 2000). 37

Σχήμα 1.12. Σχηματική αναπαράσταση της θεωρητικής βάσης των πειραμάτων της διατριβής 41

Σχήμα 2.1. Πληθυσμοί της μικροβιακής χλωρίδας (μέσος όρος log CFU/ml ή g) των υπό εξέταση αρχικών, ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων, στα διαφορετικά στάδια της παραγωγικής διαδικασίας. Στο σχήμα απεικονίζονται οι μέσες τιμές της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (■, PCA), τα κολοβακτηρίδια (■, CCA), το E. Coli (■, TBX), οι ζύμες και οι μύκητες (■, YGCA) και το pH (-)..... 52

Σχήμα 2.2. Πληθυσμοί της μικροβιακής χλωρίδας (μέσος όρος log CFU/cm²) των υπό εξέταση επιφανειών, στα διαφορετικά στάδια της παραγωγικής διαδικασίας Στο σχήμα απεικονίζονται οι μέσες τιμές της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (■, PCA), τα κολοβακτηρίδια (■, CCA), το E. Coli (■, TBX), οι ζύμες και οι μύκητες (■, YGCA)..... 53

Σχήμα 2.3. Ποσοστιαία (%) κατανομή των πληθυσμών των μικροοργανισμών επί του συνόλου των δειγμάτων προϊόντων που εξετάστηκαν. Στο σχήμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα για την ολική μεσόφιλη χλωρίδα (■, PCA), τα ολικά κολοβακτηρίδια (■, CCA), το E. Coli (■, TBX), τις ζύμες και τους μύκητες (■, YGCA) και τα εντεροβακτήρια (■, VRBGA). 56

Σχήμα 2.4. Ποσοστιαία (%) κατανομή των πληθυσμών των μικροοργανισμών επί του συνόλου των δειγμάτων επιφανειών που εξετάστηκαν. Στο σχήμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα για την ολική μεσόφιλη χλωρίδα (■, PCA), τα ολικά κολοβακτηρίδια (■, CCA), το E. Coli (■, TBX), τις ζύμες και τους μύκητες (■, YGCA) και τα εντεροβακτήρια (■, VRBGA). 57

Σχήμα 2.5. Συμπεριφορά κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, α) και την ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (PFGE, β) των απομονώσεων της *L. monocytogenes* από τις επιφάνειες και το προϊόν του T1 (Πιν. 2.1.). Για την PCR, τα στελέχη προετοιμάζονταν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους D'Agostino et al. (2004), με την χρήση των εκκινητών LIP1 και LIP2. Στην PFGE τα στελέχη που εμφανίζονται επεξεργάστηκαν με τα ένζυμα *ApaI* και *AscI* (Kagkli et al., 2009). Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης ήταν 6 V, με παλμούς που κυμαίνονταν από 4 μέχρι 40" για 18 ώρες. Οι αριθμοί στα αριστερά υποδεικνύουν τα κατά προσέγγιση μεγέθη DNA όπως έχουν προσδιοριστεί από τον δείκτη μοριακού βάρους. Στήλες PCR: λ: δείκτης μοριακού βάρους (1 & 15), αρνητικό πρότυπο (ύδωρ, 2), 1: Δάπεδο (πλακάκια υγιεινής), 2: Μεταλλική επιφάνεια πιεστηρίου, 3: Απόβλητα ξεπλύματος, 4: Ανθότυρο, Lm: Πρότυπο στέλεχος *Listeria monocytogenes* Scott A. Στήλες PFGE: λ: δείκτης μοριακού βάρους, 5: στέλεχος *Salmonella* (*XbaI*), 1: Δάπεδο (πλακάκια υγιεινής), 2: Μεταλλική επιφάνεια πιεστηρίου, 3: Απόβλητα ξεπλύματος, 4: Ανθότυρο..... 60

Σχήμα 3.1.1. Πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* (■) και ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (■) σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα (log CFU/cm²) ή των σε αιώρηση κυττάρων *Listeria monocytogenes* (■) και ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (■) (log CFU/ml ή log CFU/γ) σε γάλα, κρέμα βανίλιας και γιαούρτι, μετά από επώαση στους 5 και τους 20°C για 7 ημέρες. Οι μέσες τιμές που μοιράζονται τουλάχιστον ένα γράμμα δεν είναι στατιστικώς διαφορετικές ($P \geq 0.05$). *:Κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (1.3 Log CFU/cm²). 72

Σχήμα 3.1.2. Συγκριτική ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε γάλα στους 5°C, κατόπιν μεταφοράς αποκολλημένων από κουπόνια ΑΧ (**α**) ή πλαγκτονικών (**β**) κυττάρων του, σχηματισμένων σε κρέμα (τριγωνικά σύμβολα) και γάλα (τετράγωνα σύμβολα) στους 5°C (ανοιχτά σύμβολα) και 20°C (κλειστά σύμβολα). Τα σύμβολα του σχήματος αντιπροσωπεύουν σχηματισμό βιοϋμενίου ή παρατεταμένη έκθεση πλαγκτονικών κυττάρων στις εξής συνθήκες: Γάλα 5°C (□), γάλα 20°C (■), κρέμα 5°C (Δ) και κρέμα 20°C (▲). (n=4)..... 76

Σχήμα 3.1.3. Πληθυσμός της *L.monocytogenes* σε γάλα (■) και κρέμα βανίλιας (▲) στους 5°C, μετά από εκούσια αποκόλληση κυττάρων του, από επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα, εξοικειωμένων σε γιαούρτι για 7 ημέρες στους 5°C. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν σημεία δειγματοληψίας στα οποία ο πληθυσμός βρέθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (1 log CFU/ml και 2 log CFU/γ, για το γάλα και την κρέμα αντίστοιχα) με την κλασσική μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης. Οι γραμμές τυπικών σφαλμάτων αντιπροσωπεύουν τυπικές αποκλίσεις από τέσσερις επαναλήψεις (n=4). 77

Σχήμα 3.1.4. Μικροσκοπική απεικόνιση (φωτογραφίες) των βιοϋμενίων της *L. monocytogenes* σχηματισμένων σε μεταλλικές επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα σε γιαούρτι στους 5°C για 7 ημέρες, μετά από μεταφορά τους σε γάλα (**α**) και κρέμα (**β**) ή ως είχαν (**γ, δ**). Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή, έπειτα από χρώση των επιφανειών με πορτοκαλί της ακριδίνης (1%) και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού (Μεγέθυνση 40 φορές). 78

Σχήμα 3.2.1. Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού σχεδιασμού. Προσκολλημένα κύτταρα (βιοϋμένια) του *L.monocytogenes*, σχηματισμένα σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα, σε TSBYE διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0.5, 7.5 και 9.5%), ή τιμών pH 7.0 και 5.0, υποβλήθηκαν σε θερμική επεξεργασία ή χημική απολύμανση. Cl⁻: Χλωρίνη, PAA: διάλυμα υπεροξικού οξέως, QAC: διάλυμα τεταρτοταγών ενώσεων του αμμωνίου 85

Σχήμα 3.2.2. Πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων (βιοϋμένια) της *L. monocytogenes* σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα, σχηματισμένων σε TSBYE με τρεις συγκεντρώσεις NaCl; 0.5% (■), 7.5% (■) και 9.5% (■), μετά από παραμονή στους (**α**) 5°C για 19 ημέρες και (**β**) στους 20°C για 12 ημέρες, ως είχαν (Μάρτυρες), μετά από θερμική επεξεργασία (60°C, 20 λεπτά) και μετά από απολύμανση με υπεροξικό οξύ (PAA 2%) για 1, 2, 3 και 6 λεπτά. Οι μέσες τιμές μεταξύ κάθε επεξεργασίας που μοιράζονται τουλάχιστον ένα γράμμα δεν είναι στατιστικώς διαφορετικές (P≥0.05). ΔΑ: Δεν Ανιχνεύτηκαν (<0.30 log CFU/cm²)..... 88

Σχήμα 3.2.3. Πληθυσμός των πλαγκτονικών και βιοϋμενικών οξεοανθεκτικών (ΟΑ, **β, δ**) και μη (ΜΑ, **α, γ**) κυττάρων της *L. monocytogenes* σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα σχηματισμένων σε TSBYE με pH 7.0 (**α, β**) ή pH 5.0 (**γ, δ**) στους 4°C, ως είχαν (Μάρτυρες), ή μετά από επεξεργασία με νερό (25°C), χλωρίνη (Cl⁻, 0.465%), υπεροξικό οξύ (PAA, 2%) και ενώσεις του τεταρτοταγούς αμμωνίου (QAC, 1%), για 6 λεπτά. Οι μέσες τιμές των πλαγκτονικών κυττάρων που μοιράζονται τουλάχιστον ένα κοινό κεφαλαίο γράμμα ή των βιοϋμενίων που μοιράζονται τουλάχιστον ένα πεζό γράμμα είναι στατιστικώς όμοιες (P≥0.05). ΔΑ: Δεν Ανιχνεύτηκαν (<0.30 log CFU/cm²). 92

Σχήμα 4.1.1. Συμπεριφορά κατά την ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (PFGE) των απομονώσεων της 30^{ns} ημέρας της μελέτης και των τριών αρχικών στελεχών της *L. monocytogenes* επεξεργασμένα με το ένζυμο *AraI*. Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης ήταν 6 V, με παλμούς που κυμαίνονταν από 4 μέχρι 40^{..} για 18 ώρες. Οι αριθμοί στα αριστερά υποδεικνύουν τα κατά προσέγγιση μεγέθη DNA όπως έχουν προσδιοριστεί από τον δείκτη μοριακού βάρους (lambda viii

DNA sizing ladder, Low range PFG, New England Biolab, Ipswich, MA, ΗΠΑ). Στήλες: **1 & 30**, δείκτης μοριακού βάρους, **2 & 15**, στέλεχος *Salmonella* (*Xba*I), **3**, απομόνωση τυριού 6179, **4**, απομόνωση επιφανειών C5, **5**, Scott A, **6-14 & 16-29**: στελέχη απομονωμένα από τις αντίστοιχους συνδυασμούς pH- a_w που αναγράφονται στο σχήμα. 106

Σχήμα 4.1.2. Τυπικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης (ordinary logistic regression model) προσαρμοσμένο στα αποτελέσματα ανάπτυξης/ μη ανάπτυξης των πλαγκτονικών (*ΠΚ*, α και γ) και αποκολλημένων (*ΑΚ*, β και δ) κυττάρων της *L. monocytogenes* cells στις περιπτώσεις με αρχική συγκέντρωση 10^3 CFU/ml (α και β) και 10^1 CFU/ml (γ και δ), σε συνδυασμό με τις τιμές pH και a_w στους 10°C . Οι γραμμές που εμφανίζονται χωρίζουν τα σχήματα στα εξής επιμέρους τμήματα σε σχέση με την πιθανότητα ανάπτυξης: ανώτερη διακεκομμένη $p=0.9$, μεσαία συνεχής $p=0.5$ και κατώτερη διακεκομμένη $p=0.1$. Σύμβολα δεδομένων: $p=0$ (\circ), $p=0.33$ (Δ), $p=0.66$ (\blacktriangle) και $p=1$ (\bullet), υπολογισμένα από το ποσοστό των επαναλήψεων που εμφάνισε ανάπτυξη. 107

Σχήμα 4.1.3. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες της πιθανότητας οποιουδήποτε κυττάρου της *L. monocytogenes* να ξεκινήσει να αυξάνεται σε όλους τους συνδυασμούς ενεργότητας ύδατος με pH 5.9 (α , β) και 5.2 (γ , δ) για τα πλαγκτονικά (*ΠΚ*, α και γ) και τα αποκολλημένα (*ΑΚ*, β και δ) κύτταρα στους 10°C σε 30 ημέρες..... 110

Σχήμα 4.1.4. Επίπεδα μέγιστης πιθανότητας ανάπτυξης (P_{max} ; %) που έφτασε ένα μεμονωμένο πλαγκτονικό (α , *ΠΚ*) ή αποκολλημένο (β , *ΑΚ*) κύτταρο της *L. monocytogenes* στους 10°C σε κάθε μία από τις εξεταζόμενες συνθήκες pH και a_w 111

Σχήμα 4.1.5. Χρόνος σε ημέρες (t_{50}) που χρειάζεται ένα μεμονωμένο πλαγκτονικό (α , *ΠΚ*) ή αποκολλημένο (β , *ΑΚ*) κύτταρο της *L. monocytogenes* να φτάσει το μισό της μέγιστης πιθανότητας ανάπτυξης ($P_{max}/2$) στους 10°C σε κάθε μία από τις εξεταζόμενες συνθήκες pH και a_w 111

Σχήμα 4.2.1. Επίδραση της ενεργότητας ύδατος στην λογαριθμική μεταβολή του πληθυσμού της *L. monocytogenes* στο (α) χαμηλό και (β) υψηλό επίπεδο επιμόλυνσης, όπου $\Delta \log \text{CFU/gdw}$ είναι η διαφορά των λογαρίθμων του πληθυσμού της *L. monocytogenes* στην αρχή και το τέλος της τυροκόμησης ($\log t_0 - \log t_8$) και a_w οι τιμές αντιστοιχούν στην τελική μέτρηση της ενεργότητας ύδατος των δειγμάτων (t_8)..... 122

Σχήμα 4.2.2. Πρόβλεψη πιθανότητας ανάπτυξης της *L. monocytogenes* σε συνάρτηση με την ενεργότητα ύδατος, σε (α) pH 6.5 και πληθυσμό 0.6 (— — —), 2 (-----) και 3 (---) $\log \text{CFU/gdw}$ ή σε (β) πληθυσμό 1 $\log \text{CFU/gdw}$ και pH 6.5 (— — —), 6.1 (-----), 5.9 (---) και 5.6 (----).... 124

Σχήμα 4.2.3. Μη γραμμικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης (non linear logistic regression model) προσαρμοσμένο στα αποτελέσματα ανάπτυξης/ μη ανάπτυξης της *L. monocytogenes* σε φρέσκο τυρί (α και β), γάλα (γ και δ) και TSB (ϵ και σ) με αρχικούς πληθυσμούς 10^1 CFU/gdw (α , γ , ϵ) και 10^2 CFU/gdw (β , δ , σ), σε συνδυασμό με τις τιμές pH και a_w στους 30°C . Οι γραμμές που εμφανίζονται χωρίζουν τα επιμέρους σχήματα στα εξής τμήματα σε σχέση με την πιθανότητα ανάπτυξης: ανώτερη διακεκομμένη $p=0.9$, μεσαία συνεχής $p=0.5$ και κατώτερη διακεκομμένη $p=0.1$. Σύμβολα δεδομένων: $p=0$ (\circ), $p=0.33$ (Δ), $p=0.5$ (+) $p=0.66$ (\times), $p=0.83$ ($*$) και $p=1$ (\bullet), υπολογισμένα από το ποσοστό των επαναλήψεων που εμφάνισε ανάπτυξη. 127

Σχήμα 5.1. Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού σχεδιασμού (α) και της πειραματικής διαδικασίας (β). Τα βέλη στο σχήμα α δείχνουν τις μεταβολές σε όλες τις 6 τιμές pH ή τις 4 τιμές a_w , που αναφέρονται κάθετα, η διαδικασία των οποίων περιγράφεται στο σχήμα β και ακολουθεί

επώαση στους 10°C. Οι περιπτώσεις αριστερά των τιμών στο κάθετο παραλληλόγραμμα αντιπροσωπεύουν μεταβολές μεταξύ των συνθηκών ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, ενώ οι περιπτώσεις στα δεξιά αντιπροσωπεύουν την παρατεταμένη έκθεση του παθογόνου σε συνθήκες μη ανάπτυξης (pH 4.9 ή a_w 0.90) για 1, 5 και 10 ημέρες και την μεταφορά του σε συνθήκες ανάπτυξης, όπως απεικονίζεται στο γράφημα..... 135

Σχήμα 5.2. Θεωρητική βάση της τροποποίησης του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi. Στο σχήμα περιγράφεται η διαφοροποίηση της ποσοτικοποίησης της φυσιολογικής κατάστασης του κυττάρου (Q), ανάλογα με συνθήκες του περιβάλλοντος. Με την διακεκομμένη γραμμή συμβολίζεται η μεταβολή της οξύτητας του μέσου από μία τιμή μη ανάπτυξης (2) σε τιμή ανάπτυξης (3)..... 141

Σχήμα 5.3. Καμπύλες ανάπτυξης της *L. monocytogenes* στους 10°C σε μεταβολές από **α)** pH ανάπτυξης (6.0, 5.5 και 5.1) σε όλα τα pH ανάπτυξης, **β)** a_w ανάπτυξης (0.99, 0.95 και 0.93) σε όλα τα a_w ανάπτυξης, **γ)** μετά από παραμονή του σε pH 4.9 για 1, 5 και 10 ημέρες και μεταφορά του σε όλα τα pH ανάπτυξης και **δ)** μετά από παραμονή του σε a_w 0.90 (12.5% NaCl) για 1, 5 και 10 ημέρες και μεταφορά του σε όλα τα a_w ανάπτυξης. Στο σχήμα τα πειραματικά δεδομένα αντιπαραβάλλονται με τις καμπύλες πρόβλεψης του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi, μετά από προσαρμογή τους με την βοήθεια του προγράμματος DMFit 2.1. 143

Σχήμα 5.4. Επίδραση των μεταφορών οξύτητας (**α, γ, ε**) και αλατότητας (**β, δ, ζ**) στον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (μ_{max} , **α, β**), τον χρόνο προσαρμογής (λ , **γ, δ**) και το έργο προσαρμογής (h_0 , **ε, ζ**) της *L. monocytogenes*, μετά από ανάπτυξη σε διαφορετικές συνθήκες a_w και pH, στους 10°C. Οι τιμές Δa_w στον οριζόντιο άξονα ισούνται με την διαφορά $a_{w\text{τελικό}} - a_{w\text{αρχικό}}$, όπου $a_{w\text{τελικό}}$ είναι η ενεργότητα ύδατος μετά τη μεταφορά και $a_{w\text{αρχικό}}$ είναι η ενεργότητα ύδατος των αρχικών υποστρωμάτων ανάπτυξης. Ομοίως, οι τιμές ΔpH ισούνται με την διαφορά $\text{pH}_{\text{τελικό}} - \text{pH}_{\text{αρχικό}}$, όπου $\text{pH}_{\text{τελικό}}$ είναι το pH μετά τη μεταφορά και το $\text{pH}_{\text{αρχικό}}$ είναι το pH πριν την μεταφορά. Η τιμή μηδέν αντιπροσωπεύει μεταφορές στις ίδιες τιμές a_w ή pH, οι θετικές τιμές αντιπροσωπεύουν τα μεταφορές σε μεγαλύτερες τιμές και το αρνητικό πρόσημο τις μεταφορές σε μικρότερες τιμές. ... 145

Σχήμα 5.5. Πρόσθετο έργο που χρειάζεται για την έναρξη ανάπτυξης (additional h_0^*) της *L. monocytogenes* σε συνθήκες ανάπτυξης, λόγω της μεταφοράς του από διαφορετικές αρχικές τιμές a_w : (□) 0.995, (●) 0.97, (Δ) 0.95, (◇) 0.93. Για τον υπολογισμό του πρόσθετου h_0^* , οι χρόνοι προσαρμογής των συνθηκών που δεν μεταφέρθηκαν (lag_{same}) αφαιρέθηκαν από τους χρόνους προσαρμογής αυτών που μεταφέρθηκαν (lag_{new}) και πολλαπλασιάστηκαν με τον μέγιστο ειδικό αριθμό ανάπτυξης (μ_{max}), σύμφωνα με την εξίσωση 9. 147

Σχήμα 5.6. Επίδραση των μεταφορών οξύτητας (**α, γ, ε**) και αλατότητας (**β, δ, ζ**) στον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (μ_{max} , **α, β**), τον χρόνο προσαρμογής (λ , **γ, δ**) και το έργο προσαρμογής (h_0 , **ε, ζ**) της *L. monocytogenes*, έπειτα από παρατεταμένη έκθεση των κυττάρων για (□) 1, (Δ) 5 ή (●) 10 ημέρες σε a_w 0.90 (12,5% NaCl) ή pH 4.9 και μεταφορά τους σε όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες a_w και pH ανάπτυξης, στους 10°C..... 149

Σχήμα 5.7. Χρόνοι προσαρμογής της *L. monocytogenes* σε a_w ανάπτυξης, έπειτα από ανάπτυξη σε a_w 0.995 (◇), 0.97 (Δ), ή παρατεταμένη έκθεση (●) για 10 ημέρες σε a_w 0.90..... 150

Σχήμα 5.8. Ανάπτυξη του πληθυσμού της *L. monocytogenes* (■) στους 10°C σε γάλα ρυθμισμένο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος και NaCl. Η μεταβολή του pH ή της αλατότητας συμβολίζεται με διακεκομμένη γραμμή με τις τελείες, ενώ στο τελευταίο σχήμα η μεταβολή του pH

συμβολίζεται με διακεκομμένη γραμμή με τελείες και παύλες. Στο σχήμα απεικονίζεται η πρόβλεψη του μοντέλου που συμπεριλαμβάνει την επίδραση των μεταφορών (συνεχής) ή όχι (διακεκομμένη με παύλες). Τα επίπεδα αλατότητας του σχήματος αναφέρονται στο πρόσθετο ποσοστό NaCl. 155

Σχήμα 6.1. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων μιας τυπικής τυροκόμησης Φέτας και Γραβιέρας. Το πρώτο στάδιο ενοφθαλμισμού των δειγμάτων με τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* έλαβε χώρα μετά την παστερίωση και την ψύξη του γάλακτος, το δεύτερο κατά τον τεμαχισμό του τυροπήγματος και το τρίτο στην αρχή της δεύτερης ωρίμασης των τυριών. 165

Σχήμα 6.2. Υγιεινολογική κατάσταση του νωπού και του παστεριωμένου γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε στις εργαστηριακές τυροκομήσεις Φέτας και Γραβιέρας. Μετρήθηκαν η ολική μεσόφιλη μικροχλωρίδα (TSAYE), τα οξυγαλακτικά βακτήρια (MRS), τα κολοβακτηρίδια (Chromocult), τα εντεροβακτήρια (VRBG), οι μικροκόκκοι (BPA) και οι ζυμών και μύκητες (YGC)... 168

Σχήμα 6.3. Συμπεριφορά της *L. monocytogenes* (log CFU/ml ή g) κατά την τυροκόμηση (αριστερά διαγράμματα) και την ωρίμαση (δεξιά διαγράμματα) δειγμάτων Φέτας (**α, β**) και Γραβιέρας (**γ, δ**), έπειτα από ενοφθαλμισμό στο παστεριωμένο γάλα με πλαγκτονικά (**α, γ**) και αποκολλημένα (**β, δ**, βιοϋμένια) κύτταρα της *L. monocytogenes*, προερχόμενα από TSBYE, γάλα, Φέτα ή Γραβιέρα. Το πρώτο σημείο (1^η ημέρα) κάθε καμπύλης στο διάγραμμα ωρίμασης συμπίπτει με το τελευταίο (24 ώρες) στο διάγραμμα τυροκόμησης..... 171

Σχήμα 6.4. Διαγράμματα της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX, log CFU/ml ή g, **α, β**), του pH (**γ, δ**) και της ενεργότητας ύδατος (a_w , **ε, ζ**) κατά την τυροκόμηση και την ωρίμαση δειγμάτων Φέτας (**α, γ, ε**) και Γραβιέρας (**β, δ, ζ**). Η κάθε καμπύλη αντιστοιχεί σε ένα στάδιο ενοφθαλμισμού της *L. monocytogenes* κατά την παραγωγική διαδικασία (1^ο, 2^ο, 3^ο στάδιο ενοφθαλμισμού Σχ. 6.1). 173

Σχήμα 6.5. Συμπεριφορά της *L. monocytogenes* (log CFU/ml ή g) κατά την τυροκόμηση (αριστερά διαγράμματα) και την ωρίμασή (δεξιά διαγράμματα) σε δειγμάτων Φέτας (**α, β**) και Γραβιέρας (**γ, δ**), έπειτα από ενοφθαλμισμό κατά το κόψιμο του τυροπήγματος, με πλαγκτονικά (**α, γ**) και αποκολλημένα (**β, δ**, βιοϋμένια) κύτταρα *L. monocytogenes*, προερχόμενα από TSBYE, γάλα, και Φέτα ή Γραβιέρα. Το πρώτο σημείο (1^η ημέρα) κάθε καμπύλης στο διάγραμμα ωρίμασης συμπίπτει με το τελευταίο (24 ώρες) στο διάγραμμα τυροκόμησης. 176

Σχήμα 6.6. Συμπεριφορά της *L. monocytogenes* (log CFU/ g) κατά την δεύτερη ωρίμασή (4^οC) σε δείγματα Φέτας (**α, β**) και Γραβιέρας (**γ, δ**), έπειτα από ενοφθαλμισμό τους με πλαγκτονικά (ΠΚ, **α, γ**) και αποκολλημένα κύτταρα (ΑΚ, **β, δ**) *L. monocytogenes*, προερχόμενα από διαφορετικά υποστρώματα (TSBYE, MRD, γάλα, Φέτα, Γραβιέρα, AA: προσαρμ. σε όζινες συνθήκες, NA: μη προσαρμ. σε όζινες συνθήκες)..... 179

Σχήμα 6.7. Συγκεντρωτική απεικόνιση της συμπεριφοράς της *L. monocytogenes* κατά την παραγωγή και ωρίμαση δειγμάτων Φέτας (**α, γ**) και Γραβιέρας (**β, δ**) συγκριτικά με τις καμπύλες πρόβλεψης ενός δυναμικού ενοποιημένου (integrated) μοντέλου, μετά από προσαρμογή τους σε αυτό με το πρόγραμμα GroPIN (<http://www.aua.gr/psomas/gropin/>). Τα δείγματα παρασκευάστηκαν έπειτα από ενοφθαλμισμό με το παθογόνο στο στάδιο ψύξης του παστεριωμένου γάλακτος (**α, β**) και στο στάδιο τεμαχισμού του τυροπήγματος (**γ, δ**). Τα κύτταρα της *L. monocytogenes* είχαν προηγουμένως εξοικειωθεί (πλαγκτονικά κύτταρα ή ΠΚ, κλειστά σύμβολα) ή σχηματίσει βιοϋμένια (αποκολλημένα κύτταρα ή ΑΚ, ανοιχτά σύμβολα) σε TSBYE (■), γάλα (◆), Φέτα(▲), Γραβιέρα(▲). Σε όλες τις περιπτώσεις σαν χρόνος "0" λαμβάνεται η ημέρα της τυροκόμησης..... 184

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Κατηγορίες Μοντέλων Πρόρρησης σύμφωνα με τους McDonald & Sun (1999)	28
Πίνακας 2.1. Μικροβιολογική κατάσταση των δειγμάτων προϊόντων ή επιφανειών στα οποία ανιχνεύθηκαν οι μικροοργανισμοί <i>L. monocytogenes</i> , <i>Listeria sp.</i> και <i>Salmonella spp.</i> και κατάμετρήθηκαν οι <i>Staphylococcus aureus</i> (>2 log CFU/g ή ml) και <i>Escherichia coli</i> (>3 log CFU/g ή ml) .	51
Πίνακας 3.1.1. Κινητικές παράμετροι (μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση ^α , n=4) της ανάπτυξης της <i>L. monocytogenes</i> σε γάλα στους 5°C, μετά από επώαση σε διαφορετικές συνθήκες ^β	74
Πίνακας 4.1.1. Πληθυσμοί των προσκολλημένων κυττάρων (<i>BK</i>) της <i>L. monocytogenes</i> (μέσοι log CFU/cm ² ± Τυπική Απόκλιση) σε κουπόνια ανοξειδωτο χάλυβα (<i>ΑΧ</i>) σε διαφορετικές συνθήκες pH και <i>a_w</i> , μετά από 30 ημέρες συντήρησης στους 10°C. Οι περιπτώσεις που παρουσίασαν επιβίωση ή οριακή ανάπτυξη σκιαγραφούνται με γκρι χρώμα, μείωση με ανοιχτό γκρι, ενώ τα λευκά κελιά αντιπροσωπεύουν τις περιπτώσεις που δεν ανιχνεύθηκαν κύτταρα της <i>L. monocytogenes</i> (αρχικός πληθυσμός 4.5 ± 0.5 log CFU/cm ²).	103
Πίνακας 4.1.2. Συνολικός αριθμός απομονώσεων της <i>L. monocytogenes</i> (Σύνολο), που συλλέχθηκαν μετά από 30 ημέρες συντήρησης των κουπονιών <i>ΑΧ</i> που έφεραν τα προσκολλημένα κύτταρα (<i>BK</i>) της <i>L. monocytogenes</i> σε υγρό θρεπτικό μέσο (TSBYE) προσαρμοσμένο σε 30 συνδυασμούς pH και <i>a_w</i> . Στη τέταρτη στήλη αναγράφεται ο αριθμός των απομονώσεων που εξετάστηκαν με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (<i>PFGE</i>) και στην πέμπτη ο αριθμός εξ αυτών που εμφάνισε παρόμοια συμπεριφορά με το στέλεχος <i>C₅</i>	105
Πίνακας 4.1.3. Οι χαμηλότερες τιμές (θετικές επαναλήψεις από σύνολο 3) στις οποίες παρατηρήθηκε ανάπτυξη των διαφορετικών ειδών κυττάρων της <i>L. monocytogenes</i> στις συνθήκες που αναγράφονται στους 10°C σε περίοδο 30 ημερών.	108
Πίνακας 4.1 4. Πλαγκτονικά (<i>ΠΚ</i>) και αποκολλημένα (<i>ΑΚ</i>) κύτταρα της <i>L. monocytogenes</i> που απαιτούνται (<i>CN</i>) για να εκκινήσει η αύξησή του σε διάφορες τιμές pH, <i>a_w</i> και χρόνου επώασης στους 10°C.....	110
Πίνακας 4.2.1. Αναπαράσταση του πολυπαραγοντικού σχεδιασμού του πειράματος και περιπτώσεις από το σύνολο στις οποίες παρατηρήθηκε ανάπτυξη της <i>L. monocytogenes</i>	121
Πίνακας 4.2.2. Τιμές των μεταβλητών όπως προέκυψαν από το Πολυωνυμικό Μοντέλο Λογιστικής Παλινδρόμησης (Εξ. 1).	126
Πίνακας 4.2.3. Τιμές των παραμέτρων και δείκτες στατιστικής επίδοσης του Μη γραμμικού Μοντέλου Λογιστικής Παλινδρόμησης (Εξ. 2) προσαρμοσμένου στα πειραματικά δεδομένα ανάπτυξης/ μη ανάπτυξης χαμηλών και υψηλών πληθυσμών της <i>L. monocytogenes</i> σε TSB, γάλα και κατά τα πρώτα στάδια τυροκόμησης.	126
Πίνακας 4.2.4. Επικύρωση του Πολυωνυμικού μοντέλου λογιστικής Παλινδρόμησης	126
Πίνακας 5.1. Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων τιμών <i>h_s</i> και <i>λ</i> (χρόνος προσαρμογής), που προέκυψαν μετά την προσαρμογή του τροποποιημένου μοντέλου.	152
Πίνακας 6.1. Πληθυσμοί των πλαγκτονικών ή αποκολλημένων κυττάρων της <i>L. monocytogenes</i> (μέσες τιμές log CFU/ml ή g ή cm ² ± τυπική απόκλιση) μετά από παραμονή για 4 ημέρες στους 20°C σε (TSBYE, MRD, γάλα, Φέτα, Γραβιέρα, ΟΑ: Οξεοανθεκτικά, ΝΑ: μη οξεοανθεκτικά) παρουσία επιφανειών ανοξειδωτου χάλυβα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σαν εμβόλια στις τυροκομήσεις Φέτας και Γραβιέρας.....	169

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γαλακτοκομικά προϊόντα

1.1.1. Ιστορική αναδρομή

Το γάλα των θηλαστικών αποτελεί μέρος του διαιτολογίου του ανθρώπου από τους προϊστορικούς χρόνους. Υπάρχουν αρχαιολογικά ευρήματα που χρονολογούνται από το 6.000 π.Χ. τα οποία αποδεικνύουν ότι η γαλακτοκομία ήταν αναπτυγμένη την εποχή εκείνη. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα χρησιμοποιήθηκαν δια μέσου των αιώνων για τη διατροφή του ανθρώπου, για θρησκευτικές τελετές, ως καλλυντικά και για διάφορες φαρμακευτικές χρήσεις. Το τυρί είναι από τα προϊόντα που αναφέρονται στα αρχαιότερα κείμενα του ανθρώπινου γένους. Το πιθανότερο είναι ότι παρασκευάσθηκε τυχαία κατά τη μεταφορά γάλακτος σε στομάχια ζώων, τα ένζυμα των οποίων το μετέτρεψαν σε στερεά μάζα. Από πολύ νωρίς διαπιστώθηκε ότι η τυροκόμηση είναι μια πρόσφορη μέθοδος μετατροπής σημαντικού μέρους των συστατικών του γάλακτος σε ένα προϊόν λιγότερο ογκώδες που διατηρείται καλύτερα, με υψηλή θρεπτική αξία, εύγευστο και εύπεπτο.

Η επωνομασία τυρί ή τυρός στα αρχαία ελληνικά, ενδέχεται να προέρχεται από το ρήμα ρέω, που σημαίνει διατρυνώ, τρυνώ, επομένως να αναφέρεται στις τρύπες του προϊόντος. Σε μια άλλη εκδοχή, προέρχεται από το ρήμα τορεύω, που σημαίνει καλουπώνω επειδή μερικά από τα τυριά απαιτούν καλούπια. Η ιστορία του τυριού σχεδόν ταυτίζεται αλλά και εξελίσσεται με αυτήν της Ευρώπης και κυρίως της νότιας πλευράς της.

Πρώτη μαρτυρία διατροφής με γάλα μηρυκαστικού είναι αυτή της Ελληνικής μυθολογίας. Ο Δίας κυνηγημένος από τον πατέρα του Κρόνο, κρύβεται από την μάνα του Ρέα στα δύσβατα βουνά της Κρήτης και τρέφεται αποκλειστικά με γάλα και μέλι. Και πάλι ο Δίας για να θρέψει το γιό του Ηρακλή με θεϊκό γάλα για να γίνει αθάνατος έκανε τον ουρανό να κατακλεισθεί από γάλα. Έκτοτε τον ουρανό γέμισαν οι Γαλαξίες. Ο Όμηρος στην Οδύσσεια περιγράφει λεπτομερώς τον βοσκό και τυροκόμο Πολύφημο και δίνει περιγραφές των τυριών που ωρίμαζαν μέσα στην σπηλιά του (Litoroulou-Tzanetaki και Tzanetakis, 2011). Ο Αριστοτέλης και ο Διοσκουρίδης έδωσαν τις πρώτες συνταγές για την παραγωγή τυριού και από αυτούς γνωρίζουμε ότι οι αρχαίοι για να πήξουν το γάλα χρησιμοποιούσαν το άσπρο υγρό που βγάζουν οι συκιές στα κοτσάνια των φύλλων και στα άγουρα σύκα τους. Αναφέρεται ως 'τυρός' από τον Όμηρο στην Ιλιάδα, από τον Ευρυπίδη στον 'Κύκλωπα' και από τον Αριστοφάνη στους 'Βάτραχους'. Στην αγορά των Αθηνών υπήρχε χώρος ειδικά αφιερωμένος στα τυριά. Στην αρχαία Σπάρτη υπήρχε τελετουργική γιορτή με επίκεντρο την κλοπή τυριών για να δείξουν το ταλέντο τους στον κλεφτοπόλεμο οι νεαροί Σπαρτιάτες.

Κατά την διάρκεια της Βυζαντινής αυτοκρατορίας στον Ελληνικό χώρο η τυροκομία ήταν πολύ εκτεταμένη. Οι λίγες μαρτυρίες που υπάρχουν αναφέρονται στο βλάχικο τυρί, τις μυζήθρες (απ' όπου πήρε το όνομά του και ο Μυζηθράς - Μυστράς). Κατά την διάρκεια της Τουρκοκρατίας στα βουνά της Ηπειρωτικής Ελλάδας και των νησιών, η παράδοση συνεχίστηκε αμείωτα. Στο τέλος του 19ου αιώνα, το νεοσύστατο Ελληνικό κράτος με τους υπουργούς του και ιδιαίτερα του Εμμανουήλ Μπενάκη, αντελήφθη την οικονομική σημασία της κτηνοτροφίας και κάλεσε τον Ελληνικής καταγωγής διαπρεπή τυροκόμο Ραϋμόνδο Δημητριάδη να εκπαιδεύσει τους νέους τυροκόμους της χώρας. Σ' αυτόν οφείλεται η κατασκευή της γραβιέρας στην Ελλάδα. Οι επίσης μεγάλοι τυροκόμοι Ζυγούρης και Πολυχρονιάδης συνέχισαν το έργο του, διασχίζοντας τη χώρα και εκπαιδεύοντας νέους στην τέχνη. Αργότερα συγκροτήθηκε η Εθνική Επιτροπή Γάλακτος, η οποία και μέχρι πρότινος προωθούσε με κάθε τρόπο τα συμφέροντα των τυροκόμων.

1.1.2. Ελληνική Γαλακτοκομία

Η Ελληνική γαλακτοκομία αποτελεί ένα κλάδο τροφίμων με ιδιαίτερη σημασία για τη χώρα μας. Για πολλά χρόνια αντιπροσωπεύονταν από πολλές βιοτεχνικού τύπου επιχειρήσεις, μικρής σχετικά δυναμικότητας, που χρησιμοποιούν παραδοσιακές τεχνικές για την παραγωγή των προϊόντων τους. Εντούτοις, τους τελευταίους δύο αιώνες υπήρξε εντυπωσιακή αύξηση της γαλακτοπαραγωγής και τεχνολογική εξέλιξη των επιχειρήσεων του κλάδου. Η γενίκευση της χρήσης των ψυκτικών μηχανών και των πηγών ενέργειας (ατμού, πετρελαίου κ.α.) συνέβαλε στη διαμόρφωση μεγάλων βιομηχανικών μονάδων παρασκευής τυριών. Η ανάπτυξη στη συνέχεια της επιστήμης της μικροβιολογίας είχε σοβαρό αντίκτυπο στην εξέλιξη της τυροκομίας. Η βελτίωση των μέσων διακινήσεως του γάλακτος, η βελτίωση και επέκταση των οδικών δικτύων, η εξέλιξη στον τομέα του μηχανολογικού εξοπλισμού και η έρευνα στη γαλακτοκομία γενικότερα αλλά και στην τυροκομία ειδικότερα αποτελούν σημαντικούς συντελεστές προόδου. Η δημιουργία νέων φυλών ζώων, η βελτίωση των παλαιών, η καταπολέμηση των ασθενειών τους και η σωστή διατροφή τους, αποτέλεσμα της έρευνας πολλών χρόνων και χωρών, οδήγησαν στην αλματώδη αύξηση της γαλακτοπαραγωγής σε παγκόσμια κλίμακα σε βαθμό που η αξία της να υπερβαίνει την αξία οποιουδήποτε άλλου αγροτικού προϊόντος.

Σε πολλές χώρες του κόσμου και ιδιαίτερα της Ευρώπης η παραγωγή και η εξαγωγή διαφόρων τύπων τυριών αποτελεί μία από τις σημαντικότερες πηγές κέρδους. Σύμφωνα με στοιχεία του F.A.O. η παγκόσμια παραγωγή γάλακτος και τυριών κατά το 1982 ανήλθε σε 487.000.000 και 11.979.009 τόνους αντίστοιχα, που σημαίνει ότι το 25% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής γάλακτος μετατρέπεται σε τυρί. Τον ίδιο χρόνο παράχθηκαν στην χώρα μας 1.660.000 τόννοι γάλακτος από τους οποίους 684.000 ήταν αγελαδινό, 551.000 πρόβειο και 425.000 κατσικίσιο. Το

70% περίπου του κατσικίσιου και πρόβειου γάλακτος και το 30% του αγελαδινού τυροκομήθηκε. Συνολικά παράχθηκαν 175.000 τόνοι τυριών - 130.000 τυριά άλμης, 35.000 σκληρά τυριά και 10.000 τυριά τυρογάλακτος - παραγωγή που θεωρείται σημαντική και δείχνει τη σημασία της τυροκομίας για την χώρα μας (Ανυφαντάκης, 1993). Από τα πολλά είδη τυριών που παράγονται στην Ελλάδα, τα 21 έχουν χαρακτηριστεί σαν Προϊόντα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ-PDO), με ναυαρχίδα ίσως τη Φέτα, ενώ αρκετά βρίσκονται σε διαδικασία αναγνώρισης ως ΠΟΠ (Litoroulou-Tzanetaki και Tzanetakis, 2011, Panagou et al., 2013).

1.1.3. Υγιεινή και ασφάλεια των γαλακτοκομικών προϊόντων

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως και κάθε τρόφιμο που διατίθεται με σκοπό την κατανάλωση οφείλουν να έχουν συγκεκριμένες προδιαγραφές τόσο για την ποιότητά τους, όσο κυρίως για την ασφάλεια και την υγιεινή τους αρτιότητα. Για το σκοπό αυτό υπάρχουν οργανισμοί τόσο σε παγκόσμιο επίπεδο (USDA, FDA, EFSA), όσο και στην Ελλάδα (ΕΦΕΤ), ενώ έχουν θεσπιστεί κανονισμοί (ΕΚ 2073/2005, τροπ. ΕΚ 1441/2007), οι οποίοι βοηθάνε στον έλεγχο των παραγωγών, προσδιορίζοντας την διαδικασία της δειγματοληψίας και οριοθετώντας τα αποδεκτά επίπεδα παρουσίας μικροοργανισμών στα τρόφιμα, ανάλογα με το στάδιο επεξεργασίας και τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, τους οποίους καλούνται να ικανοποιούν και οι Έλληνες παραγωγοί (ΕΚ 852/2004, Little et al., 2008, Kagli et al., 2009, Jacxsens et al., 2009). Βοηθητική είναι η ύπαρξη αντίστοιχων οργανισμών (ISO, ΕΛΟΤ) που δραστηριοποιούνται στον τομέα της ποιότητας και της τυποποίησης των παραγόμενων προϊόντων και διαδικασιών, κυρίως με την έκδοση ειδικών προτύπων ή οδηγιών, τα οποία περιγράφουν τις διαδικασίες που πρέπει να ακολουθήσει ο παραγωγός ώστε να ανταποκρίνεται τόσο από άποψη ποιότητας, όσο και ασφάλειας στο επίπεδο που έχει θεσπίσει, και που απαιτεί η νομοθεσία.

Για τον κλάδο των γαλακτοκομικών προϊόντων υπάρχουν εξειδικευμένοι οργανισμοί όπως ο IDF (International Dairy Federation) και αντίστοιχα η Εθνική Επιτροπή Γάλακτος στην Ελλάδα (μέχρι πρότινος), οι οποίοι συνδράμουν υποστηρίζοντας τις επιχειρήσεις με την έκδοση προτύπων και γενικότερα κατευθυντήριων γραμμών, με την οργάνωση ερευνών για τα προβλήματα και τα στατιστικά στοιχεία του κλάδου, τα αποτελέσματα των οποίων κοινοποιούν σε όλους τους ενδιαφερόμενους, και με την διατήρηση των σχέσεων και των συνεργασιών με κυβερνητικούς και μη οργανισμούς (<http://www.fil-idf.org/>). Επιπλέον, στην Ελληνική πραγματικότητα, ο ΕΦΕΤ συνδράμει τις μικρές γαλακτοκομικές επιχειρήσεις στην τήρηση των υγειονομικών μέτρων για την παραγωγή ασφαλών τροφίμων, με την έκδοση ενός οδηγού που περιγράφει την εφαρμογή συστήματος διαχείρισης της ασφάλειας των γαλακτοκομικών προϊόντων βάσει των αρχών του HACCP και περιλαμβάνει οδηγίες για την εφαρμογή ορθής υγιεινής πρακτικής, σχέδια HACCP και

έντυπα τεκμηρίωσης της εφαρμογής του (ΕΦΕΤ, 2012). Η σημαντικότητα του οδηγού έγκειται στο ότι μπορεί ο παραγωγός να τον τροποποιήσει, ανάλογα με τις εκάστοτε εφαρμοζόμενες μεθόδους επεξεργασίας, τις λειτουργικές διεργασίες, το είδος των παραγόμενων γαλακτοκομικών προϊόντων, με αποτέλεσμα να προσαρμόζεται στις ανάγκες της κάθε επιχείρησης. Αντίστοιχους οδηγούς έχουν εκδώσει και άλλες Ελληνικές αρχές, όπως το Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών του ΕΘΙΑΓΕ, στον οδηγό του οποίου «Οδηγίες υγιεινής ενός μικρού τυροκομείου» περιγράφει αναλυτικά τις βασικές απαιτήσεις υγιεινής των εγκαταστάσεων ενός τυροκομείου, καθώς και όλα τα κρίσιμα σημεία ελέγχου από την παραλαβή του γάλακτος μέχρι και την ωρίμαση και διάθεση των τυριών (Σαμούρης, 2008). Με τον τρόπο αυτό, ο υπεύθυνος της γαλακτοκομικής επιχείρησης είναι σε θέση να γνωρίζει τους κινδύνους που μπορεί να επηρεάσουν την ασφάλεια των παραγόμενων προϊόντων και τα μέτρα πρόληψής τους, να αξιοποιεί επαρκώς τους οικονομικούς πόρους του και να ανταποκρίνεται τελικά στο αίτημα του καταναλωτή για την παραγωγή ασφαλών, ποιοτικών και ανταγωνιστικών προϊόντων.

Στους κανονισμούς και τους αντίστοιχους οδηγούς που αναφέρθηκαν γίνεται σημαντική μνεία τόσο στους παθογόνους μικροοργανισμούς που μπορεί να βρεθούν στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, όσο και στους μη παθογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι ωστόσο αποτελούν σημαντική ένδειξη της γενικότερης υγιεινολογικής κατάστασης ενός τυροκομείου, καθώς η ύπαρξή τους υποδηλώνει την αυξημένη πιθανότητα ύπαρξης παθογόνων και κατ' επέκταση την αυξημένη επικινδυνότητα των παραγόμενων προϊόντων. Ιδιαίτερα στον ΕΚ 2073, ο οποίος εφαρμόζεται σε Ευρωπαϊκό επίπεδο, ο πρώτος μικροοργανισμός που αναφέρεται στα μικροβιολογικά κριτήρια ασφάλειας των τροφίμων είναι η *L. monocytogenes*, του οποίου τα όρια δεν τροποποιούνται ανάλογα με το είδος του τροφίμου (όπως σε άλλους μικροοργανισμούς), αλλά με την ικανότητά του ή όχι να υποστηρίξει ανάπτυξη του παθογόνου (ΕΚ 2073/2005, τροπ. ΕΚ 1441/2007). Επιπλέον, λόγω της υψηλής θνητότητας της νόσου που προκαλεί (λιστερίωση) και της φύσης των γαλακτοκομικών προϊόντων, με δεδομένο ότι είναι στην πλειονότητά τους έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες ενδιαφέροντος της γαλακτοβιομηχανίας σε παγκόσμιο επίπεδο.

1.2. *Listeria monocytogenes*

Η αναγνώριση της *Listeria monocytogenes*, ως ενός επικίνδυνου για τον άνθρωπο λοιμογόνου παράγοντα, στην επιδημιολογία του οποίου συμμετέχουν εκτός από τα ζώα και τα τρόφιμα, έγινε μόλις το 1966 από τους Gray & Killinger (Farber and Peterkin, 1991). Έκτοτε ο οργανισμός έχει ταυτοποιηθεί σαν η αιτία πολλών περιπτώσεων τροφιμογενών λοιμώξεων, σε παγκόσμια κλίμακα, με αποτέλεσμα σήμερα να αποτελεί έναν από τους πλέον σημαντικούς και περισσότερο μελετημένους παθογόνους μικροοργανισμούς, που σχετίζονται με τη Μικροβιολογία Τροφίμων και ενδιαφέρουν άμεσα το χώρο της βιομηχανίας (Farber and Peterkin, 1991).

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* περιγράφηκε αρχικά από τους Murray et al. (1926), οι οποίοι τον ονόμασαν *Bacterium monocytogenes*, εξαιτίας του χαρακτηριστικού του να προκαλεί μονοκυττάρωση (Hof, 2003). Το 1927 ο μικροοργανισμός ονομάστηκε από τον Pirie *Listerella hepatolytica*, για να καταλήξει στο σημερινό του όνομα το 1940 από τον ίδιο επιστήμονα. Απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά, από άτομο που έφερε την νόσο, το 1929 από τον Nyfeldt (Farber and Peterkin, 1991, Hof, 2003). Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας σχετικά με τον μικροοργανισμό αυξήθηκε δραματικά κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980, καθώς συνδέθηκε με λοιμώξεις τροφιμογενούς αιτιολογίας και διαπιστώθηκε η ικανότητά του να μεταδίδεται στον άνθρωπο και τα ζώα μέσω των τροφίμων (McLauchlin et al. 2004).

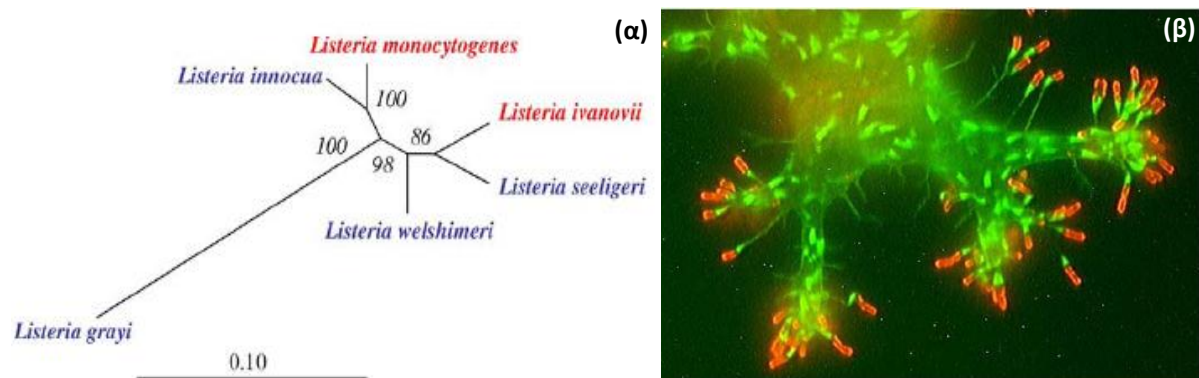
Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου σε παγκόσμιο επίπεδο αυξήθηκε σημαντικά στη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, ενώ παρατηρείται αύξηση του αριθμού των καταγεγραμμένων περιστατικών στις ΗΠΑ και την Ευρώπη (McLauchlin, 1987, EFSA, 2013). Συγκεκριμένα, ο αριθμός των περιστατικών που αναφέρθηκαν στην Ευρώπη, το έτος 2011, ανήλθε στα 1470 με ποσοστό θνητότητας το 12,7%, ενώ για το ίδιο έτος στις ΗΠΑ ανήλθε στις 621 περιπτώσεις με 94% νοσηλεία και 22% θνητότητα (CDC, 2013, EFSA, 2013). Η παρατηρούμενη αύξηση της συχνότητας της νόσου μπορεί εν μέρει να αποδοθεί στην αυξημένη επαγρύπνηση απέναντι στη νόσο και στην βελτιστοποίηση των μεθόδων διάγνωσης και απομόνωσης. Παράλληλα, αυξήθηκαν πληθυσμιακά οι ευαίσθητες στη νόσο ομάδες. Στους παράγοντες που οδήγησαν στη ραγδαία αύξηση των κρουσμάτων της νόσου στον άνθρωπο, συμπεριλαμβάνονται αφενός μεν η ραγδαία πρόοδος που χαρακτήρισε την πρωτογενή παραγωγή τροφίμων, με την ανάπτυξη και εφαρμογή ηπιότερων μεθόδων επεξεργασίας, την εισαγωγή νέων τεχνολογιών και τη μακροχρόνια συντήρηση υπό θερμοκρασίες ψύξης, αφετέρου δε η αλλαγή του τρόπου ζωής, η οποία συνοδεύτηκε από νέες διατροφικές συνήθειες και μία αυξανόμενη απαίτηση των καταναλωτών για προϊόντα που, διατίθενται στο εμπόριο σχεδόν έτοιμα για να καταναλωθούν, έχουν παρασκευαστεί με ελάχιστη ή καθόλου επεξεργασία, ενώ διατηρούν τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες και τα φυσικά χαρακτηριστικά τους (Roccourt and Cossart, 1997, Lianou και Sofos, 2007).

1.2.1. Χαρακτηριστικά της *L. monocytogenes*

1.2.1.1. Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά

Το γένος *Listeria* περιλαμβάνει τα είδη *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* και *L. murrayi*, και δύο που ταυτοποιήθηκαν πρόσφατα τα *L. marthii* και *L. rocourtiae* (Orsi et al., 2011), εκ των οποίων το είδος *L. monocytogenes* εμφανίζει παθογένεια σε ανθρώπους και ζώα, ενώ το *L. ivanovii* μόνο σε ζώα (McLauchlin et al. 2004, Hain et al., 2006 Orndorff et al., 2006). Τα υπόλοιπα είδη, αν και κατά καιρούς έχουν εμπλακεί σε μεμονωμένα κρούσματα λιστερίωσης θεωρούνται πρακτικά μη παθογόνα (McLauchlin et al. 2004, Hof, 2003).

Η *L. monocytogenes* είναι ένα Gram-θετικό, προαιρετικά αναερόβιο, θετικό στο τέστ καταλάσης, αρνητικό στο τέστ οξειδάσης, μη σποριογόνο βακτήριο. Ο μικροοργανισμός έχει σχήμα από κόκκου ή βακίλλου (0,4-0,5μm x 0,5-2,0μm). Κατά την καλλιέργειά του σε θερμοκρασίες 20-25°C η μορφολογία του χαρακτηρίζεται από την παρουσία μαστιγίων ενώ παράλληλα ο μικροοργανισμός εμφανίζει χαρακτηριστική μορφή κίνησης. Κατά την καλλιέργειά του σε θρεπτικό υπόστρωμα με τρυπτόζη οι αποικίες της εμφανίζουν, όταν φωτιστούν υπό συγκεκριμένη γωνία, χαρακτηριστικό γαλαζοπράσινο χρωματισμό (Adams and Moss, 2000).



Σχήμα 1.1. (α) Φυλογενετικό δένδρο του γένους *Listeria* βασισμένο στα 16S και 23S rRNA, *iap*, *prs*, *vlcB* και *ldh*. Τα κόκκινα είδη εμφανίζουν παθογένεια, ενώ τα μπλε έχουν χαρακτηριστεί ως μη παθογόνα. (β) Εικόνα μικροσκοπικού ανοσοφθορισμού ενός μολυσμένου μικροφάγου με το άγριο στέλεχος EGD-e (μεγέθυνση x63, Hain et al., 2006).

Παρά το γεγονός ότι η νόσος μπορεί να προκληθεί και από τους 13 ορότυπους της *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7) που υπάρχουν στο περιβάλλον, οι πλειοψηφία των περιστατικών αποδίδεται στους ορότυπους 1/2a, 1/2b και 4b (Kathariou, 2002). Παρατηρούνται διαφορές στη γεωγραφική κατανομή των διαφόρων οροτύπων,

με τον ορότυπο 4b να κυριαρχεί στα κρούσματα της νόσου σε παγκόσμιο επίπεδο (Farber and Peterkin, 1991, Kathariou, 2002). Πέρα από τους ορότυπους, τα στελέχη της *L. monocytogenes* χωρίζονται σε τέσσερεις φυλογενετικές ομάδες (lineages I, II, III, IV), έπειτα από τις κατάλληλες γενοτυπικές και φαινοτυπικές αναλύσεις (rybotyping, PFGE, MLST, Orsi et al., 2011). Τα lineages δύνανται να περιέχουν περισσότερους του ενός οροτύπους, και αντίστροφα ένας ορότυπος ενδέχεται να βρίσκεται σε περισσότερα του ενός lineages, ενώ μπορούν να συνδεθούν με συγκεκριμένες πηγές απομόνωσης (π.χ. lineage I από άνθρωπο, lineage II από περιβάλλον ή τρόφιμο), χωρίς ωστόσο να είναι απόλυτη μια τέτοια κατηγοριοποίηση (Hain et al., 2007, Orsi et al., 2011).

1.2.1.2. Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του μεταβολισμού των ειδών του γένους *Listeria* spp. αναφέρονται από τους Pine et al. (1989). Υπό αναερόβιες συνθήκες επώασης, ως μεταβολικά υποστρώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο πεντόζες και εξόζες. Υπό αερόβιες συνθήκες, χρησιμοποιούν για τις μεταβολικές διεργασίες, που στηρίζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, μαλτόζη και λακτόζη, αλλά, όχι σακχαρόζη. Οι *L. monocytogenes* και *L. innocua* χρησιμοποιούν γλυκόζη, λακτόζη και ραμνόζη, κάτω από αερόβιες συνθήκες, ενώ οι *L. grayi* και *L. murrayi* χρησιμοποιούν επίσης γαλακτόζη. Οι *L. ivanovii* και *L. seeligeri* αποτελούν τα μόνα είδη *Listeria* spp. που έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν τη ξυλόζη (Farber and Peterkin, 1991). Οι Fleming et al. (1996) προσδιόρισαν ποσοτικά τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού της γλυκόζης από την *L. monocytogenes*, κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Και τα δέκα στελέχη που μελετήθηκαν παρήγαγαν ακετοΐνη κάτω από αερόβιες, αλλά όχι κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Παρουσία οξυγόνου τα τελικά μεταβολικά προϊόντα ήταν γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ και ακετοΐνη, ενώ απουσία οξυγόνου γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, φορμικό οξύ, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (Fleming et al., 1996).

1.2.2. Κατανομή του μικροοργανισμού στη φύση

Η ιδιαίτερα ευρεία διάδοση του μικροοργανισμού στο περιβάλλον αποδίδεται σε δύο χαρακτηριστικά του, την ικανότητά του να επιβιώνει επί μακρόν σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες και στο ψυχρότροφο χαρακτήρα του. Έχει απομονωθεί από νερό, πόσιμο και θαλασσινό, χώμα, αλλοιωμένα λαχανικά και ζωοτροφές (Roccourt and Cossart, 1997). Η *L. monocytogenes* απαντάται στο έδαφος, των αποχετευτικών συστημάτων, των ποταμών και όπου υπάρχει συνεχής αποσύνθεση οργανικής ύλης. Το γεγονός της επιβίωσης του παθογόνου κατά τη διάρκεια επεξεργασίας λυμάτων σε ποσοστά μέχρι 60% είναι ιδιαίτερης σημασίας, όταν επεξεργασμένα ή μη

λύματα και κόπρανα ανθρώπων και ζώων χρησιμοποιούνται σε πολλά μέρη του κόσμου ως λίπασμα του εδάφους. Η επιβίωση του *Listeria* στο έδαφος και σε υδάτινα περιβάλλοντα (ποταμοί, λίμνες, κανάλια) μπορεί να διαρκέσει πάνω από ένα χρόνο, διάστημα κατά το οποίο μπορεί να μεταφερθεί από αυτές τις πηγές στις τροφές των ζώων και του ανθρώπου. Τέλος, φορείς του μικροοργανισμού ενδέχεται να είναι οι άνθρωποι και τα ζώα (Adams and Moss, 2000). Οι άνθρωποι-φορείς της νόσου σχετίζονται με συγκεκριμένα επαγγέλματα (εκδοροσφαγείς, κτηνίατροι, χειριστές πρώτων υλών, κ.τ.λ.), οι οποίοι έρχονται συνήθως σε άμεση επαφή με μολυσμένα ζώα ή λαχανικά.

1.2.3. Η *L. monocytogenes* στα τρόφιμα (επιπολασμός)

Η επικινδυνότητα της *L. monocytogenes* οφείλεται στην ευρεία διάδοσή του στο περιβάλλον και στην ικανότητά του να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται στα περισσότερα μη όξινα τρόφιμα. Τα τρόφιμα δύνανται να επιμολυνθούν σε κάθε βήμα της διαδικασίας παραγωγής τους, ενώ ακόμα και χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης επιτρέπουν την επιβίωση και την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Κατά καιρούς, η *L. monocytogenes* έχει συνδεθεί με λοιμώξεις, που προκλήθηκαν από διάφορα τρόφιμα, όπως λαχανικά, κρέας και κρεατοσκευάσματα, ιχθυρά, καθώς και γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως μη παστεριωμένο γάλα, σοκολατούχο γάλα και μαλακά τυριά (Shank et al., 1996, Λιανου και Sofos, 2007). Σύμφωνα με τους Roccourt και Cossart (1997), ανάμεσα στα διάφορα τρόφιμα που έχουν κατά καιρούς εμπλακεί σε κρούσματα λιστερίωσης, υψηλής επικινδυνότητας είναι τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, που συντηρούνται σε θερμοκρασίες ψύξης, καθώς και εκείνα που περιέχουν υψηλούς πληθυσμούς του παθογόνου (>100 CFU/g ή ml).

Στην μεγάλη οικογένεια των γαλακτοκομικών προϊόντων ανήκουν πολλά και διαφορετικά ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες τρόφιμα. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα οποία σχεδόν στο σύνολό τους είναι έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα, διαφοροποιούνται σημαντικά ως προς την ασφάλεια και τη σταθερότητά τους, ανάλογα με το είδος του νωπού γάλακτος, την επεξεργασία του (νωπό, θερμισμένο, παστεριωμένο), τη χρήση οξυγαλακτικής καλλιέργειας ή άλατος και γενικότερα την τεχνολογία παρασκευής και ωρίμανσής τους. Προϊόντα όπως τα μαλακά τυριά, οι κρέμες και τα γαλακτοκομικά προϊόντα υψηλών λιπαρών χαρακτηρίζονται από υψηλή επικινδυνότητα, οι έτοιμες σαλάτες τυριών (αλοιφές) και τα ημίσκληρα τυριά ωρίμασης από μεσαία επικινδυνότητα, ενώ χαμηλής επικινδυνότητας γαλακτοκομικά προϊόντα θεωρούνται το γιαούρτι, το παγωτό και τα σκληρά ή επεξεργασμένα τυριά (FDA/CFSAN, 2003).

Η συχνότητα με την οποία αναμένεται η *L. monocytogenes* στα τρόφιμα και ειδικότερα στα γαλακτοκομικά προϊόντα εξαρτάται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του κάθε τροφίμου, το είδος και το μέγεθος της επιχείρησης που το παρασκευάζει, ενώ σε πολλές περιπτώσεις εμφανίζει περιοδικότητα. Σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του μικροοργανισμού στα τελικά προϊόντα

διαδραματίζει η ποιότητα του νωπού γάλακτος, το οποίο μπορεί να έχει επιμολυνθεί με τον παθογόνο μέσω του ζώου, όταν αυτό πάσχει από μαστίτιδα, από την διαδικασία της άλμεξης και τέλος από τις παγολεκάνες που φυλάσσεται. Συγκεκριμένα, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε φάρμες της Γαλικίας (βόρειας Ισπανίας) ο παθογόνος βρέθηκε στο 6.1% των δειγμάτων γάλακτος παγολεκάνης που εξετάστηκαν, στο 9.3% των δειγμάτων κοπράνων των ζώων και στο 6.0% των ζωοτροφών (16.3%, 41.2% και 33.7% αντίστοιχα για τα *Listeria* spp. , Vilar et al., 2007). Σε αντίστοιχη μελέτη στη Μαλαισία βρέθηκε το 4% των δειγμάτων γάλακτος (αγελαδινό: 5.4%, πρόβειο: 2.4%, γίδινο: 2.4%) θετικό στη *L. monocytogenes* και το 18.6% του συνόλου των δειγμάτων (αγελαδινό: 22.5%, πρόβειο: 16.4%, γίδινο: 4.9%) θετικό σε *Listeria* spp. (Jamali et al., 2013). Αντίθετα στην Σουηδία, τα ποσοστά εμφανίστηκαν μικρότερα με 1.0% θετικών δειγμάτων από γάλα παγολεκάνης σε *L. monocytogenes* και 3.9% στα *Listeria* spp (Waak et al., 2002). Στις ΗΠΑ τα ποσοστά επιπολασμού του παθογόνου σε δεξαμενές φρέσκου γάλακτος βρέθηκαν 5.9% (948 δείγματα), στον Καναδά 2.73% (1720 δείγματα) και στην Βόρεια Ιρλανδία 5.3% στην φάρμα και 33.3% στο τυροκομείο (113 δείγματα, Kousta et al., 2010).

Όσον αφορά τα τελικά προϊόντα, τα τελευταία χρόνια έχει καταγραφεί ο επιπολασμός του παθογόνου σε πλήθος τυριών, μέσα από ειδικές δειγματοληπτικές έρευνες (surveys) ανά τον κόσμο. Το ποσοστό θετικών δειγμάτων σε *L. monocytogenes* ήταν 9.2% σε δείγματα λευκού τυριού στην Τουρκία (*Listeria* spp: 33.1%, Arslan και Ozdemir, 2008), 6% σε δείγματα 2 Ιρλανδικών τυριών από 15 διαφορετικές φάρμες στην Ιρλανδία (O' Brien et al., 2009), 2% σε 20 δείγματα του Βραζιλιάνικου τυριού "Minas frescal" (Destro et al., 1991), 0% σε 1075 τοπικά παρασκευασμένα τυριά και 2.4% σε 1387 εισαγόμενα τυριά στην Ιαπωνία (Okutani et al., 2004), 5.2% σε 19 μαλακά τυριά στη Γαλλία, 1.3% σε 78 δείγματα φρέσκου τυριού στην Ισπανία, 1.6% σε 371 τυριά στην Πορτογαλία (4% σε 50 δείγματα φρέσκου τυριού), 40% σε 10 μαλακά τυριά, 0% σε 10 ημίσκληρα τυριά (Φέτα) και 0% σε 10 σκληρά τυριά στην Ελλάδα (Kousta et al., 2010) και 0.47% σε 3452 μαλακά και ημίσκληρα τυριά της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EFSA, 2013). Από έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε τυριά του εμπορίου στην Μεγάλη Βρετανία βρέθηκε η *L. monocytogenes* σε 3.1% (1819) δειγμάτων τυριών από νωπό ή θερμισμένο γάλα (σε 1 δείγμα $>10^2$ CFU/g) και σε 2.5% (2618) δειγμάτων τυριών από παστεριωμένο γάλα (μέχρι και 20 CFU/g, Little et al., 2008).

1.2.4. Λιστερίωση στον άνθρωπο

1.2.4.1. Συμπτωματολογία της νόσου

Η λιστερίωση στον άνθρωπο εμφανίζεται με τις εξής κλινικές μορφές: (i) Ως ήπια περιγεννητική λοίμωξη, που δεν απαιτεί θεραπευτική αγωγή και μοιάζει με την κλινική εικόνα της γρίπης. Όταν η λοίμωξη λαμβάνει χώρα ενδομητρικά, παρατηρούνται αποβολές και γέννηση

θνησιγενών και σηψαιμικών νεογνών, ενώ όταν λαμβάνει χώρα κατά την ώρα του τοκετού, τα νεογνά παρουσιάζουν λοίμωξη του νευρικού συστήματος και ιδιαίτερως των μηνίγγων. (ii) Ως λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος, με συμπτωματολογία μηνιγγίτιδας, εγκεφαλίτιδας και παρουσία εγκεφαλικών αποστημάτων. Είναι συχνή η βακτηριαμία, συνήθως στις εγκύους, ενώ λιγότερο συχνά παρατηρείται ενδοκαρδίτιδα. Τοπικού χαρακτήρα λοιμώξεις των οφθαλμών και του δέρματος σχετίζονται με συγκεκριμένα επαγγέλματα (όπως κτηνιάτρους, εκδοροσφαγείς κ.α.). Σε γενικές γραμμές, ο χρόνος επώασης της λιστερίωσης στους ενήλικες κυμαίνεται από λίγες ημέρες μέχρι κι εβδομάδες, η διάρκεια της νόσου είναι 2-3 εβδομάδες και παρουσιάζει θνητότητα 20-30% (ανοσοκατεσταλμένα άτομα, Walls και Buchanan, 2005, Lianou και Sofos, 2007).

1.2.4.2. Παράγοντες προδιάθεσης

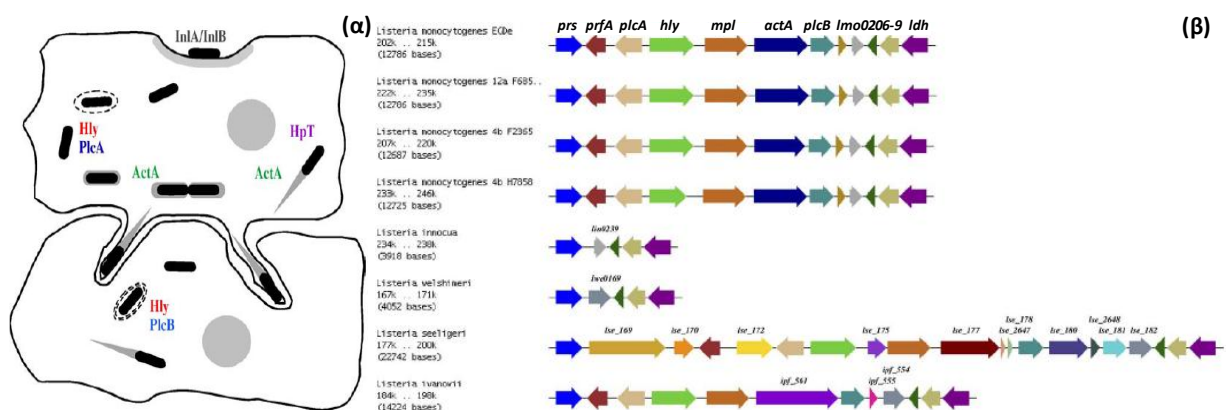
Η ευρεία διάδοση της *L. monocytogenes* στο περιβάλλον και τις τροφές, οδηγεί στην υπόθεση ότι οι υγιείς καταναλωτές ενδέχεται να προσλαμβάνουν ακόμα και καθημερινά κύτταρα του μικροοργανισμού, χωρίς όμως αυτά να προκαλούν τη νόσο. Παρά το γεγονός ότι η παθογένεια της νόσου παραμένει σε κάποιο βαθμό ασαφής, φαίνεται ότι η εμφάνισή της σχετίζεται με μερική ανεπάρκεια των T-λεμφοκυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Ορισμένοι από τους παράγοντες που προδιαθέτουν στην εμφάνιση της νόσου είναι η ηλικία (παιδιά μικρής ηλικίας και ηλικιωμένοι), η χρήση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, ανοσολογικής φύσης ανεπάρκειες (προσβεβλημένοι από HIV ή κακοήθεις νεοπλασίες, αλκοολικοί, διαβητικοί, η εγκυμοσύνη κ.α., Kathariou, 2002, Lianou και Sofos, 2007).

1.2.4.3. Δόση

Αν και ο ακριβής αριθμός των κυττάρων που απαιτούνται για να προκληθεί τροφιμογενής νόσος παραμένει άγνωστος θεωρείται ότι πρόσληψη λιγότερων από 1.000 κύτταρα επαρκεί για να επιτρέψει την κλινική εκδήλωση της νόσου σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Σε γενικές γραμμές, υψηλός αριθμός κυττάρων επιτρέπει στον παθογόνο να ξεπεράσει το εμπόδιο του όξινου περιβάλλοντος του στομάχου, να προσκολληθεί στο έντερο και να υπερνικήσει τους τοπικούς μηχανισμούς άμυνας του εντέρου. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κλινική εκδήλωση της νόσου εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων, ανάμεσα στους οποίους οι δύο πλέον σημαντικοί είναι το βακτηριακό στέλεχος και η ευαισθησία του ξενιστή. Συγκεκριμένα, ενδέχεται υγιείς άνθρωποι να καταναλώνουν τρόφιμα που περιέχουν κύτταρα της *L. monocytogenes*, χωρίς να εκδηλώνουν συμπτώματα της νόσου, ενδεχομένως λόγω της ύπαρξης ευαισθητοποιημένων T-λεμφοκυττάρων στα *Listeria spp.*, ως αποτέλεσμα της προηγούμενης υποκλινικής λοίμωξης από τον μικροοργανισμό (Farber και Peterkin, 1991).

1.2.4.4. Ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής της *L. monocytogenes*

Η εισβολή της *L. monocytogenes* στα κύτταρα των ξενιστών του, η λύση και ο πολλαπλασιασμός του σε αυτά και τέλος η εξάπλωσή του σε γειτονικά κύτταρα, χωρίς την εκ νέου επαφή του με στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος, βασίζεται στην δράση συγκεκριμένων παραγόντων παθογένειας (Σχ. 1.2., Hain et al., 2006). Οι παράγοντες είναι συνήθως πρωτεΐνες, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια στα διάφορα στάδια του ενδοκυτταρικού κύκλου. Στο πρώτο στάδιο της εισβολής, οι δύο πρωτεΐνες που λαμβάνουν μέρος είναι η ιντερναλίνη Α (InlA) και η ιντερναλίνη Β (InlB), οι οποίες βοηθούν τον παθογόνο να εισέλθει στα ευκαριωτικά κύτταρα των ξενιστών (π.χ. ηπατικά, επιθηλιακά, Orndorff et al., 2006). Στη συνέχεια η λιστεριοσύνη Ο (LLO), μία κυτολυσίνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *hly*, σε συνεργασία συνήθως με δύο φωσφορολιπάσες C (της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης, PI-PLC και της φωσφατιδυλο-χολίνης, PC-PLC, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *plcA* και *plcB*), ενεργοποιεί την απόδραση του βακτηρίου από το κενοτόπιο, που δημιουργείται κατά την είσοδό του στο κύτταρο (Hains et al., 2006).



Σχήμα 1.2. (α) Σχηματική απεικόνιση του ενδοκυτταρικού κύκλου ζωής της *L. monocytogenes*, των παραγόντων παθογένειας που σχετίζονται με διαδικασία της κυτταρικής εισβολής και λοίμωξης και (β) του συμπλέγματος των παθογόνων γονιδίων της *L. monocytogenes* EGD-e και των ομολόγων του στο γένος *Listeria*. Τα γονίδια του ίδιου χρώματος έχουν >50% ομοιότητα, με βάση την ανάλυση blastp και >75% κάλυψη στο μέγεθος των πρωτεϊνών (Hain et al., 2006).

Η κίνηση του παθογόνου μέσα στο κύτταρο επιτυγχάνεται με τον πολυμερισμό της ακτίνης, από την επιφανειακή πρωτεΐνη ActA, ενώ η λεκιθινάση λύει την μεμβράνη του κενοτοπίου. Στον πολλαπλασιασμό του παθογόνου συμβάλει ο μεταβιβαστής της φωσφορικής εξόζης (HrpT, Orndorff et al., 2006). Στο τελευταίο στάδιο μεταφοράς του παθογόνου στα γειτονικά κύτταρα συνεισφέρουν εκ νέου οι πρωτεΐνες του δεύτερου σταδίου (LLO, PlcA, PlcB), βοηθώντας το βακτήριο να αποδράσει

από την διπλή πλέον μεμβράνη που σχηματίζεται γύρω του όταν ο πολυμερισμός της ακτίνης το μεταφέρει, μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, από το ένα κύτταρο στο άλλο (Σχ. 1.2.α, Liu, 2006, Orndorff et al., 2006).

Από αναλύσεις σε στελέχη της *L. monocytogenes* για την ύπαρξη των γονιδίων παθογένειας, έχει βρεθεί ότι υπάρχουν στο σύνολο των στελεχών (Hains et al., 2007). Αντίθετα στην σύγκριση μεταξύ ενός από τα πλήρως αλληλουχημένα στελέχη *L. monocytogenes* (EGD-e) με το είδος *L. innocua* παρατηρήθηκε ότι στο δεύτερο απουσίαζαν σημαντικά συμπλέγματα γονιδίων, καθώς και πρωτεϊνών (παραγόντων) παθογένειας (Σχ. 1.2.β, Hains et al., 2007). Σαν κύριος ρυθμιστής των γονιδίων παθογένειας, περισσότερα από τα οποία βρίσκονται στο ίδιο σύμπλεγμα (LIP1-1), έχει ταυτοποιηθεί ο παράγοντας PrfA (γονίδιο *prfA*, Σχ 1.2.β, Liu, 2006, Hains et al., 2006). Δευτερεύοντα ρόλο στην ρύθμιση των παθογόνων γονιδίων διαδραματίζει ο παράγοντας σ^B με τον έλεγχο της μεταγραφής των πρωτεϊνών εισόδου (InlA και InlB) και ο παράγοντας σ^{54} με την ρύθμιση γονιδίων σχετικών με τον μεταβολισμό πηγών άνθρακα και αζώτου, την σύνθεση μαστιγίων και την παθογένεια (Hains et al., 2006). Οι εξωτερικοί και εσωτερικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη ή την επιβίωση του παθογόνου, όπως είναι η θερμοκρασία (υψηλές, χαμηλές), το pH, η ενεργότητα ύδατος, μικροβιακός ανταγωνισμός, αντιμικροβιακοί παράγοντες, φαίνεται ότι επηρεάζουν και τους παράγοντες παθογένειάς του και κατά συνέπεια την νοσογόνο ικανότητά του (Hill et al., 2002, Kathariou, 2002, Sergelidis και Abraham, 2009).

1.2.4.5. Επιδημιολογία

Η λιστερίωση είναι μια σχετικά σπάνια τροφιμογενής νόσος, με υψηλά ωστόσο ποσοστά θνητότητας. Το μεγαλύτερο ποσοστό των καταγεγραμμένων επιδημιών λιστερίωσης (outbreaks) εμφανίστηκαν στην Ευρώπη (Δυτική και Κεντρική) και την Βόρεια Αμερική. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση πληθυσμού στις προαναφερθείσες περιοχές, ιδιαίτερα σε μεγαλουπόλεις, στις οποίες η πρόσβαση στην τροφή γίνεται κατά κύριο λόγο σε καταστήματα λιανικής πώλησης, η αυξημένη επαγρύπνηση της επιστημονικής κοινότητας και της βιομηχανίας, καθώς και στην περισσότερο λεπτομερή (συγκριτικά με άλλες περιοχές) καταγραφή των νοσούντων. Στην ακριβέστερη καταγραφή των επιδημιών συμβάλει καθοριστικά η ανάπτυξη κατάλληλων μοριακών τεχνικών (PFGE) και δικτύων (PulseNet), με τις οποίες μπορούν να ταυτοποιηθούν τα εμπλεκόμενα στελέχη του παθογόνου, απομονωμένα από τους νοσούντες ακόμα και από απομακρυσμένες μεταξύ τους περιοχές (Kathariou, 2002). Με τις ίδιες τεχνικές μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί ο εντοπισμός της πηγής της επιδημίας σε μία βιομηχανία ή φάρμα (βιοϊχνηλασιμότητα, Borucki et al., 2005, Gaulin et al., 2012). Επιπλέον, δίκτυα και οργανισμοί άμεσης ειδοποίησης, όπως το *FoodNet* στις ΗΠΑ (<http://www.cdc.gov/foodnet/>), το *Eurosurveillance*

του ECDC στην Ευρώπη (<http://www.eurosurveillance.org/>) και ο ΕΦΕΤ στην Ελλάδα (http://www.efet.gr/portal/page/portal/efetnew/alarms/view_alarms) συμβάλουν στην ταχεία κοινοποίηση ύποπτων κρουσμάτων και των προϊόντων που εμπλέκονται στο ευρύ κοινό, συνδράμοντας στον περιορισμό της έκτασής τους.

Οι πιο πρόσφατες καταγεγραμμένες επιδημίες λιστερίωσης αφορούν στην πλειοψηφία τους τυροκομικά προϊόντα και ιδιαίτερα φρέσκα μαλακά τυριά. Συγκεκριμένα, το 2008 αναφέρθηκαν 38 περιπτώσεις λιστερίωσης στο Κεμπέκ, μια περιφέρεια του Καναδά, μεταξύ των οποίων 14 έγκυες και 2 νεογνά, οι οποίες αποδόθηκαν σε μαλακό τυρί παρασκευασμένο από παστεριωμένο γάλα (Gaulin et al., 2012). Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά την επιδημία παρατηρήθηκε εκτεταμένη διασταυρούμενη επιμόλυνση στα καταστήματα πώλησης των τυριών, ενώ έπειτα από την ανάκλησή τους, καθώς και όλων των προϊόντων που ήρθαν σε επαφή με αυτά, παρατηρήθηκε απότομη μείωση της εμφάνισης κρουσμάτων που συσχετιζόνταν με το συγκεκριμένο στέλεχος (LM P93, Gaulin et al., 2012). Αντίστοιχα, μεταξύ 2009-2010 παρουσιάστηκαν 34 κρούσματα λιστερίωσης σε Αυστρία, Γερμανία και Τσεχία, τα οποία αποδόθηκαν στο τυρί quargel, ένα μαλακό τυρί από ξινό γάλα που παράγεται στην Αυστρία (ECDC, 2011, Schoder et al., 2013). Το 2011, 147 άτομα νόσησαν από το βακτήριο (33 θάνατοι, 1 αποβολή) σε 28 πολιτείες των ΗΠΑ εξαιτίας της κατανάλωσης ενός είδους πεπονιού (whole cantaloupe) καλλιεργημένο σε φάρμες του Κολοράντο (CDC, 2012a). Το 2012 καταγράφηκε μια επιδημία λιστερίωσης στις ΗΠΑ, η οποία περιελάμβανε 22 κρούσματα (4 θάνατοι) σε 14 πολιτείες, έπειτα από κατανάλωση μαλακού τυριού ρικόττα, παρασκευασμένο στην Ιταλία (CDC, 2012b). Η τελευταία επιδημία παρουσιάστηκε στις ΗΠΑ μέσα στο 2013, κατά την οποία 6 άτομα νόσησαν (1 θάνατος, 1 αποβολή) σε 5 πολιτείες έπειτα από κατανάλωση ημίκληρων τυριών ωρίμασης παρασκευασμένων από παστεριωμένο γάλα σε τυροκομείο του Ουισκόνσιν (CDC, 2013). Στην Ελλάδα τα καταγεγραμμένα κρούσματα λιστερίωσης ανά έτος κυμάνθηκαν από 1 (2008) μέχρι και 10 (2007 και 2010), ενώ σημαντικό ποσοστό των νοσούντων ήταν άτομα >65 ή 0-4 χρονών (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012).

1.2.5. Ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού σε περιβαλλοντικούς παράγοντες

1.2.5.1. Επίδραση της θερμοκρασίας

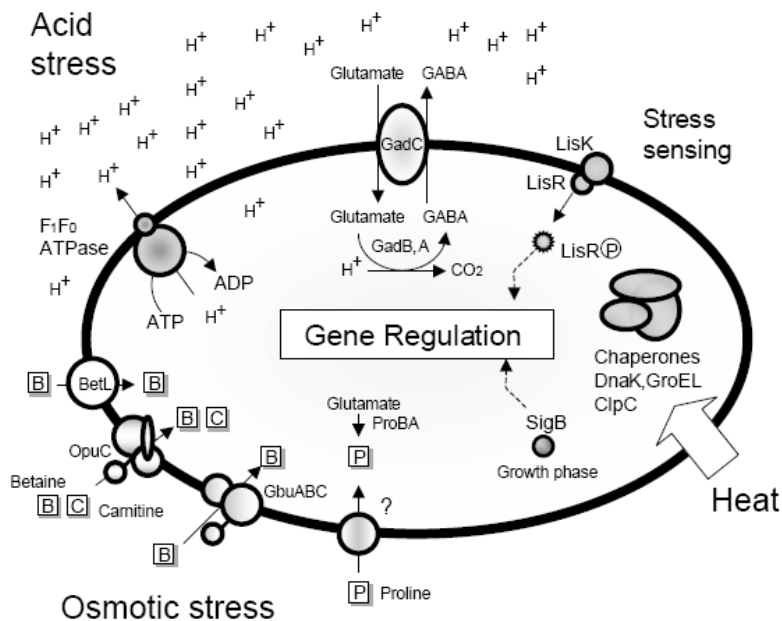
Το εύρος των θερμοκρασιών που αναμένεται να αυξηθεί ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* είναι από 0°C έως 42°C με άριστες θερμοκρασίες ανάμεσα στους 30°C και 37°C. Όσο μειώνεται η θερμοκρασία περιβάλλοντος, μειώνεται σημαντικά ο ρυθμός αύξησής του, ενώ αντίθετα αυξάνεται η διάρκεια της φάσης προσαρμογής και ο χρόνος διπλασιασμού του (Adams and Moss, 2000). Ως κατώτερο όριο θερμοκρασίας, που επιτρέπει την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, έχουν αναφερθεί τιμές θερμοκρασίας από 0,5°C έως 5,0°C, κατά την καλλιέργεια του παθογόνου μικροοργανισμού σε

μικροβιολογικά θρεπτικά υποστρώματα (Duh και Schaffner, 1993, Gill et al., 1997) και από 3°C έως >5°C σε τρόφιμα (Membré et al., 1997, Ross et al, 2000). Στην βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για ανάπτυξη του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε θερμοκρασίες μικρότερες από 0°C, τόσο σε εργαστηριακά υποστρώματα (Bajard et al., 1996), όσο και σε τρόφιμα, που είχαν συντηρηθεί σε συνθήκες κενού (Hudson et al., 1994). Οι αποκλίσεις αυτές, ενδεχομένως να αποδίδονται σε σημαντικές διαφορές φυσιολογίας ανάμεσα στα στελέχη του μικροοργανισμού, σε ιδιαίτερες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά, κατά την καλλιέργειά του σε χαμηλές θερμοκρασίες ή τέλος στην παραλλακτικότητα της φυσιολογικής κατάστασης του αρχικού πληθυσμού, που επηρεάζουν την ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης (Ross et al, 2000). Επιπλέον έχει αναφερθεί, ότι η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης για κύτταρα της *L. monocytogenes*, που έχουν προηγουμένως καλλιεργηθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες, είναι μειωμένη σε σχέση με τα αντίστοιχα που έχουν αυξηθεί σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος (Whiting και Bagi, 2002). Κατά την συντήρηση των τροφίμων σε θερμοκρασίες κατάψυξης δύναται να παρατηρηθεί επιβίωση του πληθυσμού των κυττάρων του παθογόνου ή μείωσή του, ανάλογα με στέλεχος και το υπόστρωμα (Parageorgiou et al., 1997, Gougouli et al., 2008). Η ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στις χαμηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνεται μέσω της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης των συμβατών διαλυτών ενώσεων γλυκίνη-βεταΐνη και καρνιτίνη (Angelidis et al., 2002).

Η συμπεριφορά της *L. monocytogenes* έναντι των υψηλών θερμοκρασιών είναι αντίστοιχη με των υπολοίπων μη σποριογόνων Gram θετικών βακτηρίων, με τιμές θανάτωσης του 1/10 του πληθυσμού (D_T value) στους 60°C μερικά λεπτά και στους 70°C μερικά δευτερόλεπτα (Adams and Moss, 2000). Στην περίπτωση τις εφαρμογής υψηλών θερμοκρασιών παρατηρείται, όπως και στις χαμηλές θερμοκρασίες, παραλλακτικότητα της συμπεριφοράς του μικροοργανισμού ανάλογα με την φυσιολογία των κυττάρων, ιδιαίτερα στην περίπτωση που έχουν υποστεί θερμοκρασιακή ή διαφορετική καταπόνηση (Sergelidis και Abraham, 2009). Αντίστροφα, η έκθεση σε υποθανάτιες υψηλές θερμοκρασίες (45-50°C) ενδέχεται να προκαλέσει ανθεκτικότητα του βακτηρίου σε θερμοκρασίες καταπόνησης ή διαφορετικές καταπονήσεις, όπως η όξινη και η ωσμωτική (Lin και Chou, 2004, Skandamis et al., 2008). Η αύξηση της ανθεκτικότητας οφείλεται σε ειδικές πρωτεΐνες (HSPs), οι οποίες εκφράζονται εξαιτίας ενδοκυτταρικών μηχανισμών που πυροδοτούνται μετά από μία θερμοκρασιακή καταπόνηση. Οι πρωτεΐνες θερμοκρασιακής καταπόνησης (GroES, GroEL, DnaK) δρουν προστατευτικά έναντι της αποδόμησης των πρωτεϊνών του κυττάρου λόγω της θέρμανσης (Hill et al., 2002). Σε γενικές γραμμές ωστόσο, δεν θεωρείται ιδιαίτερα θερμοάντοχος μικροοργανισμός και η συνήθης παστερίωση που εφαρμόζεται στην βιομηχανία γάλακτος θανατώνει τα αναμενόμενα επίπεδάτου στο νωπό γάλα.

1.2.5.2. Επίδραση της οξύτητας και του pH

Το pH είναι ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των υδρογονοκατιόντων σε ένα διάλυμα και αποτελεί μέτρο της οξύτητας ή της αλκαλικότητας του εν λόγω διαλύματος. Το ελάχιστο όριο της τιμής του pH, που επιτρέπει την αύξηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes*, εξαρτάται από τον αριθμό των κυττάρων του αρχικού πληθυσμού, το είδος του οξέος που χρησιμοποιείται και τη θερμοκρασία. Παρά το γεγονός ότι η ανάπτυξη των περισσότερων στελεχών αναστέλλεται σε τιμές pH μικρότερες από 5,5, υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ως ελάχιστο όριο τιμές pH από 4,4 έως 5,6 (Adams and Moss, 2000), ενώ σαν όριο επιβίωσης τιμές <4. Η επιβίωση του παθογόνου σε συνθήκες όξινης καταπόνησης πραγματοποιείται είτε μέσω σύνθεσης πρωτεϊνών (GroEL) ή μέσω του μηχανισμού διατήρησης της ομοιόστασής του με μεταφορά πρωτονίων από το περιβάλλον με την υδρόλυση του ATP με τη βοήθεια του ενζύμου (αντι-μεταφορέα, H⁺-ATPάση (Σχ. 1.3, Hill et al., 2002, Gandhi και Chikindas, 2007).



Σχήμα 1.3. Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών που ενεργοποιούνται, με σκοπό την προστασία του κυττάρου, παρουσία διαφορετικών καταπονήσεων (Hill et al., 2002).

Ανάμεσα στα διάφορα οξέα, που συνήθως χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία για την μείωση του pH (οξικό, γαλακτικό, κιτρικό και υδροχλωρικό οξύ), το οξικό οξύ αποδεικνύεται ως το περισσότερο αποτελεσματικό απέναντι στη *L. monocytogenes* (Farber and Peterkin, 1991). Σε σχέση με την επίδραση των οργανικών οξέων στην ικανότητα που παθογόνου μικροοργανισμού να αυξάνεται, είναι γνωστό ότι, το επίπεδο της αναστολής, που τα οξέα αυτά προκαλούν, εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αδιάστατου τμήματος του οργανικού οξέος. Η θερμοκρασία του

περιβάλλοντος επιδρά σημαντικά στις χαμηλότερες τιμές pH ανάπτυξης του παθογόνου, οι οποίες αυξάνονται απότομα σε θερμοκρασίες <math><10^{\circ}\text{C}</math> ή $>35^{\circ}\text{C}$ (Tienungoon et al., 2000, Koutsoumanis et al., 2004). Ανάλογη μεταβολή των ορίων ανάπτυξης αναμένεται όταν στο περιβάλλον του μικροοργανισμού υπάρχει κάποιο υγροσκοπικό μέσο (π.χ. αλάτι, ζάχαρη) ή άλλα οργανικά οξέα (Tienungoon et al., 2000, Vermeulen et al., 2007).

1.2.5.3. Επίδραση της ενεργότητας ύδατος (a_w)

Ως ενεργότητα ύδατος ορίζεται ο λόγος της τάσης ατμών (σε ισορροπία) ενός υποστρώματος (p), προς την τάση ατμών του καθαρού ύδατος (p_0) στην ίδια θερμοκρασία ($a_w = p/p_0$). Σαν ελάχιστο όριο της τιμής της ενεργότητας του ύδατος, που επιτρέπει την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* αναφέρεται η 0.91, όταν ως υγροσκοπικό μέσο χρησιμοποιείται το NaCl. Αντίστοιχα, σε διαλύματα σακχαρόζης έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη σε τιμή ενεργότητας ύδατος a_w 0.92. Γενικά, η *L. monocytogenes* παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην ανασταλτική επίδραση του NaCl, αφού έχει την δυνατότητα να αυξάνεται σε συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου 10%, μέσω της συγκέντρωσης στο εσωτερικό του κυττάρου διαλυτών ωσμοπροστατευτικών ενώσεων (γλυκίνη-βεταΐνη, καρνιτίνη) από το περιβάλλον, διαδικασία που κωδικοποιείται από τα γονίδια *betL*, *oruC* και *gbu* (Σχ. 1.3, Angelidis και Smith, 2003, Hill et al., 2002). Όπως αναφέρθηκε και στην επίδραση του pH, η ικανότητα επιβίωσης του πληθυσμού της *L. monocytogenes* για μία συγκεκριμένη συγκέντρωση NaCl επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία και την οξύτητα του περιβάλλοντος (Tienungoon et al., 2000, Vermeulen et al., 2007).

1.2.5.4. Ατμόσφαιρες

Σε γενικές γραμμές, η πιθανότητα ανάπτυξης της *L. monocytogenes* δεν επηρεάζεται σημαντικά σε συνθήκες επώασης αναερόβιες ή μειωμένης αναλογίας οξυγόνου (Buchanan and Phillips, 1990). Αντίθετα, ο ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού του παθογόνου μειώνεται κατά τη συντήρηση των τροφίμων σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες, καθώς επηρεάζεται από την παρουσία του CO₂, ενώ η ανασταλτική αυτή επίδραση αυξάνεται κατά την συντήρηση του τροφίμου σε χαμηλές θερμοκρασίες (Ross et al., 2000, Mejlholm και Dalgaard, 2007).

1.2.6. Φυσιολογία της *L. monocytogenes*

Η *L. monocytogenes* βρίσκεται παντού στην φύση και μπορεί να απομονωθεί από διαφορετικές πηγές τόσο τροφίμων, όσο και επιφανειών. Ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που αντιμετωπίζει, οι οποίες τις περισσότερες φορές συνιστούν ήπιες ή ισχυρότερες καταπονήσεις (έλλειψη θρεπτικών συστατικών, οξέα, χαμηλές ή υψηλές θερμοκρασίες, υψηλή συγκέντρωση

άλματος, βαρέα μέταλλα κ.α.), ενεργοποιεί τους κατάλληλους μηχανισμούς έκφρασης γονιδίων, πάντα με στόχο την αποκατάσταση της κυτταρικής του ομοιόστασης (Aertsen and Michiels, 2002). Οι μεταγραφικές μεταβολές, εξαιτίας μιας καταπόνησης, αλλάζουν την φυσιολογία των κυττάρων. Ανάλογα με το είδος και την ισχύ της καταπόνησης, επηρεάζεται η ανθεκτικότητα (ή η ευαισθησία) του μικροοργανισμού σε επακόλουθες αντίστοιχες ή διαφορετικές καταπονήσεις. Συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν ότι η προϋπαρξη του παθογόνου σε pH 5.5 (για 1 ώρα) ευνοεί σημαντικά την μετέπειτα επιβίωσή του σε pH καταπόνησης 3.5 (Driscoll et al., 1996).



Σχήμα 1.4. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φυσιολογικών καταστάσεων ενός μικροβιακού κυττάρου, όταν αυτό υποβάλλεται σε διάφορες καταπονήσεις (stresses, **Yousef και Courtney, 2003**).

Η φυσιολογία των κυττάρων ενός μικροοργανισμού καθορίζεται από το είδος των εμποδίων που αναμένεται να συναντήσει κατά την επεξεργασία των τροφίμων, την συντήρηση και την εμπορία τους, την διαδικασία καθαρισμού και απολύμανσης ή λόγω των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των τροφίμων. Για τον λόγο αυτό, ενδεχομένως να απαντηθεί διαφορετική συμπεριφορά (κυρίως όσον αφορά την επιβίωση σε υποθανάτιες καταπονήσεις, αλλά και την κινητική του σε συνθήκες ανάπτυξης) ανάμεσα σε στελέχη της *L. monocytogenes* που έχουν απομονωθεί από κρέατα, τυριά, λαχανικά, επιφάνειες επεξεργασίας, εργαλεία ή νοσοκόμες (Katrhariou, 2002). Επιπλέον, η διαφοροποίηση στην φυσιολογία επέρχεται μετά από μακροχρόνια έλλειψη θρεπτικών συστατικών των κυττάρων (κατά την παραμονή τους σε επιφάνειες), όπου τα κύτταρα εισέρχονται σε μια κατάσταση που ονομάζεται "ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα" (viable but non culturable, VBNC), στην οποία δεν είναι γνωστό το κατά πόσο τα κύτταρα βρίσκονται σε μία μεταβατική κατάσταση προς τον θάνατό τους ή σε μια σταθερή κατάσταση που αποσκοπεί στην

επιβίωσή τους (Aertsen and Michiels, 2002). Ακόμα όμως και στην περίπτωση που τα κύτταρα κατά την ύπαρξή τους στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων δεν έχουν υποστεί λοιμό, διαφορετικές καταπονήσεις όπως η απολύμανση, τα οξέα και τα άλατα από τα τρόφιμα, αλλά και η συμμετοχή τους στην μορφολογία των βιοϋμενίων (Κεφ. 1.3), οδηγεί στην φυσιολογική τους διαφοροποίηση από τα πλαγκτονικά κύτταρα και κατά περιπτώσεις στην αυξημένη ανθεκτικότητά τους στους απολυμαντικούς παράγοντες (Chavant et al., 2004, Gandhi και Chikindas, 2007). Αντίστοιχες διαφοροποιήσεις στην φυσιολογία παρατηρούνται ανάμεσα στις διάφορες φάσεις ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Driscoll et al., 1996, Sergelidis και Abraham, 2009). Όταν τα κύτταρα βρίσκονται ξανά σε ευνοϊκές συνθήκες σε αιώρηση επανέρχονται, εν καιρώ, στην αρχική τους φυσιολογική κατάσταση (Σχ. 1.4.).

Σε αντίθεση με την επικρατούσα άποψη, ο πληθυσμός των κυττάρων ενός στελέχους δεν χαρακτηρίζεται από ομοιομορφία. Επομένως, όταν το στέλεχος βρεθεί σε περιβάλλον καταπόνησης, ανάλογα με την ισχύ της, ένα ποσοστό των κυττάρων ενδέχεται να θανατωθεί, ένα άλλο να τραυματιστεί αλλά να επιβιώσει, ενώ ορισμένα κύτταρα ενδεχομένως να μην επηρεαστούν. Προς αυτή την κατεύθυνση, αυξανόμενο είναι το ενδιαφέρον για τον έλεγχο της φυσιολογίας (και της συμπεριφοράς) των μεμονωμένων κυττάρων ενός στελέχους (Koutsoumanis, 2008). Εντούτοις, συχνό είναι και το φαινόμενο συνεργασίας των κυττάρων, έναντι των καταπονήσεων, μετά από μεταξύ τους επικοινωνία (μέσω κατάλληλων χημικών ενώσεων), μια διαδικασία γνωστή σαν αίσθηση απαρτίας (quorum sensing, Gobetti et al., 2007). Μέσω της παραγωγής κι εκπομπής μικρών χημικών μορίων, τα κύτταρα με μια σειρά από μηχανισμούς, όπως η έκφραση κατάλληλων γονιδίων, η δημιουργία βιοϋμενίων, η βιοφωταύγεια, η έκφραση τοξικότητας, η σποριογόνιση κ.α., καταφέρνουν να αντιμετωπίσουν τους εξωτερικούς κινδύνους και να επιβιώσουν, παρεκκλίνοντας ωστόσο από την αρχική φυσιολογική τους κατάσταση (Morton et al., 1998, Bower και Daeschel, 1999, Gandhi και Chikindas, 2007).

Έχοντας ως δεδομένο ότι η φυσιολογία ενός μικροοργανισμού επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως αυτοί αναφέρθηκαν ανωτέρω, ενώ παράλληλα αναμένεται να επηρεάσει την συμπεριφορά του, ανάλογα και με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται, σημαντικό μέρος της παρούσας διατριβής αφιερώθηκε στην διερεύνηση αυτού του φαινομένου: της επίδρασης της φυσιολογίας των κυττάρων της *L. monocytogenes* στην ικανότητά του να επιβιώνει ή να αυξάνεται σε περιβάλλοντα και διεργασίες που χαρακτηρίζουν την παραγωγή τυροκομικών προϊόντων. Το ενδιαφέρον της μελέτης έγκειται στο ότι τα αποτελέσματά της συνδέονται άμεσα με την βιοιχνηλασιμότητα. Συγκεκριμένα, η γνώση της φυσιολογίας του παθογόνου και της συμπεριφοράς του έναντι των εμποδίων που συναντά στην βιομηχανία τροφίμων, μπορεί να βοηθήσει στην σύνδεση ενός επιδημικού στελέχους με το τμήμα της γραμμής παραγωγής από το οποίο προήλθε,

με αποτέλεσμα την ανάπτυξη των κατάλληλων διορθωτικών διαδικασιών για την έγκαιρη αντιμετώπιση ή τον έλεγχο της επιμόλυνσης (Kathariou, 2002, Reij και Aantrekker, 2004).

1.2.7. Επίδραση της βιοχημείας και μικροβιολογίας των γαλακτοκομικών προϊόντων στην *L. monocytogenes*

Σημαντικό ρόλο στα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά γαλακτοκομικών προϊόντων, ιδιαίτερα των τυροκομικών, διαδραματίζουν οι μικροοργανισμοί που είτε υπάρχουν στο γάλα ή χρησιμοποιούνται κατά την τεχνολογία παραγωγής τους. Η μικροβιακή ποικιλότητα, στην οποία δύνανται να συμπεριλαμβάνονται τόσο βακτήρια, όσο και ζύμες ή μύκητες, είναι επιθυμητή, ιδιαίτερα στα παραδοσιακά τρόφιμα, επειδή τους προσδίδει τα μοναδικά τους οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Samelis et al., 2009). Τα δύο πλέον χρησιμοποιούμενα βακτήρια είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια *Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*, τα οποία αποτελούν την εναρκτήρια καλλιέργεια κατά την παρασκευή των περισσότερων τυριών ζύμωσης και της γιαούρτης (SLAB, Irlinger και Mounier, 2009). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια μέσα από την μεταβολική τους δραστηριότητα παράγουν οργανικά οξέα, τα οποία δρουν βακτηριοστατικά μέσω της μείωσης του pH του τροφίμου. Άλλα βακτήρια, που μπορούν να υπάρχουν φυσικά ή μετά από επιμόλυνση στα γαλακτοκομικά προϊόντα, είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια εκτός της αρχικής καλλιέργειας (NSLAB), που ανήκουν συνήθως στα γένη *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* κ.α., τα κολοβακτηριοειδή, τα εντεροβακτήρια, τα σπορογόνα βακτήρια (*Bacillus*) και παθογόνα όπως το *E. coli* 0157:H7, ο *L. monocytogenes*, ο *S. aureus*, τα *Salmonella* spp. κ.α (Manolopoulou et al., 2003, Angelidis et al., 2006, Ledenbach και Marshall, 2009). Οι αλληλεπιδράσεις των βακτηρίων της ενδογενούς χλωρίδας (μη παθογόνου) των τροφίμων με τα παθογόνα, έχει συνήθως σαν αποτέλεσμα την μείωση ή την εξάλειψη των τελευταίων (Irlinger και Mounier, 2009). Ιδιαίτερα τα οξυγαλακτικά βακτήρια, εκτός από την παραγωγή οξέων και την μείωση του pH, παράγουν βιομόρια με ανασταλτικό για την ανάπτυξη των παθογόνων χαρακτήρα, τις βακτηριοσίνες (Giannou et al., 2009). Οι ζύμες και οι μύκητες μπορούν να εμφανιστούν είτε μέσα από την προσθήκη τους στην παρασκευή ορισμένων τύπων τυριών (π.χ. Roquefort, smear cheeses) ή μετά από επιμόλυνσή τους από το περιβάλλον (Irlinger και Mounier, 2009). Οι ζύμες και οι μύκητες εξαιτίας της κατανάλωσης των οργανικών οξέων και την παραγωγή αμινομάδων, ευνοούν την επιβίωση της *L. monocytogenes* και κατά περιπτώσεις την αύξησή του, μέσω της αύξησης του αρχικά απαγορευτικού pH (Belessi et al., 2008).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να ειπωθεί ότι τα εμπόδια (hurdles) από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τυριών, όπως διαμορφώνονται από την τεχνολογία παρασκευής και την δράση των μικροοργανισμών, είναι ικανά (σε συνδυασμό με τις θερμοκρασίες ψύξης) να περιορίσουν την

ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών ή ακόμα και να τους θανατώσουν (Millet et al., 2006). Προς αυτή την κατεύθυνση ερευνάται το κατά πόσο μπορεί να πραγματοποιηθεί επαρκής έλεγχος της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* σε τυριά που παρασκευάζονται από νωπό ή θερμισμό γάλα και χαίρουν ιδιαίτερης αποδοχής από τους καταναλωτές, λόγω της υψηλής ποιότητας των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών (Millet et al., 2006, Little et al., 2008, Samelis et al., 2009).

1.2.8. Αντιμετώπιση της *L. monocytogenes*

Παρά την ευρεία διάδοση του παθογόνου μικροοργανισμού στη φύση, θεωρείται ότι η πολύ συχνή παρουσία του στα τρόφιμα, σχετίζεται με επιμολύνσεις των προϊόντων κατά την διάρκεια της παραγωγής και μεταφοράς τους, όπως και κατά τον χειρισμό τους από τους καταναλωτές. Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που συνεισφέρουν στην επιμόλυνση των τροφίμων είναι ικανότητα του παθογόνου να σχηματίζει βιοϋμένια σε βιοτικές ή αβιοτικές επιφάνειες, ως μηχανισμό απόκρισης έναντι στις καταπονήσεις του περιβάλλοντος και των τροφίμων (Wilks, et al., 2006). Η επικινδυνότητα αυξάνεται όταν η επιμόλυνση συμβεί σε στάδια που έπονται της θερμικής επεξεργασίας, λόγω της ικανότητάς του να επιβιώνει για μακρά χρονικά διαστήματα σε ένα τρόφιμο, ακόμα και σε θερμοκρασίες ψύξης ή κατάψυξης, εφόσον προστατεύεται αποτελεσματικά από τα συστατικά του τροφίμου (Gougouli et al., 2008, Sergelidis και Abraham, 2009). Για την αντιμετώπιση του προβλήματος, σημαντική είναι η υιοθέτηση κι η εφαρμογή των κανόνων ορθής υγιεινής πρακτικής και του κατάλληλου συστήματος HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points), για κάθε στάδιο κατά μήκος της παραγωγικής διεργασίας, από την παραλαβή των πρώτων υλών μέχρι και την κατανάλωσή τους, με σκοπό τον έλεγχο του παθογόνου μικροοργανισμού και τη διασφάλιση της υγιεινής των τροφίμων (Walls και Buchanan, 2005). Στα πλαίσια των συστημάτων HACCP καθορίζονται ρητά τα όρια ασφάλειας των αρχικών προϊόντων, οι διαδικασίες καθαριότητας και εξυγίανσης των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα, ενώ προβλέπεται η διαρκής ενημέρωση και εκπαίδευση του προσωπικού στον ορθό τρόπο χειρισμού των τροφίμων σε κάθε στάδιο της παραγωγής τους (Lianou και Sofos, 2007). Λόγω της σταθερής παρουσίας κρουσμάτων λιστερίωσης σε παγκόσμιο επίπεδο, η βιομηχανία τροφίμων είναι διαρκώς σε επιφυλακή για την ύπαρξη της *L. monocytogenes* στις εγκαταστάσεις ή την πρώτη ύλη (σφάγια, γάλα, λαχανικά κ.α.). Εντούτοις, η δυνατότητα της πλήρους εξάλειψης του κινδύνου εμφάνισης του παθογόνου σε ένα τρόφιμο συναντά περιορισμούς (Walls και Buchanan, 2005). Για αυτό το λόγο, υιοθετείται κι εφαρμόζεται ένα σύνολο εμποδίων ενάντια στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, τόσο κατά την παραγωγή (οξύτητα, αλατότητα, αντιμικροβιακά) όσο και κατά την μεταφορά του (ψύξη, συσκευασία), ώστε ακόμα και τρόφιμα που έχουν επεξεργαστεί με ήπιες θερμικές διεργασίες να διατηρούν την ασφάλειά τους.

Μια νέα τάση αντιμετώπισης της *L. monocytogenes* είναι η ηθελημένη συνύπαρξή του με άλλους μικροοργανισμούς, συνήθως της οικογένειας των οξυγαλακτικών βακτηρίων (*Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* κ.α.), οι οποίοι πλέον του ανταγωνισμού τους με τον παθογόνο στα θρεπτικά στοιχεία του προϊόντος, παράγουν ένα σύνολο ενώσεων (οξέα, βακτηριοσύνες) με σημαντικές αντιμικροβιακές ιδιότητες (Garcí et al., 2004, Poirazi et al., 2007, Siafaras et al., 2008). Άλλες νέες μέθοδοι, των οποίων η ικανότητα να ελέγξουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* είναι προς εξέταση, είναι η ακτινοβόληση, η εφαρμογή υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης και η ενεργή συσκευασία παρουσία φυσικών συνήθως αντιμικροβιακών ουσιών (π.χ. αιθέρια έλαια, Λιανου και Sofos, 2007). Επιπλέον, με την χρήση των υπολογιστικών μεθόδων, όπως είναι η Μικροβιολογία Πρόβλεψης, επιτυγχάνεται καλύτερη γνώση της συμπεριφοράς του παθογόνου ανάλογα με τις συνθήκες που αναμένεται να αντιμετωπίσει κατά την διάρκεια της παραγωγής και εμπορίας του, με αποτέλεσμα την ακριβέστερη εκτίμηση του κινδύνου. Το αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον και η πληθώρα των ερευνητικών μελετών που έχουν προκύψει τα τελευταία χρόνια, προσφέρουν το απαραίτητο γνωστικό υπόβαθρο, που χρειάζεται για τον αποτελεσματικότερο έλεγχο της *L. monocytogenes*.

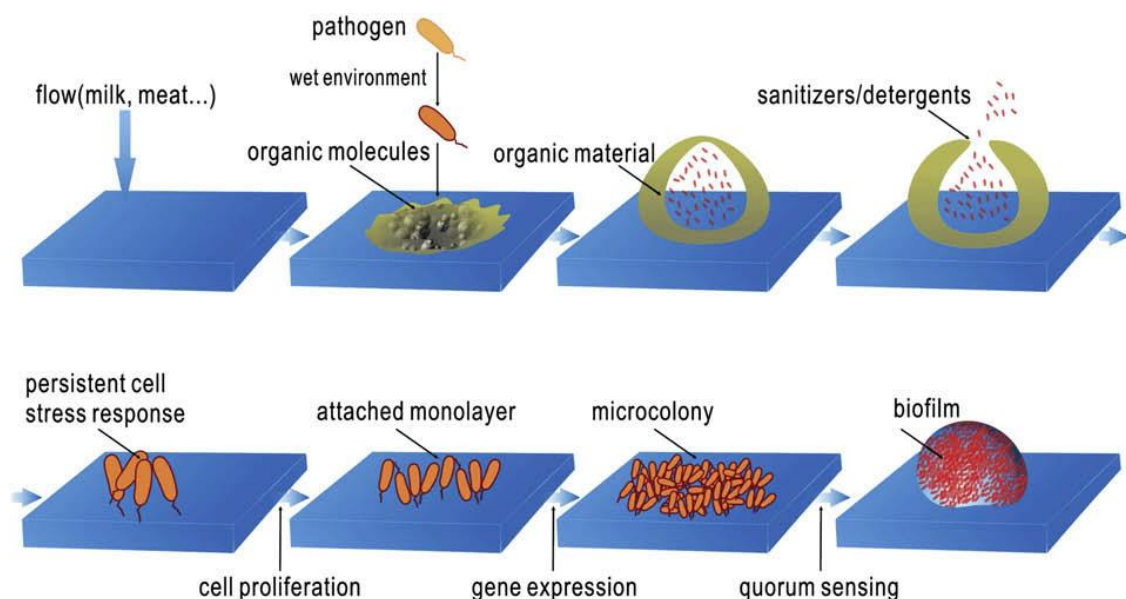
1.3. Βιοϋμένια

1.3.1. Εισαγωγή

Ως βιοϋμένια χαρακτηρίζονται οι μικροβιακές κοινότητες, ενός ή περισσότερων μικροοργανισμών, οι οποίες βρίσκονται προσκολλημένες σε μία επιφάνεια, συνήθως παρουσία οργανικής ύλης. Τα βιοϋμένια δύνανται να απαντηθούν σε οποιοδήποτε περιβάλλον υπάρχουν ζώντες μικροοργανισμοί, λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζονται σχεδόν σε όλα τα είδη επιφανειών, τόσο σε οργανικές (τρόφιμα, ζώα, άνθρωπος), όσο και σε ανόργανες (μέταλλα, γυαλί, πλαστικό κ.α.). Στην βιομηχανία τροφίμων συγκεκριμένα, εμφανίζονται σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων, στους χώρους αποθήκευσης, σε εργαλεία, μηχανήματα και εξαρτήματα της παραγωγικής διαδικασίας, όπως και σημεία που δεν έρχονται σε άμεση επαφή με τα τρόφιμα (πάτωμα, τοίχοι, υδρορροές, Kells και Gilmore, 2004). Η προσκόλληση μικροοργανισμών στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων, ανάλογα με το είδος τους, οδηγεί στην υποβάθμιση τόσο της ποιότητας όσο και της ασφάλειας των παραγόμενων προϊόντων, μέσω της διαρκούς επιμόλυνσης των τελευταίων κατά την επεξεργασία, γεγονός που απασχολεί άμεσα την βιομηχανία τροφίμων (Sharma και Anand, 2002).

Στην δομή του βιοϋμενίου τα ακινητοποιημένα βακτηριακά κύτταρα βρίσκονται ενσωματωμένα σε ένα σύνθετο σύστημα εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (extracellular polymeric substances, EPS), παρουσία νερού (Σχ. 1.5.). Ο κύκλος σχηματισμού των βιοϋμενίων ξεκινά με την εναπόθεση οργανικής ύλης σε μία επιφάνεια, η οποία μαζί με την ύπαρξη νερού δρα σαν υπόστρωμα ανάπτυξης των μικροοργανισμών (conditioning film), ενώ παράλληλα τροποποιεί τις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας (ηλεκτροστατικό φορτίο, υδροφοβικότητα), ευνοώντας την μετέπειτα προσκόλληση των κυττάρων (Hood και Zottola, 1997). Στη συνέχεια κύτταρα μικροοργανισμών προσεγγίζουν την επιφάνεια και το υπόστρωμα που έχει δημιουργηθεί, ενεργητικά ή παθητικά μέσω διάχυσης, βαρύτητας, δυναμικής ροής του μέσου ή της φυσικής τους κινητικότητας (μαστίγια), και σταδιακά προσκολλούνται σε αυτήν (Kumar και Anand, 1998). Στο πρώτο στάδιο προσκόλλησης οι φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων με το ανώτερο στρώμα της επιφάνειας και την οργανική ύλη είναι ηλεκτροστατικής φύσεως, δυνάμεις οξέος-βάσεως κατά Lewis ή δυνάμεις Van der Waals. Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα εξακολουθούν να έχουν κινητικότητα (κίνηση Brown), ενώ θεωρείται αναστρέψιμο μιας και μπορούν να αποκολληθούν με απλή έκπλυση. Στο δεύτερο στάδιο της προσκόλλησης οι ισχυρότερες δυνάμεις που λαμβάνουν χώρα, όπως δυνάμεις υδρογόνου, ομοιοπολικοί και ιονικοί δεσμοί, αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, καθώς και η ύπαρξη βιοσυνθετικών πολυμερών εξασφαλίζουν την μη αντιστρεπτή προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια. Την προσκόλληση

ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών και σχηματισμός μικροαποικίας, με παράλληλη ενίσχυση του στρώματος των εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών. Ο σχηματισμός του βιοϋμένιου λαμβάνει χώρα έπειτα από σταδιακή απόθεση μικροαποικιών του ίδιου ή διαφορετικών βακτηρίων σε στρώματα, με ενδιάμεση ύπαρξη εξωπολυσακχαρίτη. Στην τελική του κατάσταση το βιοϋμένιο χαρακτηρίζεται από ετερογενή σύσταση, ενώ οι μικροοργανισμοί σε αυτό βρίσκονται προστατευμένοι σε μικροαποικίες. Εκτός από τον εξωπολυσακχαρίτη, στην επιφάνεια του βιοϋμένιου υπάρχει και ποσότητα εξωκυτταρικού DNA (e-DNA, Kadam et al., 2013). Για την ολοκλήρωση του κύκλου, την ωρίμαση του βιοϋμένιου ακολουθεί η αποκόλληση και η διάχυση των κυττάρων εκ νέου σε πλαγκτονική μορφή. Η αποκόλληση των κυττάρων μπορεί να γίνει με παθητικό τρόπο, π.χ. μέσω της ροής των τροφίμων ή με ενεργητικό, με εσωτερικούς μηχανισμούς αποδέσμευσης. Τα αποδεσμευμένα κύτταρα μπορούν να δημιουργήσουν καινούρια βιοϋμένια. Η μελέτη της δομής των βιοϋμένιων πραγματοποιείται με το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες laser (C.L.S.M.), μία μη καταστρεπτική *in situ* μέθοδο ή με την χρήση γονιδίων αναφοράς που κωδικοποιούν φθορίζουσα πρωτεΐνη (G.F.P.). Οι παραπάνω μέθοδοι διευκολύνουν τόσο την ποιοτική όσο και την ποσοτική περιγραφή της δομής βιοϋμένιων που αποτελούνται από ένα ή περισσότερους μικροοργανισμούς (Γκιαούρης, 2008).

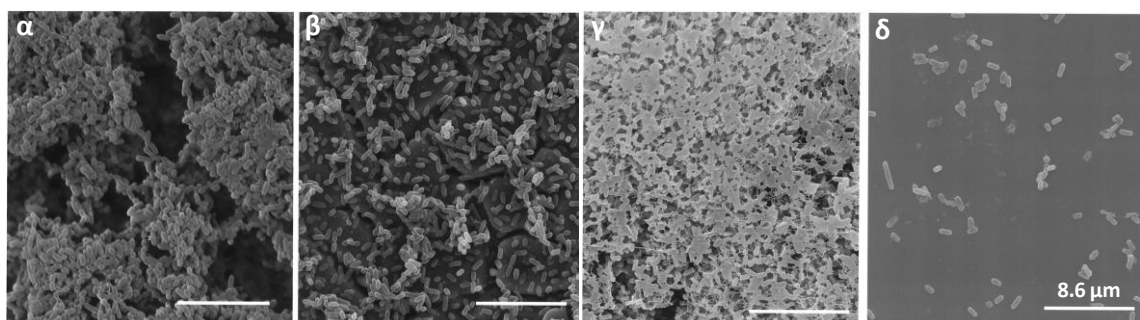


Σχήμα 1.5. Τρόπος σχηματισμού των βιοϋμένιων στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα. Αρχικά, οργανικά μόρια τροφίμων αποτίθενται στην επιφάνεια του εξοπλισμού σχηματίζοντας ένα υπόστρωμα, στο οποίο προσκολλούνται οι μικροοργανισμοί. Μετά από κύκλους καθαρισμού κι απολύμανσης, τα κύτταρα που παραμένουν πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν αρχικά την μικροαποικία και στη συνέχεια, μέσω έκφρασης γονιδίων και κυτταρικής επικοινωνίας, το βιοϋμένιο (Shi και Zhu, 2009).

Το είδος της επιφάνειας σχηματισμού του βιοϋμενίου είναι σημαντικό καθώς οι επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα λειτουργούν καλύτερα σαν υποστρώματα σε σχέση με επιφάνειες πολυμερών πλαστικών (PVC) ή γυαλιού (Σχ. 1.6.). Λόγω της σταθερής φύσης του, ο ανοξειδωτος χάλυβας χρησιμοποιείται ευρέως τόσο στην βιομηχανία τροφίμων όσο και σε σημεία χειρισμού των τροφίμων από τους καταναλωτές (εμπορικά και οικιακά, Wilks et al., 2006). Εντούτοις, φαίνεται να υπερτερεί στον σχηματισμό και την επιβίωση των βιοϋμενίων μεταξύ άλλων μετάλλων (χαλκός, μπρούτζος, νικέλιο, και κράματά τους), η χρήση των οποίων έχει προταθεί σαν ένα μέτρο αντιμικροβιακής προστασίας (Wilks et al., 2006).

1.3.1. Βιοϋμένια της *L. monocytogenes*

Η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να σχηματίζει βιοϋμένια, κατά την επαφή του με τις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων, γεγονός που του παρέχει προστασία έναντι των καταπονήσεων (Bower και Daeschel, 1999, Pan et al., 2010). Στελέχη του παθογόνου έχουν απομονωθεί από βιομηχανικές επιφάνειες, στις οποίες επιβιώνουν για χρόνια, επιμολύνοντας τα παραγόμενα προϊόντα. Τα στελέχη του παθογόνου διαφέρουν ως προς την ικανότητά τους να σχηματίζουν βιοϋμένια (Σχ. 1.6.). Οι διαφοροποιήσεις μεταξύ της ικανότητας των στελεχών να σχηματίζουν βιοϋμένια, έχουν αποδοθεί στα διαφορετικά lineages (Pan et al., 2010), στους ορότυπους (Borucki et al., 2003), στην φυσιολογική τους κατάσταση (Borucki et al., 2003) και στο σημείο απομόνωσής τους (Kadam et al., 2013). Στους παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα του βακτηρίου να σχηματίζει βιοϋμένια συμπεριλαμβάνονται η ύπαρξη ανταγωνιστικής χλωρίδας (Carpentier και Chassaing, 2004), η σύσταση του μέσου ή των υπολειμμάτων τροφίμων (Gram et al., 2007, Kadam et al., 2013), η θερμοκρασία του περιβάλλοντος (Mai και Conner, 2007, Kadam et al., 2013) και η αύξηση της παραγωγής μαστιγίων από τον παθογόνο (Poimenidou et al., 2009).



Σχήμα 1.6. Εικόνες από την ανάλυση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) του στελέχους *L. monocytogenes* M39503A (υψηλή ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου) σε επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα (α) και PVC (γ) και του στελέχους *L. monocytogenes* M35584A (χαμηλή ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου) σε επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα (β) και PVC (δ, Borucki et al., 2003).

Η ισχυρή προσκόλληση των βιοϋμενίων της *L. monocytogenes* στις επιφάνειες και η αυξημένη ανθεκτικότητά τους έναντι των καθαριστικών και απολυμαντών, καθιστά δύσκολη την επιτυχημένη εξάλειψή τους, ιδιαίτερα σε νεκρές περιοχές, κοιλότητες, και γενικά σε σημεία μη προσβάσιμα στην μηχανική καθαριότητα (Somers και Wong, 2004, Sofos και Geornaras, 2010). Σε μια βιομηχανία η οποία εφαρμόζει τις αρχές του συστήματος HACCP, η εφαρμογή των προαπαιτούμενων του είναι πρωταρχικής σημασίας. Εντούτοις, διαμορφώνοντας τα βακτήρια τον σχηματισμό του βιοϋμενίου, μπορούν να επιβιώσουν σε αυτόν προστατευμένα για χρόνια, διαγράφοντας διαρκώς κύκλους προσκόλλησης-σχηματισμού-αποκόλλησης. Σημαντικό ρόλο σε αυτό διαδραματίζει η αυξημένη ανθεκτικότητα του βιοϋμενίου της *L. monocytogenes* έναντι των αντιμικροβιακών πρακτικών της βιομηχανίας τροφίμων (Kumar και Anad, 1998, Sofos και Geornaras, 2010). Η μακρόχρονη έκθεση και καταπόνηση των κυττάρων σε βακτηριοστατικούς ή βακτηριοκτόνους παράγοντες, αρχικά επιφέρει διαφοροποιήσεις στην φυσιολογική τους κατάσταση, οι οποίες ωστόσο είναι αναστρέψιμες, ενώ σε οριακές περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσουν και στην μετάλλαξη των κυττάρων (Langsrud et al., 2003, Σχ. 1.4.). Σε μοριακό επίπεδο έχει βρεθεί ότι η μετάβαση των κυττάρων από την πλαγκτονική κατάσταση στην μορφολογία βιοϋμενίου, έχει συνδυαστεί με την υπερέκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στις καταπονήσεις, την βιοσύνθεση, την παραγωγή ενέργειας και τις γενικότερες λειτουργίες του κυττάρου (Hains et al., 2006)

Μια διαδικασία απολύμανσης που χρησιμοποιείται ευρέως από την βιομηχανία τροφίμων περιλαμβάνει ένα αρχικό στάδιο εφαρμογής του καθαριστικού παράγοντα για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων τροφίμων, έκπλυση με νερό, κι εφαρμογή του απολυμαντικού παράγοντα για την θανάτωση των βακτηριακών κυττάρων (Somers και Wong, 2004). Οι απολυμαντικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία ανήκουν κυρίως σε τρεις κατηγορίες: τα άλατα και τις ενώσεις του χλωρίου, το υπεροξεικό οξύ (ή οξειδωτικοί παράγοντες) και τις ενώσεις του τεταρτοταγούς αμμωνίου (Aarnisalo et al., 2007). Η απολυμαντική ικανότητα των παραγόντων επηρεάζεται από την συγκέντρωσή τους, τον χρόνο εφαρμογής, το pH τους, την ύπαρξη και σύσταση υπολειμμάτων στις επιφάνειες, κ.α. (Aarnisalo et al., 2000, 2007, Gram et al., 2007). Παράλληλα με τα χημικά απολυμαντικά ερευνάται η πιθανότητα έλεγχου των βιοϋμενίων της *L. monocytogenes* με την εφαρμογή φυσικών αντιμικροβιακών όπως αιθέρια έλαια βοτάνων ή βιοϋμένια οξυγαλακτικών καλλιεργείων (Sandasi et al., 2008, Guerrieri et al., 2009).

1.4. Μικροβιολογία Πρόρρησης

1.4.1 Εισαγωγή

Η Μικροβιολογία των Τροφίμων αποτελεί ένα ιδιαίτερα ευρύ επιστημονικό πεδίο, στο οποίο εντάσσεται η μελέτη των μικροοργανισμών, που σχετίζονται με την υγιεινή και την ποιότητα των τροφίμων. Η κλασική μεθοδολογία περιλαμβάνει τεχνικές απαρίθμησης και ταυτοποίησης των μικροβίων, οι οποίες κρίνονται ως χρονοβόρες και με υψηλό κόστος, ενώ ενδέχεται να μην περιγράφουν πλήρως την συμπεριφορά των μικροοργανισμών, σε συνάρτηση με τις διάφορες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την παραγωγή κι εμπορία των προϊόντων. Η Μικροβιολογία Πρόρρησης, με τη χρήση μαθηματικών μοντέλων, παρέχει τη δυνατότητα της βελτιστοποίησης της περιγραφής των προαναφερθέντων συμπεριφορών, και θέτει μια βάση για την πρόβλεψή τους σε μελλοντικές συνθήκες ή σε διαφορετικά προϊόντα.

Ένα μαθηματικό μοντέλο, στην πιο απλή μορφή του, αποτελεί την μαθηματική περιγραφή μιας διαδικασίας. Για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκαν μαθηματικές εξισώσεις στη Μικροβιολογία Τροφίμων, στις αρχές του 20ου αιώνα, για την περιγραφή της κινητικής της καταστροφής παθογόνων μικροοργανισμών, κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων. Η δυναμική εισβολή στο χώρο των τροφίμων της Μικροβιολογίας Πρόρρησης εντοπίζεται στις αρχές της δεκαετίας του 1970, με τη χρήση μαθηματικών μοντέλων για τον προσδιορισμό της πιθανότητας παραγωγής τοξίνης από το *C. botulinum*, από την ομάδα Γενηγιώργη στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και την ομάδα Roberts στο Ηνωμένο Βασίλειο (McMeekin, 2000). Η εισαγωγή των ηλεκτρονικών υπολογιστών και των στατιστικών λογισμικών προγραμμάτων, ανέδειξε την εφαρμογή των μαθηματικών μοντέλων σε ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο, για τη μελέτη της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών κι εν συνεχεία τη Μικροβιολογία Πρόρρησης σε ένα ξεχωριστό τομέα της Μικροβιολογίας Τροφίμων.

1.4.2. Ανάπτυξη των μοντέλων πρόβλεψης

Η ανάπτυξη ενός μαθηματικού μοντέλου πρόβλεψης ξεκινά από τον σχεδιασμό του πειράματος για την συλλογή δεδομένων, κατά τον οποίον θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη παράγοντες, όπως η σωστή επιλογή των εξαρτημένων και ανεξάρτητων μεταβλητών, η προέλευση, το είδος και η προετοιμασία του εμβολίου, το θρεπτικό υπόστρωμα και οι συνθήκες επώασης του μικροοργανισμού. Συγκεκριμένα, σαν εξαρτημένη μεταβλητή χρησιμοποιείται συνήθως ο χρόνος που απαιτείται για την μεταβολή της συγκέντρωσης ενός μικροοργανισμού ή παράμετροι που σχετίζονται με αυτόν, όπως είναι ο ρυθμός ανάπτυξης και η φάση προσαρμογής. Η επιλογή των ανεξάρτητων μεταβλητών συνοδεύεται από τον έλεγχο των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων, ώστε σε

περίπτωση που υπάρχουν, να συμπεριληφθούν στο μοντέλο, και τον καθορισμό του εύρους των τιμών τους που θα μελετηθούν, ώστε να έχουν βιολογικό ενδιαφέρον.

Σημαντική επίσης, κρίνεται η επιλογή του μικροοργανισμού που θα μελετηθεί, με όλες τις παραμέτρους που τον ακολουθούν, όπως το είδος και η προϊστορία (φυσιολογία) του στελέχους, η επιλογή ανάμεσα σε ένα ή μίγμα στελεχών, το επίπεδο των κυττάρων που θα ενοφθαλμιστούν για την βέλτιστη παρακολούθηση της συμπεριφοράς του κ.α. Όσον αφορά την επιλογή του θρεπτικού υποστρώματος δεν μπορούν να παραβλεφθούν τα οφέλη της χρήσης υγρών ή στερεών εργαστηριακών υποστρωμάτων, μιας και βοήθησαν στην παραγωγή δεδομένων και την ανάπτυξη πολυάριθμων μαθηματικών μοντέλων σε σύντομο χρονικό διάστημα, με σχετικά μικρό κόστος. Εντούτοις, τα τελευταία χρόνια αυξάνεται συνεχώς η χρήση τροφίμων ή συστημάτων που προσομοιάζουν τρόφιμα, με σκοπό την ενσωμάτωση της πολυπλοκότητας του περιβάλλοντος ενός τροφίμου στα μοντέλα πρόρρησης και επομένως την εξαγωγή ακριβέστερων προβλέψεων. Η συλλογή των πειραματικών δεδομένων αποτελεί ένα επιπλέον παράγοντα, για τον οποίον θα πρέπει να λαμβάνεται μνεία κατά τον πειραματικό σχεδιασμό. Η επαρκής ποσότητα και ποιότητά τους καθώς και η ομοιόμορφη κατανομή τους στο σύνολο της διάρκειας του εξεταζόμενου φαινομένου είναι σημαντικές για την εγκυρότητα του μοντέλου. Για την συλλογή τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν κλασσικές μέθοδοι μικροβιολογίας, καθώς και έμμεσες ενόργανες μέθοδοι καταγραφής μικροβιακού φορτίου (οπτική πυκνότητα, αγωγιμότητα κ.α.).

Το πρώτο στάδιο μετά την καταγραφή των δεδομένων είναι η προσαρμογή τους σε μια σιγμοειδή συνάρτηση για τον προσδιορισμό των τιμών των κινητικών παραμέτρων (ρυθμός ανάπτυξης, χρόνος προσαρμογής, κ.ά.). Οι τιμές που λαμβάνονται χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για τη δημιουργία των δευτερογενών μαθηματικών μοντέλων ενός μικροοργανισμού σε συνάρτηση με τους εξωτερικούς ή εσωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Το τελευταίο στάδιο στην ανάπτυξη ενός μοντέλου είναι η αξιολόγησή του, η οποία πρέπει γίνεται κάτω από πραγματικές συνθήκες στο περιβάλλον ενός τροφίμου (McMeekin and Ross, 1996). Η αξιοπιστία ενός μοντέλου πρόρρησης δεν άπτεται μόνο στο πόσο καλή προσαρμογή έχει με τα πειραματικά δεδομένα, αλλά κυρίως στο κατά πόσο είναι ικανό να προβλέψει την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού σε όποιες συνθήκες του ζητηθούν (Jones et al, 1994).

1.4.3. Κατηγοριοποίηση των μοντέλων πρόβλεψης

Ο πιο συνήθης διαχωρισμός μαθηματικών μοντέλων πρόρρησης των τροφίμων είναι σε κινητικά μοντέλα και μοντέλα πιθανοτήτων με κριτήριο το χαρακτήρα της μαθηματικής τους εξίσωσης, δηλαδή αν η εξίσωση αυτή περιγράφει τους χαρακτήρες της κινητικής της ανάπτυξης του μικροοργανισμού ή αν μελετά την πιθανότητα, που έχει αυτή η ανάπτυξη, να λάβει χώρα. Κριτήρια

για την επιλογή του κατάλληλου μοντέλου, είναι τα μικροβιακά είδη που αποτελούν το αντικείμενο της μελέτης και ο αριθμός των μεταβλητών. Ο τύπος κατηγοριοποίησης των Whiting & Buchanan, (1993), των κινητικών μοντέλων σε πρωτογενή, δευτερογενή και τριτογενή (Πίνακας 1.1.), είναι περισσότερο εύχρηστος, καθώς επιτρέπει το χαρακτηρισμό και ομαδοποιεί τα περισσότερα είδη μοντέλων (McDonald and Sun, 1999).

Πίνακας 1.1. Κατηγορίες μοντέλων πρόρρησης σύμφωνα με τους **McDonald & Sun (1999)**.

Πρωτογενή	Δευτερογενή	Τριτογενή
Gompertz function	Belehradek model	USDA Pathogen Modeling Program
Modified Gompertz function	Ratkowsky model	Food MicroModel
Logistic model	Arrhenius model	Pseudomonas Predictor
Baranyi model	Modified Arrhenius models (Davey or Schoolfield)	Expert systems
First order Monod model	Probability models	
Modified Monod model		
D values of thermal inactivation	Z values	
Whiting & Cygnarowicz	Polynomial or Response Surface models	
Three phase linear model	Williams–Landel Ferry model	

1.4.3.1. Πρωτογενή κινητικά μοντέλα

Τα πρωτογενή κινητικά μοντέλα περιγράφουν τη μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού σε σχέση με το χρόνο, κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες επώασης του μικροοργανισμού. Η μεταβολή αυτή υπολογίζεται, είτε άμεσα με απαρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού και ποσοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων τοξινών ή άλλων μεταβολικών προϊόντων του μικροοργανισμού ή εμμέσως, με τον υπολογισμό δεικτών της μικροβιακής ανάπτυξης, ανάμεσα στους οποίους περισσότερο δημοφιλείς είναι η οπτική πυκνότητα και οι μετρήσεις ηλεκτρικής αγωγιμότητας (Impedance). Η καταγραφή της μεταβολής του μικροβιακού πληθυσμού σε σχέση με το χρόνο και η δημιουργία της καμπύλης αύξησής του, αποτελούν τα πειραματικά δεδομένα πάνω στα οποία βασίζεται η δημιουργία ενός πρωτογενούς μοντέλου. Για τα περισσότερα τρόφιμα η θερμοκρασία αποτελεί τον κύριο περιβαλλοντικό παράγοντα, που ρυθμίζει καθοριστικά τις κινητικές παραμέτρους της ανάπτυξης των μικροοργανισμών του τροφίμου, παθογόνων ή μη. Τα πρωτογενή μοντέλα έχουν θεμελιώδη σημασία για τον τομέα της μικροβιολογίας πρόρρησης. Έχουν ως στόχο να περιγράψουν την κινητική ανάπτυξης των

μικροοργανισμών, με όσο το δυνατόν λιγότερες παραμέτρους, αλλά διατηρώντας την ικανότητα να περιγράψουν με ακρίβεια τις διάφορες φάσεις της μικροβιακής ανάπτυξης.

Η κινητική ανάπτυξης των μικροοργανισμών ακολουθεί συνήθως μια σιγμοειδή καμπύλη με τέσσερις διακριτές φάσεις: προσαρμογής, λογαριθμικής ανάπτυξης, στασιμότητας και θανάτου (Zwietering et al., 1990). Οι τρεις πρώτες φάσεις, που ενδιαφέρουν περισσότερο όταν μελετούνται μοντέλα ανάπτυξης, μπορούν να περιγραφούν από τρεις παραμέτρους: τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (μ_{\max}), ο οποίος αποτελεί την μέγιστη κλίση της καμπύλης ανάπτυξης, τον χρόνο προσαρμογής (λ), το σημείο που η μέγιστη κλίση τέμνει τον άξονα των X και την ανώτερη ασύμπτωτο (Y_{\max}) της καμπύλης. Έχουν αναπτυχθεί αρκετές εξισώσεις, που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν την σιγμοειδή ανάπτυξη. Ορισμένες από αυτές αποτελούν εμπειρικά μοντέλα (π.χ. το κλασικό και το τροποποιημένο μοντέλο Gompertz, το κλασικό και το τροποποιημένο λογιστικό μοντέλο κ.α), τα οποία εφαρμόζονται εύκολα και εκφράζουν αξιόπιστα μια διαδικασία για ένα συγκεκριμένο εύρος των μεταβλητών. Συχνά στερούνται θεωρητικής βάσης, και αρκετές από τις παραμέτρους τους δεν έχουν βιολογική σημασία. Για όλους τους παραπάνω λόγους, πολλοί ερευνητές θεωρούν ότι τα συγκεκριμένα μοντέλα δε προσφέρουν γνώσεις πάνω στους μηχανισμούς, που χαρακτηρίζουν μια βιολογική διεργασία. Αντίθετα, η δημιουργία μοντέλων μηχανιστικής βάσης απαιτεί την κατανόηση των βιολογικών μηχανισμών και διεργασιών, που αποτελούν τη βάση του κυτταρικού μεταβολισμού. Τελευταία, έχει δημιουργηθεί μία νέα γενιά κινητικών μοντέλων, τα οποία στηρίζονται επίσης, σε μηχανιστική βάση, όπως είναι τα μοντέλα Baranyi, Hills, Buchanan και το μοντέλο του ετερογενούς πληθυσμού (McKellar and Lu, 2004). Επιτρέπουν την εξαγωγή προβλέψεων από απλές υποθέσεις και θεωρούνται από τους περισσότερους ερευνητές ανώτερα των εμπειρικών μαθηματικών μοντέλων (Van Impe et al., 1992, Zwietering et al., 1993).

Μοντέλο Baranyi

Οι Baranyi et al. (1994) εισήγαγαν, για την περιγραφή της καμπύλης της βακτηριακής ανάπτυξης, ένα μηχανιστικό μοντέλο. Η λανθάνουσα φάση προσαρμογής αποδίδεται στην αναγκαιότητα να συντεθεί ένα άγνωστο υπόστρωμα a_0 , το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη. Από τη στιγμή που τα κύτταρα θα προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον, αυξάνονται εκθετικά. Η ανάπτυξή τους περιορίζεται από παράγοντες που υπαγορεύονται από το μέσο ανάπτυξης. Η καμπύλη του μοντέλου Baranyi δίνεται από την Εξίσωση 1:

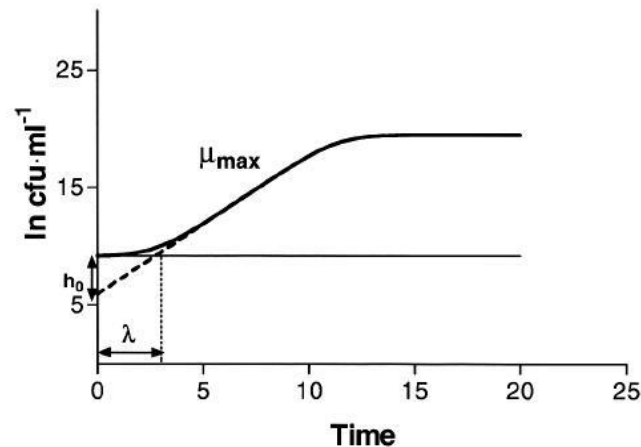
$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m \cdot \mu_{\max} \cdot A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{v} \ln \left(\frac{e^{-vt} + q_0}{1 + q_0} \right)$$

$$h_0 = \ln \left(\frac{q_0 + 1}{q_0} \right)$$

όπου $\gamma(t) = \ln x(t)$, $\gamma_0 = \ln x_0$ και v : ρυθμός ανάπτυξης του περιοριστικού υποστρώματος, ο οποίος γενικώς θεωρείται ότι είναι ίσος προς μ_{max} (McKellar και Lu, 2004).

Η εξίσωση που προσδιορίζει το $A(t)$ σε συνδυασμό με τις συνθήκες που επικρατούν μετά τον ενοφθαλμισμό, επιτρέπουν την πρόβλεψη της διάρκειας της λανθάνουσας φάσης. Αν ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ακολουθεί τις περιβαλλοντικές αλλαγές άμεσα καθώς συμβαίνουν, αυτό το μοντέλο μπορεί να περιγράψει την κινητική της μικροβιακής ανάπτυξης σε περιπτώσεις που παράγοντες όπως το pH, η ενεργότητα του ύδατος και η θερμοκρασία μεταβάλλονται με το χρόνο. Η δημιουργία μοντέλων για συστήματα, τα οποία βρίσκονται σε ένα δυναμικό περιβάλλον, αποτελεί ένα από τα πλεονεκτήματα του συγκεκριμένου μοντέλου. Το μοντέλο Baranyi έχει χρησιμοποιηθεί, αξιολογηθεί και συγκριθεί σε διάφορες εφαρμογές. Σε πολλές περιπτώσεις η σύγκρισή του με άλλα πρωτογενή μοντέλα, όπως η εξίσωση Gompertz, έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα (McDonald and Sun, 1999).

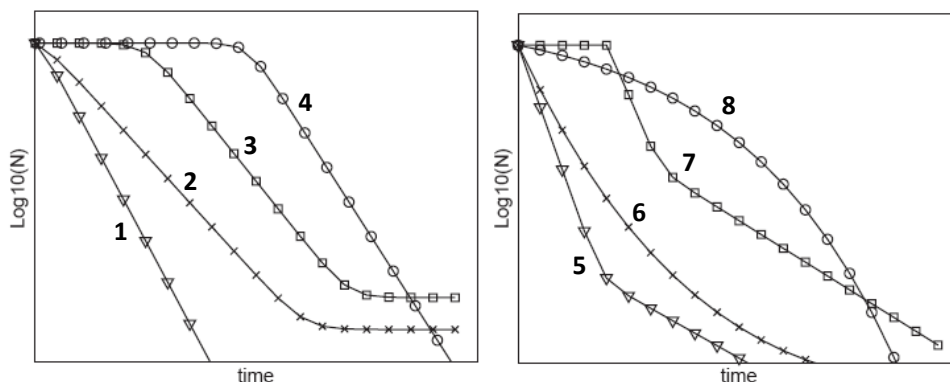


Σχήμα 1.7. Καμπύλη μικροβιακής ανάπτυξης βασισμένη στο μοντέλο Baranyi και Roberts (1994), όπου μ_{max} είναι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (1/χρόνος), λ είναι η διάρκεια της φάσης προσαρμογής (χρόνος) και h_0 είναι η μετασχηματισμένη παράμετρος της φυσιολογικής κατάστασης (McKellar και Lu, 2004).

Το μοντέλο Baranyi έχει βρει πολλές εφαρμογές στην περιγραφή της κινητικής των μικροοργανισμών, που αφορούν τα τρόφιμα και ιδιαίτερα τα προϊόντα με βάση το κρέας. Η χρήση των λογισμικών προγραμμάτων DMFit και MicroFit καθιστούν την εφαρμογή του συγκεκριμένου

μοντέλου εύκολη. Πρόσφατες εφαρμογές του προγράμματος σχετίζονται με την κινητική διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών, μεταξύ των οποίων και της *L. monocytogenes* (McClure et al., 1997, Fernandez et al., 1997). Εκτός από την ευκολία στην χρήση του, έχει βρεθεί ότι το μοντέλο των Baranyi και Roberts, προσαρμόζεται καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα σε σχέση με άλλα πρωτογενή μοντέλα (McClure et al., 1993, Dalgaard, 1995, Sutherland et al., 1995, 1997).

Στα πρωτογενή κινητικά μοντέλα, εκτός από τα μοντέλα ανάπτυξης, ανήκουν και τα μοντέλα επιβίωσης ή θανάτωσης. Η απόκριση των μικροοργανισμών κατά την εφαρμογή εξωτερικών ή εσωτερικών καταπονήσεων, σαν μέρος της τεχνολογίας παραγωγής ενός τροφίμου δεν είναι πάντα γραμμική, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της αύξησής τους. Για τον λόγο αυτό έχουν προταθεί διαφορετικά είδη μοντέλων θανάτωσης τόσο γραμμικά όσο και μη γραμμικά (Geeraerd et al., 2005). Τα γραμμικά μοντέλα βρίσκουν για πολλά χρόνια εφαρμογή σε περιπτώσεις θερμοκρασιακής θανάτωσης μικροοργανισμών (παστερίωση, αποστείρωση), αν και λόγω τις ανομοιογένειας του βακτηριακού πληθυσμού σε ένα τρόφιμο, θεωρείται αδύνατη η μείωσή του σε όλη την διάρκεια της διαδικασίας με σταθερή ταχύτητα, k . Τα μη γραμμικά μοντέλα, τα οποία ενδέχεται να περιλαμβάνουν μία αρχική ("ώμο", shoulder) ή μια τελική ("ουρά", tail) φάση επιβίωσης ή και τις δύο, περιγράφουν τόσο μη θερμοκρασιακές επεξεργασίες, όσο και θερμοκρασιακές με κατανομή θερμοκρασίας. Το πρόγραμμα GinaFIT που διατίθεται τα τελευταία χρόνια σαν πρόσθετο του Excel Office[®] δίνει την δυνατότητα χρήσης διαφορετικών μοντέλων θανάτωσης, με εύκολο και γρήγορο τρόπο, χωρίς την ανάγκη παλινδρόμησης, ακόμα και από άτομα που δεν είναι γνώστες της ανάπτυξης μαθηματικών μοντέλων (Geeraerd et al., 2005). Η περιγραφή της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών κατά την διάρκεια των διεργασιών θανάτωσης τους, που χρησιμοποιούνται συνήθως στην βιομηχανία τροφίμων (παστερίωση, αποστείρωση, οξίνιση κ.α.), είναι σημαντική για τον προσδιορισμό της ασφάλειας των προϊόντων.



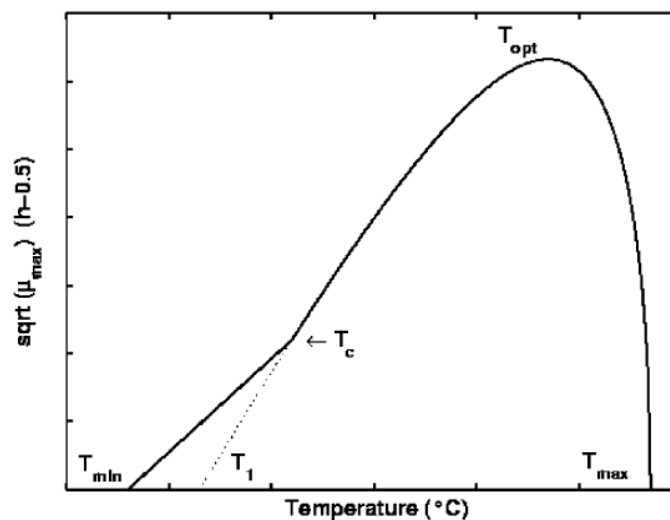
Σχήμα 1.8. Τυπικές καμπύλες θανάτωσης των μικροοργανισμών. **1.** Γραμμική, **2.** Γραμμική με ουρά, **3.** Γραμμική με ώμο και ουρά, **4.** Γραμμική με ώμο. **5.** Διφασική, **6.** Κυρτή, **7.** Διφασική με ώμο, **8.** Κοίλη (Geeraerd et al., 2005).

1.4.3.2. Δευτερογενή κινητικά μοντέλα

Τα δευτερογενή μοντέλα περιγράφουν μαθηματικά την επίδραση των διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως είναι η θερμοκρασία, το pH, η ενεργότητα του ύδατος ή το οξειδοαναγωγικό δυναμικό στις κινητικές παραμέτρους που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού. Για παράδειγμα, αν μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας σε ένα μικροβιακό πληθυσμό, για ένα συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών, και με βάση τα πειραματικά δεδομένα δημιουργηθεί ένα πρωτογενές μοντέλο, με το μοντέλο αυτό μπορεί να υπολογιστεί ο αντίστοιχος χρόνος γενεάς. Με ένα δευτερογενές μοντέλο θα περιγραφεί η επίδραση της θερμοκρασίας στην κινητική αυτή παράμετρο, ώστε να δίνεται η δυνατότητα να υπολογίζεται ο χρόνος γενεάς του συγκεκριμένου μικροοργανισμού για κάθε θερμοκρασία T , εντός του εύρους των θερμοκρασιών του συγκεκριμένου πειράματος (Whiting and Buchanan, 1993).

Ως δευτερογενή μοντέλα ορίζονται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα μοντέλα που περιγράφουν την επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών (φυσικού, χημικού ή βιολογικού χαρακτήρα) στις τιμές των παραμέτρων των πρωτογενών μοντέλων. Ανάμεσα στους διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, που έχουν μελετηθεί, όπως η θερμοκρασία, η τιμή της ενεργότητα ύδατος, το pH, η σύσταση του μικροβιακού πληθυσμού, αναμφισβήτητα ο περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει καθοριστικά την κινητική της μικροβιακής ανάπτυξης, κατά τη διαδικασία της παραγωγής και διάθεσης ενός τροφίμου είναι η θερμοκρασία. Κατά τους διάφορους χειρισμούς που υφίσταται ένα τρόφιμο πριν από την διάθεση του στον τελικό αποδέκτη (καταναλωτή), συντηρείται εντός ενός εύρους θερμοκρασιών ($0-35^{\circ}\text{C}$), που επηρεάζουν σημαντικά τις κινητικές παραμέτρους ανάπτυξης του μικροβιακού πληθυσμού, δηλαδή το ρυθμό ανάπτυξης, τη διάρκεια της φάσης προσαρμογής, το χρόνο διπλασιασμού και το μέγιστο πληθυσμό των μικροβιακών κυττάρων. Ανάλογα με το είδος τους, οι διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί των τροφίμων έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται σε θερμοκρασίες από 0 έως 50°C . Κατά τη συντήρηση των τροφίμων σε θερμοκρασίες ψύξης ευνοείται η επικράτηση των ψυχρότροφων, αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες συντήρησης ευνοείται η ανάπτυξη και επικράτηση των μεσόφιλων παθογόνων μικροβίων. Ενδιαφέρον επίσης έχει εκδηλωθεί σχετικά με την επίδραση, που έχει η θερμοκρασία συντήρησης, στο ρυθμό ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών, όταν ο πληθυσμός των τελευταίων βρίσκεται σε επίπεδα κάτω από το όριο ανίχνευσης (Shimoni and Labuza, 2000). Τις περισσότερες εφαρμογές έχουν τα δευτερογενή κινητικά μοντέλα Arrhenius, το τροποποιημένο μοντέλο Arrhenius, τα μοντέλα της τετραγωνικής ρίζας και τα πολυωνυμικά μοντέλα, το μοντέλο gamma-concept, και το μοντέλο θεμελιωδών παραμέτρων (Cardinal Parameter Model, CPM).

Τα πολυωνυμικά μοντέλα, χαρακτηρίζονται από την απλότητα και την ευκολία τους κι έχουν χρησιμοποιηθεί σε πλήθος μελετών (McClure et al., 1993, Pin et al., 2000), εντούτοις, δεν έχουν βιολογική ερμηνεία (Delignette-Muller et al., 1995). Τα μοντέλα Arrhenius είναι εμπειρικά μοντέλα που περιγράφουν την επίδραση της θερμοκρασίας, τα οποία βασίζονται στην κινητική των αντιδράσεων, ενώ περικλείουν μηχανιστικές κι εμπειρικές τροποποιήσεις, έτσι ώστε να συμπεριλαμβάνονται οι παρατηρούμενες παρεκκλίσεις (McMeekin et al., 1993, Ross and McMeekin, 1994, Davey, 1994; Daughtry et al., 1997). Οι Ratkowsky et al. (1982) στην προσπάθειά τους να αντιμετωπίσουν προβλήματα των εξισώσεων Arrhenius, εισήγαγαν το μοντέλο τετραγωνικής ρίζας, το οποίο χρησιμοποιεί μια θεωρητική ελάχιστη τιμή θερμοκρασίας ανάπτυξης (T_{min}). Έκτοτε έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμα μοντέλα τετραγωνικής ρίζας που περιγράφουν την επίδραση και άλλων παραγόντων πλην της θερμοκρασίας (McMeekin et al., 1987, Adams et al. 1991), ή συνδυασμό παραγόντων (Wijtzes et al., 2001).



Σχήμα 1.9. Επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, όπως έχει εξαχθεί από το μοντέλο των θεμελιωδών παραμέτρων (Cardinal Parameters Model, CPM, Le Marc et al., 2002).

Οι Zwietering et al. (1992) εισήγαγαν το gamma concept, το οποίο βασίζεται στην ιδέα ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επιδρούν στον ρυθμό ανάπτυξης δρούν ανεξάρτητα και η επίδραση του καθενός μπορεί να εκφραστεί σαν μέρος του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης. Ο παράγοντας γάμμα (γ) είναι το πηλίκο του πραγματικού ρυθμού ανάπτυξης σε κάθε περιβαλλοντική συνθήκη δια του ίδιου ρυθμού σε άριστες συνθήκες. Συνολικά, ο ρυθμός ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού δίνεται από τον πολλαπλασιασμό όλων των γάμμα παραγόντων των συνθηκών που επηρεάζουν την αύξησή του. Το μοντέλο θεμελιωδών παραμέτρων είναι ένα ακόμα δευτερογενές εμπειρικό μοντέλο που βασίζεται στην υπόθεση ότι ο συνολικός ρυθμός ανάπτυξης

είναι το γινόμενο των επιμέρους σχετικών παραγόντων ανάπτυξης. Έκτοτε, χρησιμοποιείται ευρέως στην βιβλιογραφία (Augustin και Carlier 2000, Le Marc et al., 2002), ενώ μπορεί να προβλέψει με ακρίβεια τόσο την κινητική, όσο και τα όρια ανάπτυξης της *L. monocytogenes* σε γαλακτοκομικά, κρέατα και ιχθυρά (Augustin et al., 2005). Σημαντικό πλεονέκτημά του θεωρείται η ενσωμάτωση των περισσοτέρων (ή όλων) των παραμέτρων που επηρεάζουν, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό την συμπεριφορά του μικροοργανισμού, καθώς και οι αλληλοεπιδράσεις μεταξύ αυτών. Συγκεκριμένα, οι Augustin και Carlier (2000) συγκέντρωσαν σε ένα μοντέλο την επίδραση 15 περιβαλλοντικών παραμέτρων στον ρυθμό ανάπτυξης της *L. monocytogenes*.

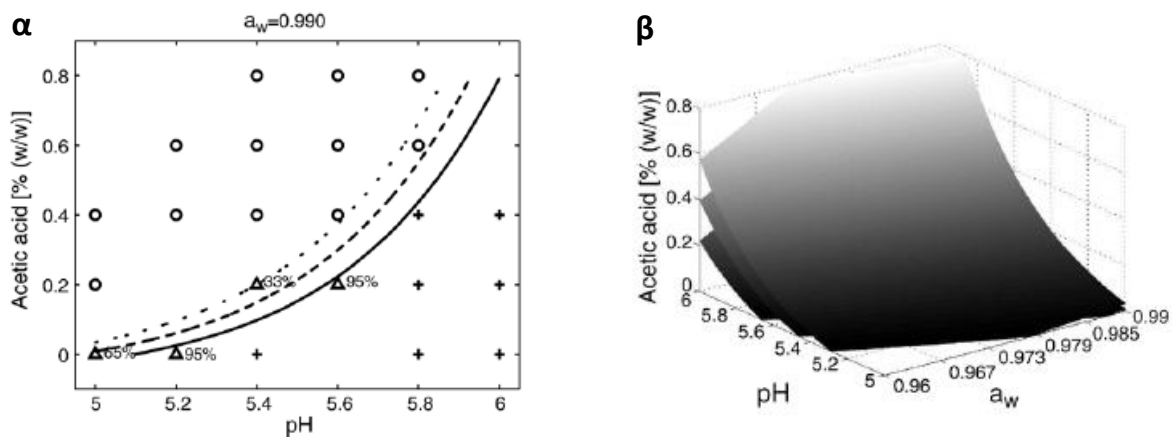
1.4.4. Μοντέλα πιθανοτήτων - Πολυωνυμικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης

Οι πληροφορίες που παρέχονται από τα κινητικά μοντέλα πρόρρησης έχουν ευρεία χρήση όταν μελετούνται αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί ή παθογόνοι, για τους οποίους έχουν θεσπιστεί συγκεκριμένα όρια ανεκτικότητας. Αντίθετα, στην περίπτωση των παθογόνων μικροοργανισμών, των οποίων η λοιμογόνος δόση είναι ιδιαίτερα χαμηλή και τα όρια της νομοθεσίας ενίοτε μηδενικά, το ενδιαφέρον μετατοπίζεται στην εύρεση των συνθηκών που επιτρέπουν ή δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη τους, καθώς και των ενδιάμεσων ορίων των περιοχών αυτών (McMeekin et al., 2000). Προς αυτή την κατεύθυνση τα μοντέλα πιθανοτήτων αποσκοπούν στον ακριβή προσδιορισμό των συνθηκών, των οποίων η εφαρμογή εξασφαλίζει τον έλεγχο μίας διαδικασίας ή απομακρύνει τον κίνδυνο ενός επικίνδυνου παθογόνου παράγοντα, μέσω του προσδιορισμού της πιθανότητας, που έχει ο συγκεκριμένος παθογόνος, να αυξηθεί ή όχι.

Σε όλους του μικροοργανισμούς που ενδιαφέρουν την μικροβιολογία τροφίμων, υπάρχει ένας ελάχιστος ρυθμός ανάπτυξης, πέρα από τον οποίο η ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού δεν πραγματοποιείται ακόμα και μετά από εκτεταμένες περιόδους επώασης. Αυτό το όριο ενδέχεται να καθορίζεται αποκλειστικά από έναν εξωτερικό ή εσωτερικό περιβαλλοντικό παράγοντα ή ένα συνδυασμό παραγόντων, όπως θερμοκρασία, αλατοπεριεκτικότητα, pH, οξέα κ.α. Στην τελευταία περίπτωση, σύμφωνα με την θεωρία των εμποδίων, όταν περισσότεροι από έναν παράγοντες περιορίζουν την ανάπτυξη ενός πληθυσμού, το απόλυτο επίπεδο δριμύτητας από κάθε παράγοντα που απαιτείται για να περιοριστεί η ανάπτυξη μειώνεται (Leistner, 2000). Η σημασία της θεωρίας των εμποδίων έγκειται στην διασφάλιση της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων, με την χρήση λιγότερο παρεμβατικών συνθηκών επεξεργασίας. Η υιοθέτηση ήπιων συνθηκών επεξεργασίας των τροφίμων, πηγάζει από την αυξανόμενη προτίμηση των καταναλωτών, για τρόφιμα στα οποία έχει εξασφαλιστεί μεν η ασφάλειά τους, διατηρώντας παράλληλα τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους σε κατάσταση κοντά σε αυτήν των μη επεξεργασμένων τροφίμων. Θα μπορούσε επομένως να ειπωθεί, ότι τα μοντέλα πιθανοτήτων εκφράζουν ποσοτικά τη θεωρία των

εμποδίων (McMeekin et al., 2000). Αυτή η προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ενδιάμεσης περιοχής, ανάμεσα στις συνθήκες που επιτρέπουν ανάπτυξη και σε αυτές που δεν την επιτρέπουν, για διάφορους μικροοργανισμούς, ανάμεσα στους οποίους και για την *L. monocytogenes*, σε σχέση με τους παράγοντες θερμοκρασία, pH, τη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και NaCl (McMeekin et al., 2002).

Η λογιστική παλινδρόμηση αποτελεί ένα χρήσιμο μοντέλο πρόβλεψης της ανάπτυξης σε συγκεκριμένες συνθήκες και σε ένα ορισμένο χρονικό διάστημα. Η χρήση της λογιστικής παλινδρόμησης σαν ένα εργαλείο μοντελοποίησης των ορίων ανάπτυξης και μη ανάπτυξης βακτηριακών στελεχών προτάθηκε αρχικά από τους Ratkowsky και Ross (1995), οι οποίοι μετέτρεψαν ένα κινητικό μοντέλο σε ένα μοντέλο πιθανοτήτων. Οι McMeekin et al. (2000) χρησιμοποίησαν αυτή την προσέγγιση για να μοντελοποιήσουν την επίδραση (προσθετική ή συνεργιστική) ποικίλων εμποδίων, στην πιθανότητα ανάπτυξης μικροοργανισμών. Τα λογιστικά μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη των ορίων ανάπτυξης των *E. coli* (Presser et al., 1998, Skandamis et al., 2007), *Shigella flexneri* (Ratkowsky και Ross, 1995) κ.α. Οι περισσότερες μελέτες στην μοντελοποίηση της συμπεριφοράς της *L. monocytogenes* βασίζονται σε δεδομένα από εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων, συμπεριλαμβανομένης της ομογένειας του μέσου, τους σταθερούς εσωτερικούς παράγοντες, στοιχεία που αυξάνουν σημαντικά την απόδοση ενός μοντέλου, καθώς και την πιο εύκολη και γρήγορη ανάλυσή τους (πχ με οπτική πυκνότητα) σε σχέση με τα πειράματα σε τρόφιμα.



Σχήμα 1.10. Δυσδιάστατη (α) και τρισδιάστατη (β) απεικόνιση των ορίων ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, μετά από προσαρμογή ενός πολυωνυμικού μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης (OLRM) στα πειραματικά δεδομένα ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του παθογόνου, συναρτήσει των pH, ενεργότητας ύδατος και συγκέντρωσης οξικού οξέος. Οι γραμμές (2D) και οι επιφάνειες (3D) που εμφανίζονται στα σχήματα, αντιστοιχούν σε πιθανότητες $p=0.9$ (- ή χαμηλότερη επιφάνεια), σε $p=0.5$ (- - ή μεσαία επιφάνεια), και $p=0.1$ (⋯ ή ανώτερη επιφάνεια), ενώ τα δεδομένα αντιστοιχούν σε πιθανότητες: $p=0$ (○), $p=1$ (+), $p \in [0, 1]$ (Δ), στις οποίες αναγράφεται και το ποσοστό (Gysemans et al., 2007).

Στα μοντέλα πιθανοτήτων τα πειραματικά δεδομένα κωδικοποιούνται είτε ως 0 (δεν παρατηρήθηκε ανταπόκριση) είτε ως 1 (παρατηρήθηκε ανταπόκριση). Στην περίπτωση που πραγματοποιήθηκαν περισσότερες από μία επαναλήψεις, η ανταπόκριση εκφράζεται ως πιθανότητα, παίρνει δηλαδή τιμές ανάμεσα σε 0 και 1. Η προσαρμογή των δεδομένων και ο προσδιορισμός των παραμέτρων προσαρμογής των μεταβλητών, γίνεται με τη χρήση τεχνικών παλινδρόμησης. Η εξίσωση παλινδρόμησης συνδέεται συνήθως με το μαθηματικό όρο logitP:

$$\text{logit } P = \log(P/(1 - P)),$$

όπου P: η πιθανότητα να συμβεί μια συγκεκριμένη ανταπόκριση.

Η σχέση logit P περιγράφεται ως εξίσωση Y :

$$\text{logit } P = Y$$

Η παραπάνω εξίσωση παίρνει επίσης τη μορφή:

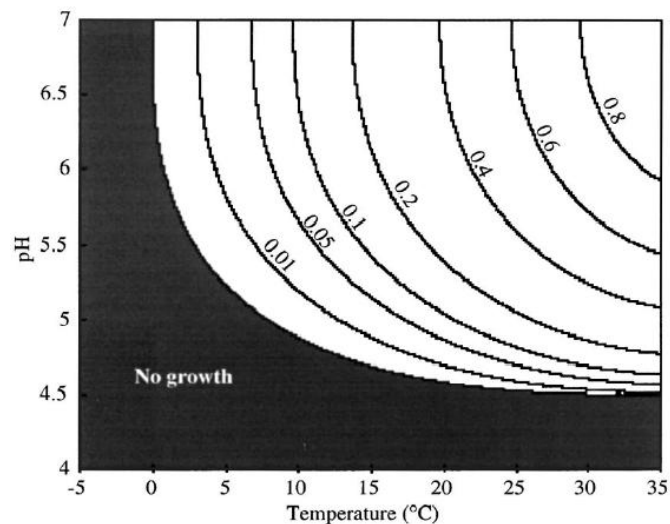
$$1/(1 + e^{-Y}) = P \quad \text{ή} \quad e^Y/(1 + e^Y) = P$$

όπου Y είναι η εξίσωση (πολυωνυμικής συνήθως φύσεως) που περιγράφει τη σχέση των ανεξάρτητων μεταβλητών (Ross και Dalgaard, 2004).

Η οριοθέτηση της ενδιάμεσης περιοχής, ανάμεσα στις συνθήκες που αποτελούν τα όρια για την ανάπτυξη ή μη ενός μικροοργανισμού, παρουσιάζει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον. Θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως το όριο, για το οποίο οι βιοσυνθετικές λειτουργίες στο μικροβιακό κύτταρο τερματίζονται προοδευτικά και αυξάνουν οι διεργασίες που χαρακτηρίζουν την επιβίωση του μικροβιακού κυττάρου (McMeekin et al., 2002). Η ενδιάμεση περιοχή, χαρακτηρίζεται συνήθως από στενά όρια, σε σχέση με τους παράγοντες που δρουν παρεμποδιστικά πάνω στην ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού. Για παράδειγμα, για την τιμή της ενεργότητας του ύδατος, τα όρια που προσδιορίζουν την ανάπτυξη ή μη, βρίσκονται ανάμεσα σε 0,01-0,03 μονάδες, ενώ για την τιμή του pH προσδιορίζονται στις 0,1-0,2 μονάδες. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στην υπόθεση ότι τα όρια της ανάπτυξης συνδέονται με μία κρίσιμη τιμή ενέργειας ενεργοποίησης, η οποία προσδιορίζει ένα συγκεκριμένο συνδυασμό συνθηκών. Επιπλέον, έχει φανεί ότι η μικροβιακή ανθεκτικότητα απέναντι σε χαμηλές τιμές ενεργότητας ύδατος ή pH δεν είναι μέγιστη κοντά στις άριστες θερμοκρασίες ανάπτυξης. Το αποτέλεσμα της συνδυασμένης επίδρασης της θερμοκρασίας και της ενεργότητας ύδατος ή/και του pH μπορεί να εκφραστεί ποσοτικά και οι συνθήκες που παρεμποδίζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη να προσδιοριστούν (McMeekin et al., 2000).

Μια εναλλακτική προσέγγιση της χρήσης των μοντέλων λογιστικής παλινδρόμησης για τον προσδιορισμό της πιθανότητας ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον είναι η χρήση ενός δευτερογενούς μοντέλου θεμελιωδών παραμέτρων (Mejlholm και Dalgaard, 2007). Σε αυτή την προσέγγιση ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ισούται με το γινόμενο της

επίδρασης κάθε εξωτερικού ή εσωτερικού παράγοντα στον μικροοργανισμό, καθώς και των μεταξύ αυτών αλληλεπιδράσεων (όρος ξ , Le Marc et al., 2002). Επομένως, αν έστω και μία από της παραμέτρους επιδρά ανασταλτικά στον μικροοργανισμό, μέσω της φύσης της εξίσωσης μηδενίζεται ο δεύτερος όρος της, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι ο μικροοργανισμός δεν αυξάνεται στην συγκεκριμένη περιοχή. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης του μοντέλου θεμελιωδών παραμέτρων είναι ότι μπορούν να συμπεριληφθούν όλοι οι παράγοντες που ενδέχεται να επηρεάσουν τον μικροοργανισμό, σε αντίθεση με τα πολυωνυμικά μοντέλα που εξετάζουν συνήθως μόνο ορισμένες από τις παραμέτρους (Mejlholm et al., 2010). Ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι ότι με την χρήση ενός μόνο μοντέλου μπορούν αρχικά να περιγραφούν τα όρια ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού, και στη συνέχεια να προσδιοριστεί ο ρυθμός αύξησής του, όπου αυτή είναι εφικτή (Σχ. 1.11., Augustin και Carlier, 2000).



Σχήμα 1.11. Σχηματική απεικόνιση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης της *L. monocytogenes* υπολογισμένο από μοντέλο που συνυπολογίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ των ελαχίστων θεμελιωδών τιμών, συναρτήσει της θερμοκρασίας και του pH (Augustin και Carlier, 2000).

1.4.5. Τριτογενή μοντέλα

Τα τριτογενή μοντέλα ενσωματώνουν πρωτογενή και δευτερογενή μοντέλα σε λογισμικά προγράμματα. Ορισμένα από τα γνωστά προγράμματα είναι το Pathogen Modelling Program (USDA, 2003), το Growth Predictor και η ComBase (2009), τα οποία προσεγγίζονται εύκολα από οποιονδήποτε χρήστη του διαδικτύου. Άλλα προγράμματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι το GroPIN tertiary model: (Psomas και Skandamis, 2013), το Sea food Spoilage Predictor (SSSP, 2009), το Microbial Response Viewer (Koseki, 2009), το MicroHibro software (Rodriguez, 2011), καθώς και τα PURAC (2007) και DRMI (2007) που εξειδικεύονται στην *L. monocytogenes*. Τα συγκεκριμένα

προγράμματα, δίνουν τη δυνατότητα εφαρμογής της μικροβιολογίας πρόρρησης από τελικούς χρήστες, που δε διαθέτουν απαραίτητα ειδικές γνώσεις, καθιστώντας τη με αυτό τον τρόπο περισσότερο προσιτή από τη βιομηχανία τροφίμων (Whiting και Buchanan, 1993).

1.4.6. Χρήση της Μικροβιολογίας Πρόρρησης στην βιομηχανία τροφίμων

Για την παραγωγή ασφαλών προϊόντων υψηλής οργανοληπτικής αξίας, απαιτείται προσοχή σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, μέχρι και την κατανάλωση. Τα μαθηματικά μοντέλα της μικροβιολογίας πρόβλεψης παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για την συμπεριφορά των παθογόνων στα τρόφιμα και μπορούν, σε ένα μεγάλο βαθμό να αντικαταστήσουν τις μακρόχρονες και κοπιαστικές μεθόδους καταμέτρησης της κλασικής μικροβιολογίας. Εντούτοις, η χρήση των μοντέλων πρόρρησης στον σχεδιασμό και την επεξεργασία τροφίμων συναντά ορισμένους περιορισμούς. Αναφορικά, ορισμένοι από αυτούς είναι η χρήση υγρών εργαστηριακών υποστρωμάτων για την ανάπτυξη μοντέλων, τα οποία στην συνέχεια εφαρμόζονται σε τρόφιμα, η έλλειψη σταθερών πρακτικών και μεθοδολογιών (διαφορετικοί τρόποι συλλογής δεδομένων κι επεξεργασίας) μεταξύ των εργαστηρίων και ο περιορισμένος όγκος μοντέλων που δεν μπορούν να καλύψουν σφαιρικά την ασφάλεια των τροφίμων (Marks, 2008). Η σχετική μεταβλητότητα και αβεβαιότητα που έχουν τα μοντέλα πρόβλεψης μπορούν να συμπεριληφθούν στους περιοριστικούς παράγοντες, ενώ σημαντικής δυσκολίας μπορεί να αποδειχθεί η ενσωμάτωση ενός μικροβιακού μοντέλου σε ένα σύστημα διεργασιών κατά την παραγωγική διαδικασία (Marks, 2008). Η δυσκολία στην ενσωμάτωση εξαρτάται και από την πολυπλοκότητα ενός μοντέλου, το οποίο μπορεί να είναι από πολύ απλό στην χρήση του (π.χ. εμπειρικά μοντέλα) έως υψηλής πολυπλοκότητας (π.χ. δυναμική υγρών σε συνδυασμό με μεταφορά θερμότητας και αντιδράσεις, Trystram, 2012). Σημαντικό ρόλο στην εξομάλυνση/άρση των παραπάνω περιορισμών διαδραματίζει σωστή επικύρωση του μοντέλου, ιδιαίτερα όταν αναμένεται να χρησιμοποιηθεί από την βιομηχανία τροφίμων (Manios et al., 2009).

Παρά τους περιορισμούς στην χρήση τους τα μοντέλα πρόβλεψης χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο από την βιομηχανία τροφίμων, συνεισφέροντας στην ποσοτική μικροβιολογία εκτίμησης κινδύνου (QMRA) και τα συστήματα ανάλυσης επικινδυνότητας και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP) (McMeekin et al., 2002, 2006). Το σύστημα HACCP είναι ένα προληπτικό σύστημα ελέγχου ποιότητας, το οποίο μέσα από τον προσδιορισμό και την εκτίμηση των παραγόντων κινδύνου και με την εφαρμογή μίας σειράς ενεργειών, οριοθετεί μία συστημική προσέγγιση της βιομηχανίας προς το επιθυμητό επίπεδο της υγιεινής και ασφάλειας των τροφίμων. Με τη βοήθεια των μαθηματικών μοντέλων της μικροβιολογίας πρόρρησης δίνεται η δυνατότητα να προσδιοριστούν οι συνδυασμοί των παραγόντων, (π.χ. θερμοκρασία, pH, a_w , χρόνος) οι οποίοι

συμμορφώνονται με τα καθορισμένα από τη νομοθεσία όρια. Κατά την ανάπτυξη ενός σχεδίου HACCP, τα μαθηματικά μοντέλα θα μπορούσαν να βρουν εφαρμογή στην ανάλυση των επικίνδυνων παραγόντων, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά τους μικροοργανισμούς που είναι ικανοί να επιβιώσουν ή να αυξηθούν στο περιβάλλον ενός τροφίμου. Επιπλέον μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό των κρίσιμων σημείων ελέγχου, τα οποία ευνοούν τη μικροβιακή ανάπτυξη ή θανάτωση, με αποτέλεσμα τον ασφαλέστερο καθορισμό των κρίσιμων ορίων, πέρα από τα οποία δεν εξασφαλίζεται αποτελεσματικός έλεγχος των επικίνδυνων παραγόντων και τέλος στον καθορισμό διορθωτικών ενεργειών, επιτρέποντας τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολών της μικροβιακής πυκνότητας, σε σχέση με ενδεχόμενες μεταβολές της παραγωγικής διαδικασίας, ώστε να προσδιοριστούν οι απαραίτητες διορθωτικές ενέργειες (McDonald και Sun, 1999). Κοινό στόχο του συστήματος HACCP και της εκτίμησης κινδύνου αποτελεί η παραγωγή ασφαλών τροφίμων, με την εφαρμογή στρατηγικών εκτίμησης και με την κατανόηση πιθανών πηγών παραγόντων επικινδυνότητας, καθώς και την έκτασή τους. Η υιοθέτηση και η εφαρμογή της Μικροβιολογίας Πρόρρησης μπορεί να βοηθήσει στη διασφάλιση της υγιεινής των τροφίμων, μέσω της δυνατότητας ακριβέστερης εκτίμησης του κινδύνου για τη δημόσια υγεία, που σχετίζεται με ένα τρόφιμο ή μία διεργασία, καθώς και στην βελτίωση της ποιότητας των τροφίμων.

1.5. Σκοπός

Η παρούσα διατριβή είχε σαν στόχο να μελετήσει το πώς δύνανται να συμπεριφερθούν τα στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, προερχόμενα από διαφορετικά περιβάλλοντα και με διαφορετική προϋστορία, σε καταστάσεις που προκύπτουν κατά την διαδικασία παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς και στο περιβάλλον ενός τυροκομείου.

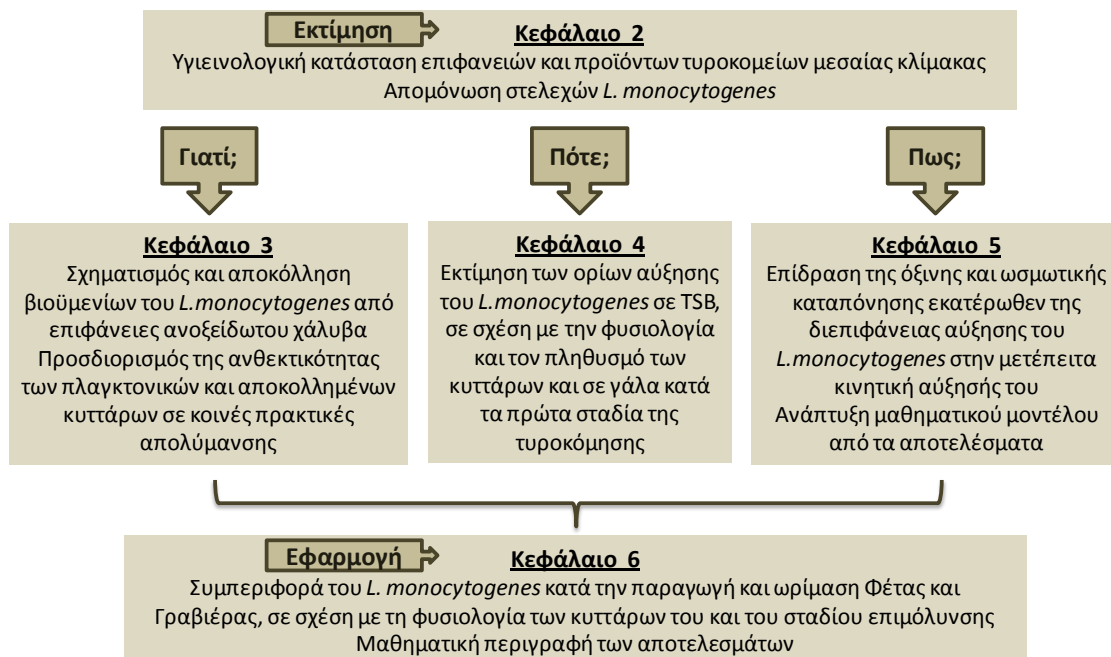
Για τον έλεγχο της μικροβιολογικής ασφάλειας των τροφίμων η βιομηχανία τροφίμων καλείται να τηρεί ορισμένα κριτήρια και όρια που θεσπίζονται από τον ΕΚ 1441/2007. Μέσα από την μελέτη του κανονισμού και της βαρύτητας που κατέχει σε αυτόν η *L. monocytogenes* εγείρονται ορισμένα ερωτήματα τα οποία αποτέλεσαν την βάση της παρούσας διατριβής. Σε πρώτο επίπεδο κρίθηκε σημαντική η εις βάθος γνώση τόσο του παθογόνου, της επικινδυνότητας του, του μηχανισμού δράσης του και του επιπολασμού του στα τρόφιμα, όσο και των συνθηκών που ευνοούν την μεταφορά του σε αυτά, καθώς και των διαθέσιμων εργαλείων και διαδικασιών για την καταγραφή και την αποτίμηση της επικινδυνότητάς του και τέλος τον έλεγχό του. Τα παραπάνω ερωτήματα απαντήθηκαν ως ένα σημείο στο πρώτο κεφάλαιο της διατριβής έπειτα από λεπτομερή βιβλιογραφική ανασκόπηση, η οποία ωστόσο με τη σειρά της γέννησε καινούρια ερωτήματα.

Με ισχυροποιημένη πλέον την εικόνα της ύπαρξης του προβλήματος σε παγκόσμιο επίπεδο, μέσα από επιδημιολογικά στοιχεία και καταγεγραμμένα κρούσματα λιστερίωσης, ακόμα και στο πολύ πρόσφατο παρελθόν, διαφάνηκε η ανάγκη της **εκτίμησης** του προβλήματος στην ελληνική πραγματικότητα. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε δειγματοληπτική έρευνα (survey) σε 6 γαλακτοκομικές επιχειρήσεις της Ελληνικής περιφέρειας, με σκοπό την μελέτη της υγιεινολογικής τους κατάστασης, τον προσδιορισμό του επιπολασμού του *L. monocytogenes* στις επιφάνειες παραγωγής και τα προϊόντα (αρχικά, ενδιάμεσα, τελικά, παραπροϊόντα) τους και τέλος, την απομόνωση των στελεχών του παθογόνου που τυχόν προέκυπταν.

Σε δεύτερο επίπεδο, το ερώτημα που τέθηκε ήταν **γιατί** υπάρχει το πρόβλημα και ποιους μηχανισμούς διαθέτει η *L. monocytogenes* που του επιτρέπουν να επιβιώνει σε επιφάνειες και να επιμολύνει στη συνέχεια τα προϊόντα. Ο κύριος μηχανισμός που χρησιμοποιεί το παθογόνο για να επιβιώσει στις συνθήκες καταπόνησης που επικρατούν στις επιφάνειες παραγωγής τροφίμων είναι ο σχηματισμός βιοϋμενίων, ο οποίος επηρεάζεται μεταξύ άλλων και από την φυσιολογία των κυττάρων του. Επομένως, σχεδιάστηκαν πειράματα αρχικά για την αξιολόγηση της επίδρασης της φυσιολογίας της *L. monocytogenes* (κύτταρα αποκολλημένα από επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα ή πλαγκτονικά κύτταρα σε γαλακτοκομικά προϊόντα) και της θερμοκρασίας περιβάλλοντος στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων σε ανοξειδωτο χάλυβα και την μετέπειτα (ακολουθούμενη της αποκόλλησης) κινητική αύξησής του σε γάλα. Παράλληλα, μελετήθηκε η εκούσια (αβίαστη) αποκόλληση κυττάρων *L. monocytogenes*, μετά από προσκόλλησή τους στο δυσμενές περιβάλλον

του γιαουρτιού, και η αύξησή τους σε γάλα και κρέμα εμπορίου. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της αποτελεσματικότητας διαφόρων διαδικασιών απολύμανσης -χημικών και θερμικών- στην επιβίωση των βιοϋμενίων του παθογόνου, κάτω από όξινες ή οσμωτικές περιβαλλοντικές συνθήκες, σχετικές με αυτές ενός τυροκομείου.

Μελέτη φυσιολογικών χαρακτηριστικών στελεχών του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* απομονωθέντων από γαλακτοκομικές επιχειρήσεις



Σχήμα 1.12. Σχηματική αναπαράσταση της θεωρητικής βάσης των πειραμάτων της διατριβής

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε το **πότε** και υπό ποιές συνθήκες η *L. monocytogenes* δύναται να αυξηθεί σε ένα τρόφιμο αφού το επιμολύνει. Με δεδομένα τα διαφορετικά όρια του κανονισμού ανάλογα με το κατά πόσο οι φυσικοχημικές ιδιότητες του προϊόντος επιτρέπουν ή όχι την ανάπτυξη του παθογόνου, καθώς και την διαφορετική φυσιολογία των κυττάρων του στη μορφή των βιοϋμενίων, εξετάστηκε η πιθανότητα ανάπτυξης πλαγκτονικών, αποκολλημένων κυττάρων και βιοϋμενίων, σε συνάρτηση της οξύτητας και της αλατοπεριεκτικότητας του περιβάλλοντος, καθώς και της αρχικής τους συγκέντρωσης. Παράλληλα, μελετήθηκε η πιθανότητα ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα, γάλα και κατά τα πρώτα στάδια μίας τυροκόμησης. Μέρος του σκοπού και των δύο πειραμάτων ήταν η εξαγωγή μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης του φαινομένου (πιθανότητα ανάπτυξης) σε διαφορετικά υποστρώματα και τρόφιμα.

Την διερεύνηση του πότε μπορεί να αυξηθεί η *L. monocytogenes* εφόσον βρεθεί σε ένα τρόφιμο ακολούθησε το **πώς** αυξάνεται σε αυτό ανάλογα με τις φυσικοχημικές του ιδιότητες. Πραγματοποιήθηκε επομένως μελέτη της κινητικής ανάπτυξης του παθογόνου σε συνθήκες προσαρμοσμένης οξύτητας (pH) ή ενεργότητας ύδατος (a_w). Παράλληλα διερευνήθηκε η συμπεριφορά του βακτηρίου σε συνθήκες προσομοίωσης μιας διασταυρούμενης επιμόλυνσης στο περιβάλλον ενός τυροκομείου, πρακτικά με την μεταφορά σε υποστρώματα με διαφορετικές τιμές pH ή a_w . Και στην παρούσα πειραματική διαδικασία μέρος του σκοπού ήταν τα αποτελέσματα να αποτελέσουν βάση για την εξαγωγή μοντέλου περιγραφής της κινητικής ανάπτυξης του παθογόνου ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Για την ολοκλήρωση της διατριβής κρίθηκε απαραίτητη η **εφαρμογή** της γνώσης που προέκυψε από τα προηγούμενα πειράματα στις πραγματικές συνθήκες τυροκόμησης και ωρίμασης των Ελληνικών τυριών. Για το σκοπό αυτό ενσωματώθηκαν στον πειραματικό σκοπό η επίδραση της φυσιολογίας των κυττάρων, τα οποία προϋπήρχαν σε μορφή βιοϋμενίου ή σε αιώρηση, η πιθανότητα ανάπτυξης ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των τυριών και η κινητική ανάπτυξης ανάλογα με το στάδιο επιμόλυνσης και τη φυσιολογία των κυττάρων. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε τυροκόμηση και ωρίμαση Φέτας και Γραβιέρας, κατά την διάρκεια των οποίων, σύμφωνα με τα παραπάνω, μελετήθηκε η συμπεριφορά της *L. monocytogenes* σε σχέση με την τεχνολογία παραγωγής του κάθε τυριού, το στάδιο επιμόλυνσης του προϊόντος στις δύο τεχνολογίες και τέλος τη φυσιολογία του παθογόνου σε κάθε στάδιο ενοφθαλμισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΓΙΕΙΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΥΡΟΚΟΜΕΙΩΝ ΜΕΣΑΙΑΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥΣ

2.1 Εισαγωγή

Τα τυροκομικά προϊόντα ευρείας κατανάλωσης ανήκουν στα λεγόμενα "έτοιμα προς κατανάλωση" τρόφιμα, στα οποία δηλαδή δεν αναμένεται κάποια περαιτέρω επεξεργασία (π.χ. θερμική) από τον καταναλωτή. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και την συσκευασία τους, τα κατατάσσει στα πλέον ευπαθή προϊόντα όπου τόσο η υγιεινολογική τους κατάσταση κατά την έξοδο από τη μονάδα παραγωγής, όσο και η μεταχείριση που δέχονται κατά τη συντήρηση και διακίνησή τους πρέπει να υπόκεινται σε συνεχείς ελέγχους. Η υγιεινολογική κατάσταση των τυροκομείων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο επίπεδο της ασφάλειας και της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων (Bagge-Ravn et al., 2003). Οι παραγωγοί εφαρμόζοντας κατάλληλες πρακτικές εξυγίανσης των επιφανειών και κατάλληλες διαδικασίες χειρισμού των προϊόντων, είτε μέσω των Προσπαιτούμενων Προγραμμάτων (GMP, GHP, GSP) ή μέσω της εφαρμογής των διεθνών προτύπων (HACCP, ISO 22000:2005, BRC) μπορούν να μειώσουν την ύπαρξη των μικροοργανισμών στο περιβάλλον της επιχείρησης και την εξάπλωσή τους στα τρόφιμα, έτσι ώστε να ικανοποιούν τα όρια που θέτουν οι εθνικοί και οι Ευρωπαϊκοί κανονισμοί (ΕΚ 1441/2007).

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα, αν και ορισμένα εξ αυτών (ιδιαίτερα τα ζυμωμένα τυριά) θεωρούνται σχετικά σταθερά και ασφαλή τρόφιμα, έχουν κατά καιρούς εμπλακεί σε πολυάριθμα κρούσματα λιστερίωσης παγκόσμια (Waak και Tham, 2002, Latorre et al., 2009, Kousta et al., 2010). Οι περισσότερες περιπτώσεις αφορούσαν μαλακά τυριά που είχαν παρασκευαστεί από μη παστεριωμένο γάλα (Kousta et al., 2010). Υπήρξαν όμως και περιπτώσεις που αφορούσαν προϊόντα παρασκευασμένα από παστεριωμένο γάλα, γεγονός που υποδηλώνει την επιμόλυσή τους σε κάποιο από τα επόμενα στάδια της παραγωγής, αποθήκευσης ή εμπορίας τους (Lianou και Sofos, 2007). Η πλημμελής καθαριότητα και εξυγίανση των τυροκομικών μονάδων λόγω αμέλειας ή ελλιπούς γνώσης των κινδύνων, ενδέχεται να οδηγήσει στην προσκόλληση μικροοργανισμών στις επιφάνειες παραγωγής και στο σχηματισμό βιοϋμενίων, ευνοούμενων και από την παρουσία οργανικής ύλης (Shi και Zhu, 2009). Στο ευνοϊκό περιβάλλον των βιοϋμενίων ο παθογόνος παρουσιάζει αυξημένη ανθεκτικότητα στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις (π.χ. απολυμαντικά, φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τροφίμων κι επιφανειών) και αναμένεται να επιβιώσει για μακρά χρονική περίοδο, επιμολύνοντας τα διερχόμενα της επιφάνειας τρόφιμα (Pan et al., 2006, Wilks, et al., 2006, Latorre et al., 2009, Harakeh et al., 2009, Ratani et al., 2012). Οι αλληλεπιδράσεις της ενδογενούς χλωρίδας των τροφίμων με τα παθογόνα, οδηγεί συνήθως στην μείωση ή την εξάλειψη

των τελευταίων (Irlinger και Mounier, 2009). Εντούτοις, όταν η οικολογία των επιφανειών είναι επιβαρυνόμενη από μικροοργανισμούς της ενδογενούς χλωρίδας ή αλλοιογόνους, εξακολουθεί να υφίσταται ο κίνδυνος, λόγω της συνεισφοράς τους στην μείωση της ποιότητας των τελικών προϊόντων και του ενδεχομένου να δημιουργήσουν κατάλληλο περιβάλλον (μέσω της μεταβολικής τους δραστηριότητας ή της δημιουργίας εξωπολυσακχαριτών) για την επιβίωση των παθογόνων βακτηρίων (Bagge-Ravn et al., 2003).

Το πρώτο βήμα για τον έλεγχο του φαινομένου, εμφάνισης κρουσμάτων λιστερίωσης, αποτελεί ο προσδιορισμός και ο χαρακτηρισμός του. Για τον προσδιορισμό της εμφάνισης και του επιπολασμού (prevalence) της *L. monocytogenes* σε επιφάνειες τυροκομείων και γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες έρευνες σε πολλές χώρες (Farber et al., 1987, Pritchard et al., 1995, Kozak et al., 1996, Pak et al., 2002, Waak και Tham, 2002, Borucki et al., 2005, Colak et al., 2007, Arslan, 2008, Brien et al., 2009, Kousta et al., 2010, Angelidis et al., 2011). Σε γενικές γραμμές ο επιπολασμός της *L. monocytogenes* στα γαλακτοκομικά προϊόντα αναμένεται χαμηλότερος συγκριτικά με άλλα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα (κρεατοσκεβάσματα, ιχθυρά, κ.α., Λιάου και Sofos, 2007, EFSA, 2013). Σε πολλές περιπτώσεις τα στελέχη του παθογόνου εμφανίζουν περιοδικότητα, ενώ ο επιπολασμός του δύναται να ποικίλει ανάλογα με τον μήνα της δειγματοληψίας (Carlos et al., 2001, Kells και Gilmour, 2004, O' Brien et al., 2009). Την απομόνωση ακολουθεί η κατηγοριοποίηση (subtyping) του παθογόνου, με την χρήση της ανάλυσης PFGE, η οποία συνεισφέρει με την αντιστοίχιση στελεχών σε συγκεκριμένα σημεία της παραγωγικής διαδικασίας, με σκοπό την εύρεση της πηγής μιας επιμόλυνσης και την αντιμετώπισή της (Leite et al., 2006, Latorre et al., 2009, Lomonaco et al., 2009). Πέρα από τις παραδοσιακές μεθόδους απομόνωσης και ταυτοποίησης της *L. monocytogenes* από τα γαλακτοκομικά προϊόντα και τις επιφάνειες των τυροκομείων, έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται μοριακές μέθοδοι, όπως η αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και η αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time-qPCR), οι οποίες όταν προτυποποιηθούν χαρακτηρίζονται από την ταχύτητα, την οικονομία και την ευκολία τους (Cocolin et al., 2002, Marco και Wells-Bennik, 2008, Harakeh et al., 2009).

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η αποτύπωση της υγιεινολογικής κατάστασης των Ελληνικών τυροκομείων μεσαίας κλίμακας και των παραγόμενων προϊόντων τους, από την οποία μπορεί να εντοπιστούν οι πιθανές εστίες μίανσης και με βάση αυτές να μελετηθεί η συμπεριφορά των παθογόνων σε συνθήκες που προσομοιάζουν το περιβάλλον ενός τυροκομείου.

2.2 Υλικά και μέθοδοι

2.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Για την συλλογή υγιεινολογικών δεδομένων της κατάστασης της τυροκομίας στην Ελλάδα επιλέχθηκαν έξι τυροκομεία της περιφέρειας, από τα οποία ελήφθησαν δείγματα επιφανειών και προϊόντων περιοδικά, ανά περίπτωση από μία εβδομάδα μέχρι και έξι μήνες. Συγκεκριμένα, το πρώτο τυροκομείο (T1) βρίσκεται στον νομό Χανίων και εξετάστηκε τέσσερις φορές την περίοδο 5/07 με 4/09. Από το δεύτερο τυροκομείο (T2) στο νομό Ηρακλείου ελήφθησαν τρεις φορές δείγματα, από τον 10/07 μέχρι τον 10/08. Μια τυροκομική βιομηχανία μεσαίας κλίμακας στην Ηλεία αποτέλεσε την τρίτη μονάδα (T3), με υψηλή συχνότητα δειγματοληψίας (οκτώ δειγ/ψίες από 1/09 έως 3/09). Το τέταρτο τυροκομείο (T4) στο Μεσολόγγι εξετάστηκε δύο φορές (7/07 και 1/08), ενώ τα δύο τελευταία τυροκομεία σε Αμφιλοχία (T5) και Κόρινθο (T6) εξετάστηκαν από μία φορά (2/09). Σχεδόν το σύνολο των μονάδων δραστηριοποιείται στην παρασκευή και εμπορεία γάλακτος, γαλακτοκομικών προϊόντων (κρέμα, βούτυρο, ανθόγαλα, κ.α.), γιαούρτης, Φέτας, σκληρών τυριών (Γραβιέρα, Κεφαλογραβιέρα, Κεφαλοτύρι, κ.α.), και τυριών ορού (μυζήθρα, ανθότυρο, κ.α.), κυρίως σε τοπικό αλλά και σε πανελλαδικό δίκτυο, ενώ ορισμένες εξάγουν στο εξωτερικό. Σε κάθε μία από τις δειγματοληψίες επιλέγονταν συγκεκριμένα στάδια της εκάστοτε τεχνολογίας από την παραλαβή του νωπού γάλακτος μέχρι και την συντήρηση των τελικών προϊόντων, από τα οποία λαμβάνονταν δείγματα επιφανειών, σκευών και εργαλείων, νερού και αποβλήτων, καθώς και αρχικών, ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων.

2.2.2. Δειγματοληψία επιφανειών και προϊόντων

Η δειγματοληψία των επιφανειών πραγματοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση μετά τη διαδικασία απολύμανσης, ακολουθώντας τη μέθοδο EN ISO 18593 (2004) με τη χρήση στείρων βυσμάτων από γάζα, εμπλουτισμένων (4 ml) με προστατευτικό για τα κύτταρα διάλυμα πεπτόνης, χλωριούχου νατρίου, λεκιθίνης και πολυσορβιτόλης (Tween 80). Στον χώρο της δειγματοληψίας, τα βύσματα απομακρύνονταν από την συσκευασία τους με την χρήση αποστειρωμένης λαβίδας ή ειδικών πλαστικών γαντιών, που αλλάζονταν ανά δείγμα, και σύρονταν μηχανικά και από τις δύο πλευρές σε επιφάνειες 10*10 cm. Από κάθε επιφάνεια δοκιμής ελήφθησαν συνολικά τρία δείγματα για την απαρίθμηση των αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών (3x 100cm², n=3) και δυο (2x100cm², n=2) για τον προσδιορισμό των παθογόνων *L. monocytogenes* (n=1) και *Salmonella* spp (n=1). Τα βύσματα μεταφέρονταν στις σακούλες δειγματοληψίας (Stomacher), οι οποίες τοποθετούνταν σε ψυγεία χειρός (cool box) με παγοκυψέλες και καταγραφείς θερμοκρασίας μέσα

στα οποία μεταφέρονταν στους 1-4°C στο εργαστήριο και αναλύονταν σε διάστημα μικρότερο των 24 ωρών (Gounadaki et al., 2008).

Για τη δειγματοληψία των προϊόντων, τουλάχιστον τρία δείγματα των 100-250g ή ml ή στην περίπτωση συσκευασμένων προϊόντων (κρέμα, γιαούρτι, μαλακό τυρί) τρεις συσκευασίες, συλλέγονταν από διάφορα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας. Τα δείγματα των τροφίμων μεταφέρονταν ταυτόχρονα και στις ίδιες συνθήκες με τα βύσματα από τις επιφάνειες (1-4°C) στο εργαστήριο και αναλύονταν εντός της ημέρας.

2.2.3 Απαρίθμηση αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών από επιφάνειες και προϊόντα

Για την ανάλυση των δειγμάτων επιφανειών, προσθέτονταν 40 ml από το προστατευτικό πεπτονούχο διάλυμα σε κάθε σακούλα ομογενοποίησης που περιείχε τα βύσματα με τα κύτταρα από τις επιφάνειες (EN ISO 18593, 2004). Για την ανάλυση δειγμάτων προϊόντων 25 g τροφίμου μεταφέρονταν ασηπτικά σε σακούλα ομογενοποίησης και στη συνέχεια προσθέτονταν 225 ml MRD (Maximum Recovery Diluent, Biolife, Italy). Ακολουθούσε ομογενοποίηση ενός λεπτού των δειγμάτων από τις επιφάνειες και δύο λεπτών των δειγμάτων τροφίμων σε ομογενοποιητή (Stomacher). Το ομογενοποιημένο δείγμα των επιφανειών αποτελούσε τη μηδενική αραιώση 10^0 , ενώ το αντίστοιχο των προϊόντων την πρώτη αραιώση 10^{-1} . Τα δείγματα νωπού ή παστεριωμένου γάλακτος, καθώς και τα δείγματα αποβλήτων εξετάζονταν όπως παραλαμβάνονταν (μηδενική αραιώση). Έπειτα από τις κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με αποστειρωμένο διάλυμα MRD, ακολουθούσε επιφανειακή εξάπλωση ή ενσωμάτωση σε διπλά τρυβλία petri με το κατάλληλο εργαστηριακό υπόστρωμα ανά εξεταζόμενη ομάδα μικροοργανισμών, όπως αναγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ): Για την καταμέτρηση της ΟΜΧ, ποσότητα 0,1 ml από τις επιλεγμένες δεκαδικές αραιώσεις μεταφέρονταν με επιφανειακή επίστρωση στο μη επιλεκτικό υπόστρωμα Tryptic Soy Agar κι επωάζονταν στους 30°C για 48 ώρες. Στην καταμέτρηση συμπεριλαμβάνονταν το σύνολο των αποικιών (EN ISO 4833:2003).

Εντεροβακτήρια: Για την ανάλυση των εντεροβακτηριδίων, ποσότητα 1 ml από τις κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις μεταφέρονταν με την τεχνική της ενσωμάτωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar κι επωάζονταν στους 37°C για 24 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης καταμετρούνταν οι χαρακτηριστικές φακοειδείς ιώδεις αποικίες καθώς και οι λευκές στην επιφάνεια ή τα τοιχώματα του τρυβλίου (EN ISO 21528-2:2004).

Ολικά Κολοβακτηρίδια και *E. coli*: Για την απαρίθμηση των κολοβακτηριδίων, ποσότητα 1 ml από τις επιλεγμένες δεκαδικές αραιώσεις μεταφέρονταν με ενσωμάτωση στο επιλεκτικό υπόστρωμα Chromocult Coliform Agar κι επωάζονταν στους 37°C για 24 ώρες. Η απαρίθμηση

συμπεριελάμβανε τις χαρακτηριστικές αποικίες των μικροοργανισμών (ιώδες, σομόν και πράσινο). Οι ύποπτες αποικίες για *E.coli* (σκούρο ιώδες χρώμα) μεταφέρονταν από το Chromocult Coliform Agar, σε ένα δεύτερο επιλεκτικό το Chromocult TBX (Tryptone Bile X-glucoronide) Agar (Merck) κι επωάζονταν αρχικά στους 37°C για 3-4 ώρες και στη συνέχεια στους 44°C για 18-20 ώρες. Σύμφωνα με το εγχειρίδιο της εταιρίας, οι χαρακτηριστικές αποικίες μπλε-πράσινου χρώματος ανήκουν στο είδος *E. coli*. Για την επιπλέον, ταυτοποίηση του παθογόνου στελέχους *E. coli* 0157:H7 πραγματοποιήθηκε μεταφορά άχρωμων αποικιών από το Chromocult TBX Agar στο επιλεκτικό υπόστρωμα Fluorocult *E. coli* 0157:H7 Agar (Merck) κι επώαση στους (EN ISO 4832:2006).

Μικρόκοκκοι και *S. aureus*: Η καταμέτρηση των μικρόκοκκων και του παθογόνου μικροοργανισμού *S. aureus* έλαβε χώρα με μεταφορά ποσότητας 0,1 ml από τις επιλεγμένες δεκαδικές αραιώσεις με επιφανειακή επίστρωση στο επιλεκτικό υπόστρωμα Baird Parker Agar με προσθήκη Egg Yolk Tellurite κι επώαση στους 37°C, για 48 ώρες. Για την απαρίθμηση του *S. aureus* λαμβάνονταν υπ' όψιν οι χαρακτηριστικές μαύρες πολυγωνικές αποικίες με υποκίτρινο και διαφανές άλω. Μέρος των αποικιών μεταφέρονταν σε υγρό μη επιλεκτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion Broth (Biolife), το οποίο επωάζονταν στους 37°C για 20-24 ώρες και στη συνέχεια πραγματοποιούταν το τεστ κοαγκουλάσης (Bactident Coagulase, Merck, 37°C για 24 ώρες), για την επιβεβαίωση των θετικών σε *S. aureus* δειγμάτων. Παράλληλα λάμβανε χώρα μικροσκοπική εξέταση μετά από χρώση Gram (χαρακτηριστικοί ιώδεις κόκκοι ενωμένοι σε μορφολογία τσαμπιού). Το σύνολο των μαύρων αποικιών μικρής διαμέτρου (≈ 1 mm) απαριθμούνταν ως μικρόκοκκοι (EN ISO 6888-1: 1999/Amd.1:2003).

Ζύμες και Μύκητες: Η μικροβιολογική ανάλυση των ζυμών και μυκήτων έγινε με μεταφορά ποσότητας 0,1 ml από τις κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις, με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα Chloramphenicol Glucose Yeast Extract Agar (YGC), κι επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 3-5 ημέρες. Μετά το πέρας της επώασης μετρήθηκε το σύνολο των αποικιών ή/και των υφών ανεξαρτήτως μορφολογίας και χρώματος (EN ISO 21527-1:2008).

Η προετοιμασία των υποστρωμάτων, καθώς και όλη η διαδικασία αραιώσης του πληθυσμού των κυττάρων και της επίστρωσης ή ενσωμάτωσης στα στερεά εργαστηριακά υποστρώματα γινόταν πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες. Εντούτοις, πραγματοποιούνταν τακτικά κλασικές μικροβιολογικές αναλύσεις ταυτοποίησης σε ποσοστό των αποικιών από κάθε υπόστρωμα, όπως η μικροσκοπική ανάλυση, η δοκιμή της χρώσης Gram, καθώς και οι δοκιμές οξειδάσης και καταλάσης, με σκοπό την επικύρωση ότι οι καταμετρούμενες αποικίες ανήκουν στον εκάστοτε υπό εξέταση μικροοργανισμό.

2.2.4. Ανίχνευση των *L. monocytogenes* και *Salmonella* spp. από επιφάνειες και προϊόντα

Για την ανίχνευση των παθογόνων *L. monocytogenes* και *Salmonella* spp, πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός των κυττάρων που περιέχονταν σε ορισμένη ποσότητα των δειγμάτων προϊόντων ή σε κάθε βύσμα από τις επιφάνειες στα κατάλληλα υποστρώματα και στη συνέχεια η απομόνωση και ο καθαρισμός και η βιοχημική ταυτοποίησή τους, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των διεθνών προτύπων ISO 11290:1 (1996; Amd 1:2004) και ISO 6579 (2002), αντίστοιχα. Πιο αναλυτικά, στις σακούλες με τα βύσματα που προορίζονταν για την ανίχνευση των παθογόνων, προστέθηκαν 100 ml *Listeria* Fraser broth base half concentration (Biolife, Italiana, 1^{ος} εμπλουτισμός) ή 100 ml Buffered Peptone Water (BPW), ομογενοποιήθηκαν σε ειδικό όργανο (Stomacher, Laboratory Blender, Stomacher 400) για 1 λεπτό κι επώαστηκαν στους 30°C και 37°C αντίστοιχα για 24 ώρες. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε στα δείγματα τροφίμων, όπου 25g τροφίμου μεταφέρθηκε σε 225ml εμπλουτιστικού κι ομογενοποιήθηκε για 2 λεπτά στο Stomacher. Το σύνολο αφέθηκε για επώαση στους 30°C για το ½ Fraser broth και τους 37°C για το BPW, αντίστοιχα.

Στη διαδικασία της απομόνωσης της *L. monocytogenes* επακολούθησε δεύτερος εμπλουτισμός με μεταφορά 0,1ml από το ½ Fraser broth σε 10ml Full *Listeria* Fraser broth (Biolife), και επώαση στους 37°C για 24 ώρες. Από τα δείγματα που σημείωσαν αλλαγή χρώματος από το αρχικό σε μαύρο έγινε επιφανειακή εξάπλωση σε *Listeria* Agar acc to Ottaviani and Agosti (ALOA, Biolife) με την βοήθεια στείρου κρίκου και τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. Στην περίπτωση που εμφανίζονταν οι χαρακτηριστικές αποικίες (πράσινες-μπλέ με άλω) ακολουθούσε απομόνωσή τους με μεταφορά κάθε μίας σε ξεχωριστό τρυβλίο με Tryptic Soy Agar Yeast Extract (TSAYE, Tryptic Soy Agar + 0,6% Yeast Extract, Biolife) κι επώασή τους στους 37°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια λαμβάνονταν αποικίες από το TSAYE (χαρακτηριστικού ανοιχτού γαλάζιου χρώματος), για τις βιοχημικές δοκιμές ταυτοποίησης, όπως τις ορίζει το πρότυπο: χρώση Gram, τεστ οξειδάσης (Bactident Oxidase, Merck) και καταλάσης (3% H₂O₂, Mallinckrodt), τεστ κινητικότητας (Tryptic Soy Yeast Extra Broth, TSBYE και επώαση στους 25 °C για 24 ώρες), αιμολυτικά τεστ (Blood Agar και επώαση στους 37 °C για 24 ώρες) και αντίδραση στα σάκχαρα ραμνόση και ξυλόζη (L(+)- Rhamnose monohydrate, D(+)- Xylose, Merck κι επώαση στους 37 °C για 24 ώρες).

Στην διαδικασία απομόνωσης των *Salmonella* spp. (ISO 6579, 2002), μετά τον πρώτο εμπλουτισμό των δειγμάτων σε BPW πραγματοποιήθηκε δεύτερος εμπλουτισμός με την μεταφορά ποσότητας 0,1 ml σε 10 ml επιλεκτικού υποστρώματος *Salmonella* enrichment broth acc to Rappaport and Vassiliadis (RVS broth, Merck) κι επώαση στους 42°C για 24 ώρες. Σύμφωνα με το εγχειρίδιο της εταιρίας, η αλλαγή του χρώματος του υποστρώματος από σκούρο πράσινο σε ανοικτό πράσινο, υποδήλωνε θετικό στα *Salmonella* spp δείγμα. Για τον λόγο αυτό, ακολουθούσε επιφανειακή εξάπλωση με την βοήθεια στείρου κρίκου αρχικά στο επιλεκτικό υπόστρωμα Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD, Biolife, 37°C για 24 ώρες) και στην συνέχεια μαύρες αποικίες

μεταφέρονταν στο μη επιλεκτικό υπόστρωμα Tryptic Soy Agar (επώαση στους 37°C για 24 ώρες), για τον καθαρισμό τους και τις περαιτέρω βιοχημικές δοκιμές ταυτοποίησης.

2.2.5. Φυσικοχημικές αναλύσεις

Παράλληλα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις των προϊόντων πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ενεργότητας ύδατος (a_w) (WTW MultiCal, rotronic/HygroLab) και του pH (pH 526, Bel Engineering) κάθε εξεταζόμενου δείγματος. Στα δείγματα στερεών τροφίμων η μέτρηση το pH γίνονταν στην πρώτη αραίωση.

2.2.6. Μοριακές μέθοδοι ταυτοποίησης των απομονωθέντων στελεχών *L. monocytogenes*

Μετά από την απομόνωση των στελεχών της *L. monocytogenes* από τα τρόφιμα και τις επιφάνειες, καθώς και την ολοκλήρωση των βιοχημικών δοκιμών, όπως τις ορίζει το πρότυπο, χαρακτηριστικές αποικίες του μικροοργανισμού διατηρούνταν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSBYE με την προσθήκη 20% γλυκερόλης, στους -22°C. Οι αποικίες προετοιμάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους D'Agostino et al. (2004), με την χρήση των εκκινητών LIP1 και LIP2 και δοκιμάστηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την επιβεβαίωση ότι ανήκουν στο είδος *L. monocytogenes*. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE) με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Kagkli et al. (2009), με την χρήση των περιοριστικών ενζύμων *AscI* και *ApaI*.

2.2.7. Ανάλυση αποτελεσμάτων

Οι αποικίες που μετρήθηκαν στα υποστρώματα μεταφράστηκαν σε CFU/ml ή g προϊόντος, σύμφωνα με το πρότυπο ISO 15214:1998, ενώ για τα δείγματα των επιφανειών μεταφράστηκαν σε CFU/cm², σύμφωνα με το πρότυπο ISO 18593:2004. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα μετατράπηκαν σε δεκαδικούς λογαρίθμους, log CFU/ml ή g και log CFU/cm², αντίστοιχα και υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης πολλαπλών παραγόντων με τη χρήση του γενικευμένου γραμμικού μοντέλου του στατιστικού προγράμματος SPSS (16.0). Εφαρμόστηκε η δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Tukey's για τον εντοπισμό των στατιστικά σημαντικών διαφορών των επιμέρους επιπέδων των παραγόντων, ενώ ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το $\alpha=0,05$.

2.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στην προσπάθεια αποτύπωσης της υγιεινολογικής κατάστασης των Ελληνικών τυροκομείων μεσαίας κλίμακας, πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε έξι τυροκομεία της Ελληνικής επικράτειας, από τα οποία ελήφθησαν συνολικά 390 δείγματα επιφανειών και προϊόντων κατά το χρονικό διάστημα 2007-2009, σε περιόδους παραγωγής των προϊόντων. Το σύνολο των τυροκομικών μονάδων πραγματοποιούσε τακτικούς ελέγχους της μικροβιολογικής κατάστασης των επιφανειών και των προϊόντων τους σε εξωτερικά εργαστήρια κι απασχολούσε εξειδικευμένο προσωπικό με γνώσεις υγιεινής, κατάλληλο για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, ενώ τέσσερα από αυτά εφάρμοζαν τις αρχές του συστήματος HACCP ή βρίσκονταν υπό διαδικασία πιστοποίησης (T3, T4, T5, και T6). Οι ομάδες μικροοργανισμών που επιλέχθηκαν να εξεταστούν αφορούσαν κυρίως σε παθογόνους μικροοργανισμούς, καθώς και σε μικροοργανισμούς δείκτες υγιεινής που αφορούν το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως είναι οι ζύμες και οι μύκητες, τα εντεροβακτήρια και τα κολοβακτηρίδια, οι μικρόκοκκοι και *S. aureus*, το *E. coli*, τα *Salmonella* spp. και η *L. monocytogenes*. Παράλληλα ελέγχθηκε η ολική μεσόφιλη χλωρίδα των τροφίμων και των επιφανειών, η οποία στα περισσότερα από τα τρόφιμα, λόγω της φύσης τους (ζυμώμενα) αποτελούνταν κατά κύριο λόγο από οξυγαλακτικά βακτήρια. Σε μια πρώτη γενικευμένη αποτίμηση της εικόνας των υπό εξέταση τυροκομείων μπορεί να ειπωθεί ότι κατά την περίοδο της έρευνας υπήρχε σημαντικό περιθώριο βελτίωσης με βάση τα όρια του κανονισμού ΕΚ 1441/2007, εντούτοις παρατηρήθηκαν χαμηλά ποσοστά ανίχνευσης ή/και καταμέτρησης παθογόνων μικροοργανισμών.

Ιδιαίτερα επιβαρυνμένο από μικροβιολογικής άποψης βρέθηκε το αρχικό προϊόν (νωπό γάλα, Σχ. 2.1 και 2.3), καθώς και οι συσκευές φύλαξης και μεταφοράς του (παγολεκάνες, Σχ. 2.2 και 2.4). Χαρακτηριστική είναι η εικόνα του νωπού γάλακτος στο Σχ. 2.3, όπου διαφαίνεται σχεδόν το σύνολο των εξεταζόμενων μικροοργανισμών σε επίπεδα άνω των 4 log CFU/ml, σε συνδυασμό με την ανίχνευση παθογόνων σε παγολεκάνη ή γάλα παγολεκάνης (Πιν. 2.1). Οι υψηλοί πληθυσμοί παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών στην χλωρίδα του νωπού γάλακτος μπορούν να δημιουργήσουν ποικίλα προβλήματα στην ποιότητα και την ασφάλεια των τελικών προϊόντων (Kousta et al., 2010). Προβλήματα σχετικά με την τεχνολογία των τυριών (αδυναμία πήξης), την επιμόλυνση των επιφανειών και την μετέπειτα δυσκολία στον καθαρισμό τους (λόγω δημιουργίας βιοϋμενίων), την επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών (ιδιαίτερα σε τυριά νωπού ή θερμισμού γάλακτος) κ.α. Το νωπό γάλα αποτελεί μια εξαιρετικά ευαίσθητη πρώτη ύλη, η οποία απαιτεί σωστό χειρισμό από όλους τους εμπλεκόμενους, ωστόσο η έλλειψη γνώσης των ορθών πρακτικών τόσο από τους κτηνοτρόφους, όσο και από τους παραγωγούς οδηγεί στην σημαντική και ταχεία υποβάθμισή του. Στις μέρες μας, οι μεγάλης κλίμακας γαλακτοβιομηχανίες συνεργάζονται άμεσα με τους προμηθευτές τους σε επίπεδα που φτάνουν μέχρι και την ποιότητα της τροφής των ζώων.

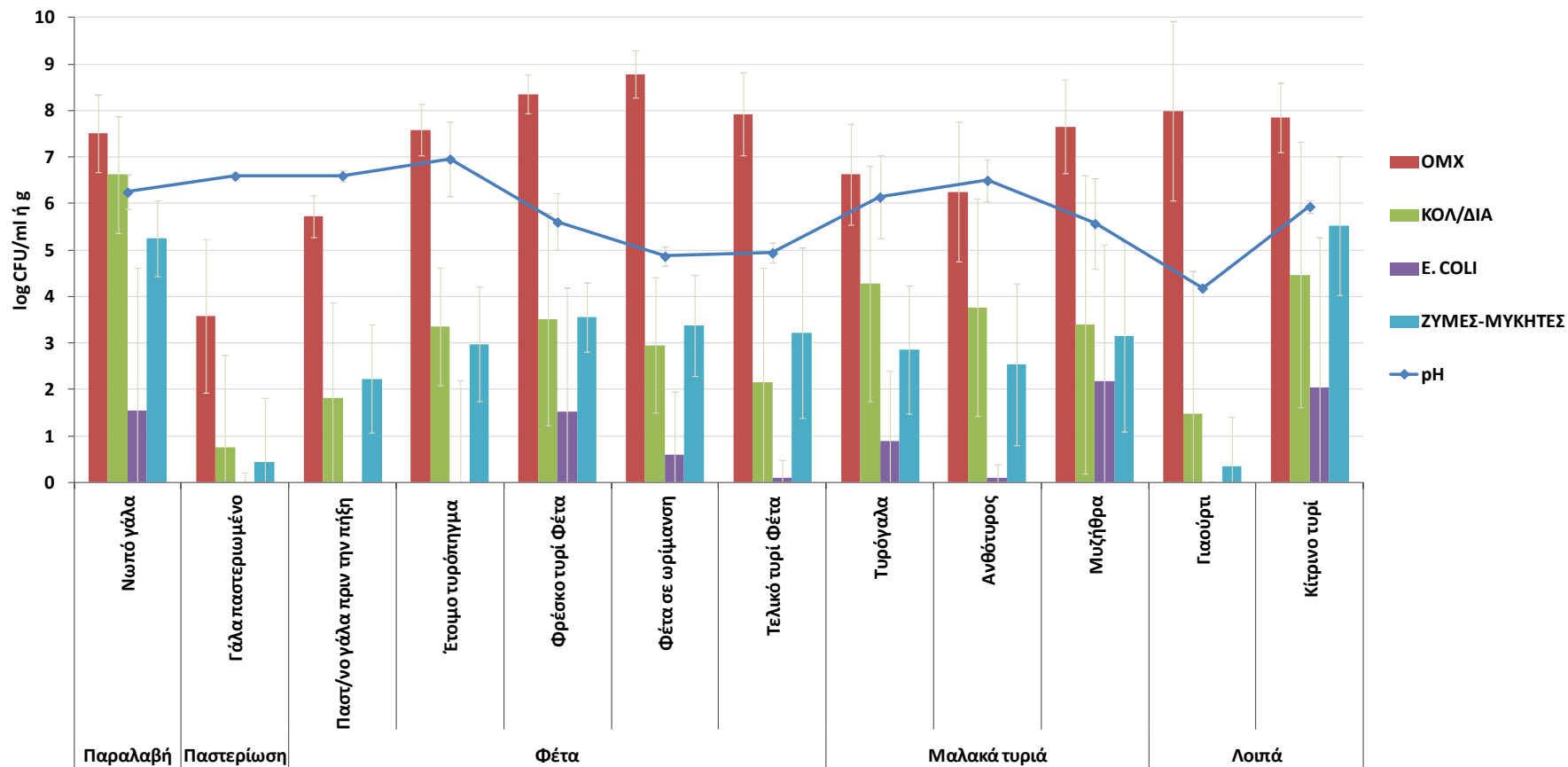
Πίνακας 2.1. Μικροβιολογική κατάσταση (log CFU/g ή ml) των δειγμάτων προϊόντων ή επιφανειών στα οποία ανιχνεύτηκαν οι μικροοργανισμοί *L. monocytogenes*, *Listeria* spp. και *Salmonella* spp. και καταμετρήθηκαν οι *Staphylococcus aureus* (>2 log CFU/g ή ml)¹ και *Escherichia coli* (>3 log CFU/g ή ml)².

ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜ.	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΤΥΡΟΚΟΜΕΙΟ	ΟΜΧ	ΕΝΤΡΟΒΑ		E. COLI	MICRO		ΖΥΜΕΣ		SALMONELLA	
				ΚΤΗΡΙΑΔΙΑ	ΚΟΛ/ΔΙΑ		COCCI	S. AUREUS	ΜΥΚΗΤΕΣ	SPP.	LISTERIA SPP.	
<i>Listeria</i>	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	Δάπεδο (πλακάκια υγιεινής - στεγνά)	1	6,40	6,78	6,40	<OA	3,84	<OA	3,64	ΔΑ	+
<i>monocytogenes</i>	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	Μεταλλική επιφάνεια πιεστηρίου	1	6,16	5,26	5,59	<OA	5,32	<OA	5,41	ΔΑ	+
	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	Απόβλητα ξεπλύματος - 'Ανευ χούμας	1	7,96	7,19	>7,00	<OA	5,11	<OA	4,68	ΔΑ	+
	ΠΡΟΪΟΝ	Ανθότυρος	1	8,79	4,95	>7,00	<OA	5,75	<OA	0,00	ΔΑ	+
<i>Listeria</i> spp.	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	Πάγκος εργασίας	3	2,79	-	2,76	<OA	-	<OA	4,76	-	+
	ΠΡΟΪΟΝ	Γάλα από βυτίο (πριν επεξεργαστεί)	3	8,09	-	7,59	7,26	-	<OA	5,59	-	+
	ΑΠΟΒΛΗΤΑ	Νερό-απόβλητα	3	7,78	-	7,55	<OA	-	<OA	4,86	-	+
	ΑΠΟΒΛΗΤΑ	Απόβλητα	3	7,46	-	1,47	<OA	-	<OA	5,63	-	+
<i>Salmonella</i> spp.	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	Βάση μεταλλική στιβαγμένων καλουπιών	4	5,19	4,47	4,58	<OA	4,75	<OA	2,74	+	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Τυρόγαλα από σιλό	4	7,49	6,08	8,03	4,30	4,50	<OA	<OA	+	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Τυρόπηγμα προς ημίπαχο	4	8,05	5,16	5,05	4,92	3,16	<OA	2,60	+	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Λευκό τυρί τελικό πριν διακ. συσκευασία	4	8,23	2,59	<OA	<OA	3,06	<OA	<OA	+	ΔΑ
<i>S. aureus</i>	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	Παγολεκάνη (σε χρήση) με γάλα (0-4οC)	1	6,07	4,47	5,87	<OA	4,65	3,30	3,97	ΔΑ	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Ανάχυμα πάνω	1	8,51	4,48	>7,00	<OA	5,32	3,70	4,30	ΔΑ	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Γάλα από παγολεκάνη 4οC	1	8,31	4,91	5,48	<OA	5,55	5,55	5,03	ΔΑ	ΔΑ
	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	Πλαστικό καλούπι μυζήθρας (ανθότυρος μαλακός)	2	3,32	3,47	3,45	<OA	2,99	2,63	3,32	ΔΑ	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Γάλα παστεριωμένο 70,9οC- 30 sec	2	3,60	<OA	<OA	<OA	<OA	3,85	1,00	ΔΑ	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Νωπό γάλα- Παγολεκάνη	4	5,99	5,80	5,62	<OA	3,20	3,11	3,36	ΔΑ	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Νωπό γάλα σιλό 25/1	4	8,94	6,34	8,50	<OA	5,00	3,85	6,23	ΔΑ	ΔΑ
<i>E. coli</i>	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	Εσωτερικά τοιχώματα παγολεκάνης	4	3,64	3,53	3,33	<OA	2,70	2,70	3,76	ΔΑ	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Γάλα μυζήθρα 45οC	1	8,87	5,89	6,59	6,59	5,95	<OA	3,54	ΔΑ	ΔΑ
	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	Ποδιά εργαζόμενης (μετά την πρώτη ωρίμανση)	4	4,44	<OA	4,49	4,49	4,29	<OA	3,00	ΔΑ	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Λευκό τυρί, τύπου Φέτα πριν την ωρίμανση	4	8,49	7,58	7,70	7,55	4,23	<OA	4,38	ΔΑ	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Λευκό τυρί, τύπου Φέτα πριν την 1η ωρίμανση	4	8,60	6,04	6,27	6,26	5,88	<OA	4,20	ΔΑ	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Κεφαλοτύρι παραγωγής 11/09/07	2	7,64	7,25	7,25	7,23	6,98	<OA	3,78	ΔΑ	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Τυρί φέτα 1ημέρας	3	8,36	-	4,51	3,40	-	-	3,54	-	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Τυρί από πήχτρα (πριν τοποθετηθεί στο καλούπι)	3	7,53	-	4,68	4,04	-	-	2,93	-	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Γάλα παραλαβής	1	8,30	-	7,01	6,66	-	-	5,10	-	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Άλμη	1	7,00	-	3,99	3,68	-	-	3,68	-	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Πεκορίνο 23/01 (ωριμαντήριο)	1	8,39	-	5,50	5,00	-	-	6,93	-	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Μυζήθρα 13/01/09	6	6,35	-	4,48	3,48	4,89	-	-	-	ΔΑ
	ΠΡΟΪΟΝ	Φέτα σε ωρίμανση	6	8,96	-	4,65	3,00	4,33	-	-	-	ΔΑ
	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	Παγολεκάνη κτηνοτρόφου	3	5,80	-	4,98	4,98	-	-	2,64	-	ΔΑ

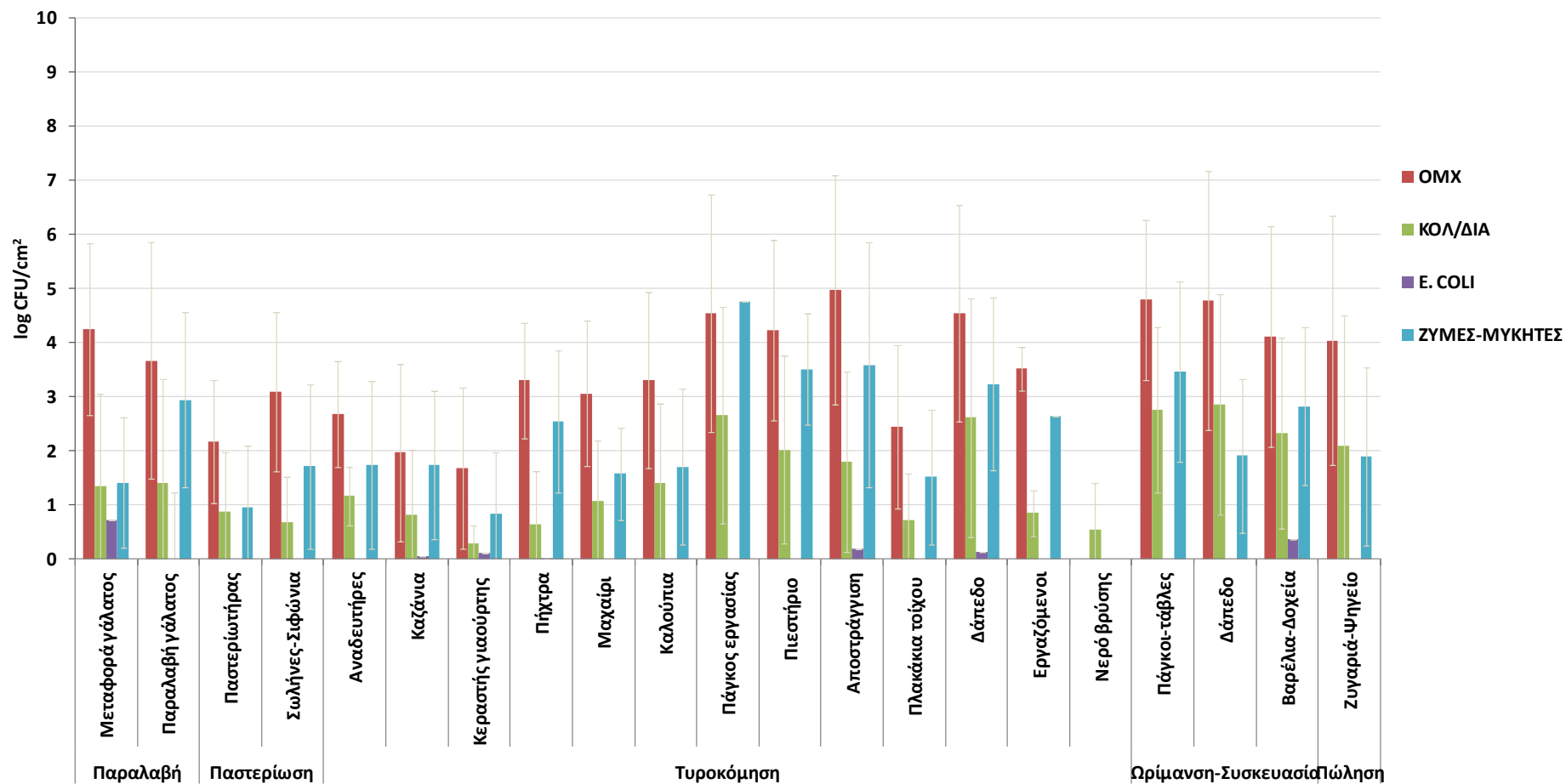
OA: Όριο αρίθμησης της μεθόδου, ΔΑ: Δεν ανιχνεύτηκε, -: Δεν εξετάστηκε

¹: ΕΚ 1441/2007, παρ. 2.2.3.-5. και 1.21 (για Σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες)

²: ΕΚ 1441/2007, παρ. 2.2.2. (δείκτης επιπέδου υγιεινής)



Σχήμα 2.1. Πληθυσμοί της μικροβιακής χλωρίδας (μέσος όρος log CFU/ml ή g) των υπό εξέταση αρχικών, ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων, στα διαφορετικά στάδια της παραγωγικής διαδικασίας. Στο σχήμα απεικονίζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις για την ολική μεσόφιλη χλωρίδα (■, TSA), τα ολικά κολοβακτηρίδια (■, CCA), το *E. coli* (■, TBX), τις ζύμες και τους μύκητες (■, YGCA) και το pH (—).



Σχήμα 2. 2. Πληθυσμοί της μικροβιακής χλωρίδας (μέσος όρος log CFU/cm²) των υπό εξέταση επιφανειών, στα διαφορετικά στάδια της παραγωγικής διαδικασίας.

Στο σχήμα απεικονίζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις για την ολική μεσόφιλη χλωρίδα (■, TSA), τα ολικά κολοβακτηρίδια (■, CCA), το *E. coli* (■, TBX), τις ζύμες και τους μύκητες (■, YGCA).

Εντούτοις, σε επιχειρήσεις μικρότερης κλίμακας εξακολουθεί να υφίσταται η αγορά γάλακτος υποβαθμισμένης ποιότητας λόγω της χαμηλότερης τιμής του. Τέλος, η ύπαρξη των εντεροβακτηρίων στο παστεριωμένο γάλα στο 20% των δειγμάτων που εξετάστηκαν (3/15, T1, T4) σε τιμές μεγαλύτερες του κανονισμού (5 CFU/ml, ΕΚ 1441/2007) καθώς και των κολοβακτηριδίων επιβεβαιώνει την βεβαρημένη κατάσταση του αρχικού προϊόντος καθώς και τις αστοχίες κατά την θερμική επεξεργασία και τον μετέπειτα χειρισμό του γάλακτος.

Αναφορικά με τους παθογόνους μικροοργανισμούς, 4 δείγματα βρέθηκαν θετικά σε *Salmonella* spp. σε σύνολο 90 δειγμάτων (4,5%), ενώ από σύνολο 390 δειγμάτων βρέθηκαν 4 θετικά σε *L. monocytogenes* (1%) και 8 σε *Listeria* spp. (2%). Παρατηρώντας τη συνολική εικόνα των εν λόγω δειγμάτων φαίνεται ότι η ύπαρξη των παθογόνων μπορεί να συσχετιστεί με την υψηλή ολική μικροβιολογική χλωρίδα και με την ύπαρξη υψηλών πληθυσμών των δεικτών υγιεινής (Πιν. 2.1). Ενδιαφέρον επίσης, αποτελεί το γεγονός ότι το σύνολο των απομονώσεων καθενός εκ των παθογόνων, προέρχονταν από ένα συγκεκριμένο τυροκομείο κατά την ίδια δειγματοληψία. Στην περίπτωση του T1, μετά την ανίχνευση της *L. monocytogenes* και την εν γένει επιβαρυσμένη κατάσταση των επιφανειών και των δειγμάτων του, έγιναν συστάσεις με αποτέλεσμα την σαφή βελτίωση της εικόνας του στις επόμενες δειγματοληψίες. Στο T4 η ύπαρξη *Salmonella* spp. πιθανόν να οφείλονταν σε επιμόλυνση που αντιμετωπίστηκε έγκαιρα, καθώς σε καμία άλλη δειγματοληψία δεν ανιχνεύτηκε το παθογόνο (Πιν. 2.1.). Το εν λόγω εύρημα τονίζει την σημασία του τακτικού ελέγχου της υγιεινολογικής εικόνας μιας επιχείρησης παραγωγής τροφίμων, με σκοπό τον άμεσο εντοπισμό μιας αστοχίας ή επιμόλυνσης και την γρήγορη αντιμετώπιση τους.

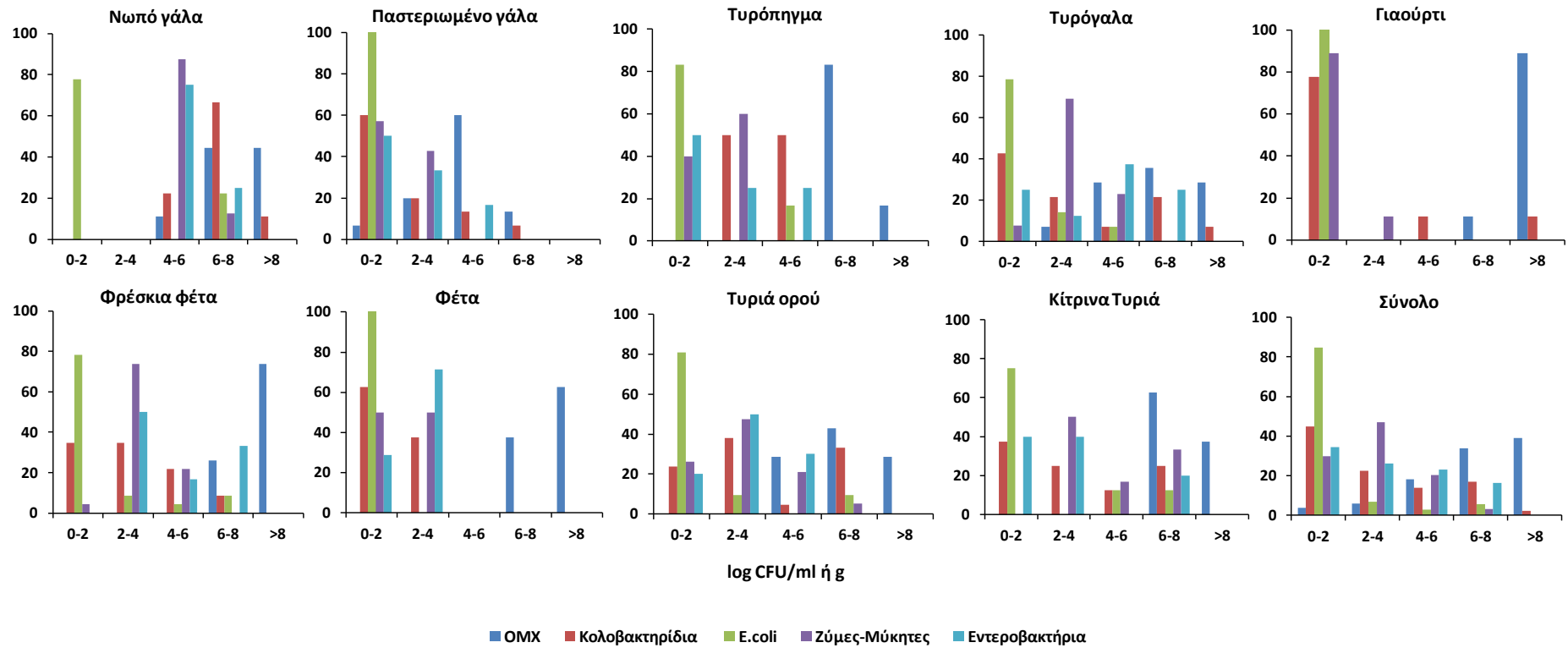
Τα στελέχη της *L. monocytogenes* εντοπίστηκαν σε επιφάνειες που βρίσκονταν σε επαφή με απόβλητα, στα πλακάκια του πατώματος του χώρου παραγωγής, σε μεταλλική επιφάνεια πίεσης των τυριών, καθώς και σε δείγμα ανθότυρου (Πιν 2.1). Η ύπαρξη του παθογόνου σε σημεία του χώρου παραγωγής, τα οποία δεν έρχονται σε άμεση επαφή με τα προϊόντα, έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Scoder et al., 2011). Αντίθετα, σε δείγματα με ιδιαίτερα βεβαρυσμένη χλωρίδα (υψηλοί πληθυσμοί κολοβακτηριδίων, εντεροβακτηρίων, ΟΜΧ) όπως αυτά του ανθότυρου και του καλουπιού ανθότυρου στην ίδια δειγματοληψία (T1), δεν ανιχνεύτηκε ο παθογόνος. Σε γενικές γραμμές, η *L. monocytogenes* δεν αναμένεται να υπερισχύσει έναντι του έντονου ανταγωνισμού από την ενδογενή ή την αλλοιογόνο χλωρίδα των τροφίμων, ιδιαίτερα όταν αυτή βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα (Mellefont et al., 2008).

Για την επιβεβαίωση της ταυτότητας των τεσσάρων στελεχών που ανιχνεύτηκαν κατά την διάρκεια της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν μοριακές μέθοδοι. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους D'Agostino et al. (2004), με θετικά και αρνητικά δείγματα και εξειδικευμένους εκκινητές για το

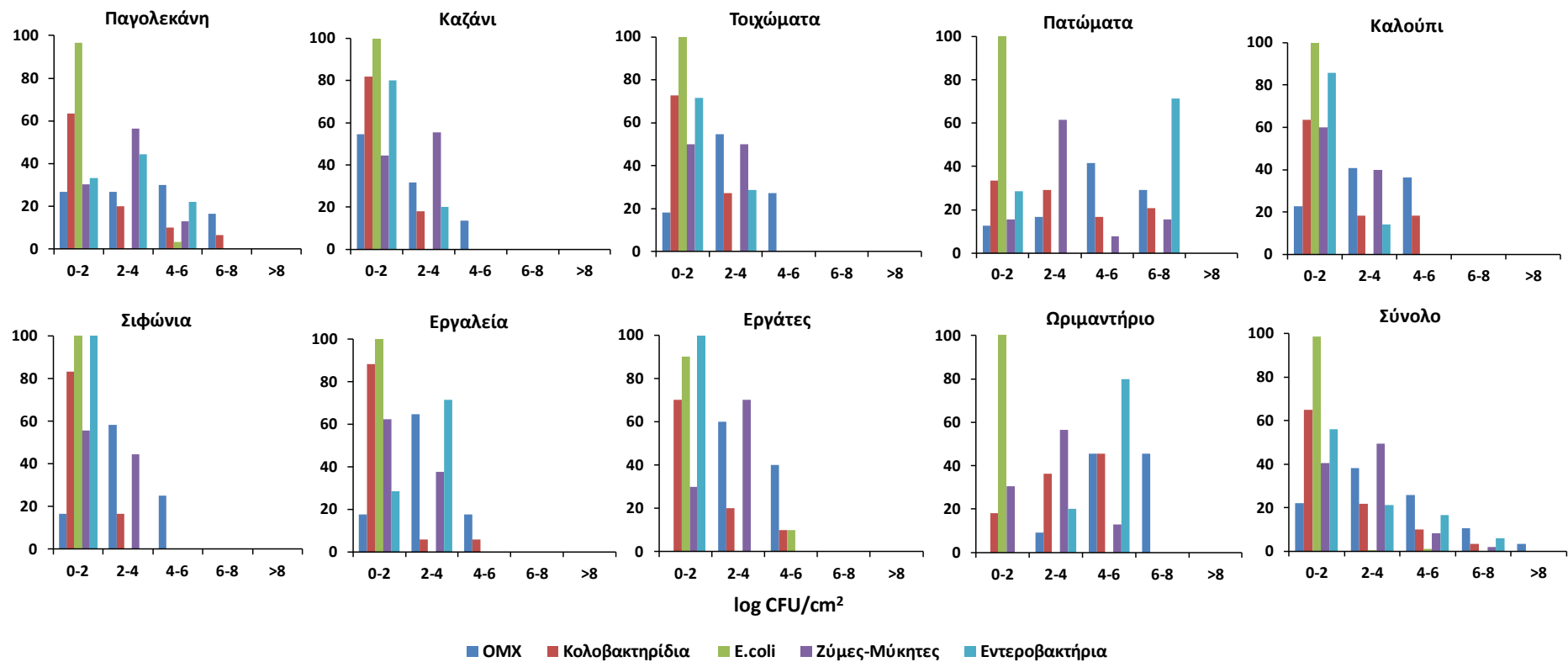
είδος *L. monocytogenes* στην οποία όλα τα στελέχη βρέθηκαν θετικά (Σχ. 2.5.α). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (PFGE) για τον συσχέτισμό των στελεχών μεταξύ τους. Η διαδικασία της PFGE πραγματοποιήθηκε παράλληλα με τα ένζυμα *AraI* και *AscI*. Από τα αποτελέσματα διακρίνεται η συγγένεια μεταξύ των στελεχών, τα οποία παρά τα διαφορετικά σημεία απομόνωσής τους εμφάνισαν κοινή συμπεριφορά κατά τις δύο ηλεκτροφορήσεις (διαφορετική ωστόσο στην κάθε μία, Σχ. 2.5.β). Η ομοιότητα των παλσότυπων (pulsotypes) μεταξύ των στελεχών ενός τυροκομείου δεν είναι δεδομένη, καθώς μπορούν να απομονωθούν στελέχη με 10 ή περισσότερους διαφορετικούς παλσότυπους από την ίδια επιχείρηση (Lomonaco et al., 2009, Fox et al., 2011). Αντίστροφα, μπορεί ο ίδιος παλσότυπος να ανιχνεύεται περιοδικά σε μία επιχείρηση για μεγάλα χρονικά διάστημα ή σε διαφορετικές επιχειρήσεις (Lomonaco et al., 2009, Fox et al., 2011). Σε κάθε περίπτωση η PFGE αποτελεί μια από τις καλύτερες μεθόδους συσχέτισμού των στελεχών, που έχουν απομονωθεί από τρόφιμα ή ασθενείς, μεταξύ τους καθώς και με τις ύποπτες πηγές (Kathariou et al., 2002, Gilbreth et al., 2005, Fox et al., 2011).

Ο επιπολασμός της *L. monocytogenes* στις επιφάνειες και το περιβάλλον των τυροκομείων βρέθηκε χαμηλότερος σε σχέση με τον αναμενόμενο (Chambel et al., 2007, Fox et al., 2009, Kousta et al., 2010). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην περιορισμένη επιφάνεια δειγματοληψίας (10*10 cm), η οποία επιλέχθηκε με βάση τις απαιτήσεις του προτύπου (EN ISO 18593, 2004). Μια διαδικασία που θα περιελάμβανε δειγματοληψία από ολόκληρες της επιφάνειες παραγωγής ή τα εργαλεία, ενδεχομένως να οδηγούσε σε διαφορετικά αποτελέσματα. Επιπλέον, η παρατεταμένη έκθεση του μικροοργανισμού σε συνθήκες λοίμωξης και σε πολλές περιπτώσεις ψύχους, μπορεί να προκαλέσει την μεταβολή της φυσιολογίας των κυττάρων του σε ζώντα αλλά μη καλλιεργήσιμα (VBNC), τα οποία δυσκολεύονται (ή αδυνατούν) να πολλαπλασιαστούν στα συνήθη επιλεκτικά εμπλουτιστικά υποστρώματα (Aertsen και Michiels, 2002). Η χρήση νέων μεθόδων μοριακής ανίχνευσης των παθογόνων, όπως αυτή της ποσοτικής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR) ή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR), μπορεί να οδηγούσε σε περισσότερο ρεαλιστικά ποσοστά επιπολασμού, ανάλογα με την ύπαρξη του παθογόνου στα προϊόντα και τις επιφάνειες (Fox et al., 2009, Alessandria et al., 2010).

Στις αναλύσεις για τον *S. aureus* βρέθηκαν 8 (5,1%) δείγματα με πληθυσμό άνω του ορίου αρίθμησης της μεθόδου από τα 155 που αναλύθηκαν. Σε ένα από τα δείγματα ο πληθυσμός του μικροοργανισμού ξεπέρασε τα 10^5 κύτταρα (5.6 log CFU/ml, Πιν 2.1), πληθυσμός που θεωρείται ότι απαιτείται για την παραγωγή αρκετής ποσότητας της εντεροτοξίνης που προκαλεί την ασθένεια (O'Brien et al., 2009). Το μεγαλύτερο ποσοστό (75%) δειγμάτων με μετρήσιμους πληθυσμούς του



Σχήμα 2.3. Ποσοστιαία (%) κατανομή των πληθυσμών των μικροοργανισμών επί του συνόλου των δειγμάτων προϊόντων που εξετάστηκαν. Στο σχήμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα για την ολική μεσόφιλη χλωρίδα (■, PCA), τα ολικά κολοβακτηρίδια (■, CCA), το E. coli (■, TBX), τις ζύμες και τους μύκητες (■, YGCA) και τα εντεροβακτήρια (■, VRBGA).



Σχήμα 2.4. Ποσοστιαία (%) κατανομή των πληθυσμών των μικροοργανισμών επί του συνόλου των δειγμάτων επιφανειών που εξετάστηκαν. Στο σχήμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα για την ολική μεσόφιλη χλωρίδα (■, PCA), τα ολικά κολοβακτηρίδια (■, CCA), το E. coli (■, TBX), τις ζύμες και τους μύκητες (■, YGCA) και τα εντεροβακτήρια (■, VRBGA).

παθογόνου αντιστοιχούσε σε δείγματα νωπού γάλακτος ή επιφανειών της παγολεκάνης των παραγωγών. Ανησυχητική ωστόσο ήταν η παρουσία του σε παστεριωμένο γάλα, πιθανώς ως αποτέλεσμα διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Με δεδομένο ότι ο *S. aureus* προέρχεται κυρίως από το δέρμα των γαλακτοπαραγωγικών ζώων (αγελάδες, αίγες κ.α.) και των ανθρώπων, θεωρείται αναμενόμενη η παρουσία του στο νωπό γάλα, με ιδιαίτερα υψηλό επιπολασμό (Gounadaki et al., 2008, Irlinger, 2008, Kousta et al., 2010, Jakobsen et al., 2011). Εντούτοις, λόγω της χαμηλής θερμοανθεκτικότητάς του, δύσκολα ξεπερνά το εμπόδιο της παστερίωσης, ενώ με την εφαρμογή των ορθών κανόνων υγιεινής σε συνδυασμό με την υψηλή ελάχιστη θερμοκρασία αύξησής του, καθώς και την περιορισμένη δυνατότητά του να ανταγωνίζεται την ενδογενή χλωρίδα του γάλακτος και των προϊόντων του, δεν αναμένεται να επιβιώσει σε τυριά ωρίμασης (O' Brien et al., 2009, Jakobsen et al., 2011).

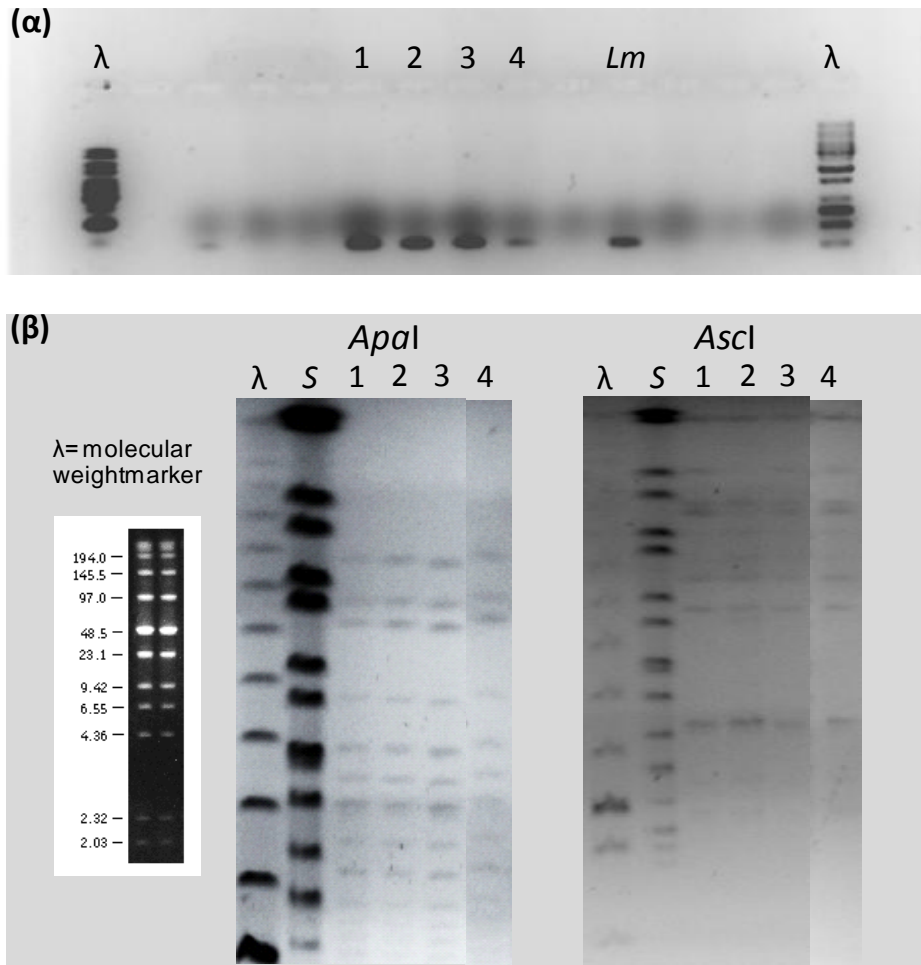
Η ολική μικροβιακή χλωρίδα των προϊόντων κυμάνθηκε από 10^7 CFU/ml στο νωπό γάλα σε 10^3 CFU/ml έπειτα από την παστερίωση, ενώ μετά την προσθήκη της εκκινητήριας καλλιέργειας αυξήθηκε σταδιακά μέχρι τους 9 log CFU/g (Σχ. 2.1). Ανάλογη διακύμανση κατά την πορεία της παραγωγικής διαδικασίας παρατηρήθηκε και στις επιφάνειες (Σχ. 2.2), με χαμηλότερους ωστόσο τελικούς πληθυσμούς (2 έως 5 log CFU/g). Στα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση (τυριά, γιαούρτι κ.α.) αναμένονται πληθυσμοί της τάξεως των 8-9 log CFU/g, κυρίως λόγω της προσθήκης οξυγαλακτικών βακτηρίων στα αρχικά στάδια της τεχνολογίας. Εντούτοις, οι πληθυσμοί 10^6 - 10^9 CFU/g που βρέθηκαν σε μαλακά τυριά έτοιμα προς διάθεση και κατανάλωση, όπως ο Ανθότυρος και η Μυζήθρα, σε συνδυασμό με την ανίχνευση παθογόνων (Πίν. 2.1, Σχ. 2.1 και 2.3), εγείρουν ανησυχία τόσο για τη διάρκεια ζωής των προϊόντων, όσο κυρίως για την επικινδυνότητά τους. Τα μαλακά τυριά ορού χαρακτηρίζονται από την ιδιαίτερα ευαίσθητη μικροβιολογική τους φύση επειδή κατά την διάρκεια της τεχνολογίας τους δεν υπόκεινται σε οξύνιση, αλάτιση ή κάποια άλλη διαδικασία, που βοηθάει στον έλεγχο των παθογόνων. Επιπλέον, η ισχυρή θέρμανση στην αρχή της παρασκευής τους δημιουργεί ένα στείρο προϊόν επιρρεπές στην οποιαδήποτε διασταυρούμενη επιμόλυνση, όπου ελλείψει ανταγωνισμού ο πληθυσμός του παθογόνου μπορεί να αυξηθεί σε υψηλά επίπεδα, αυξάνοντας παράλληλα και την επικινδυνότητα του τροφίμου. Δεν είναι τυχαίο ότι οι περισσότερες επιδημίες λιστερίωσης παγκοσμίως αφορούν φρέσκα μαλακά τυριά (Kousta et al., 2010).

Από την έρευνα προέκυψε ότι σημαντικό ποσοστό της ολικής χλωρίδας των επιφανειών και των προϊόντων αποτέλεσαν οι ζύμες και οι μύκητες (Σχ. 2.1-2.4). Στα τρόφιμα μετρήθηκαν μεταξύ των 2 και 5 λογαρίθμων, με εξαίρεση το παστεριωμένο γάλα και το γιαούρτι στα οποία μετρήθηκαν κάτω του ορίου αρίθμησης, με αντίστοιχα μεγαλύτερα ποσοστά κατανομής του πληθυσμού στους 0-2 log CFU/g ή ml (Σχ. 2.1 και 2.3). Στις επιφάνειες επεξεργασίας το μεγαλύτερο ποσοστό του

πληθυσμού των εξεταζόμενων δειγμάτων συγκεντρώθηκε στους 0-4 λογαρίθμους με εξαίρεση τους πάγκους εργασίας, όπου μετρήθηκε κοντά στους 5 λογαρίθμους, αντίστοιχο με αυτόν της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (Σχ. 2.2 και 2.4). Η ύπαρξή τους στις επιφάνειες και τα τρόφιμα είναι ένδειξη της μη αποτελεσματικής εφαρμογής των διαδικασιών καθαριότητας και απολύμανσης, καθώς και των προαπαιτούμενων προγραμμάτων των συστημάτων υγιεινής στις βιομηχανίες τροφίμων. Σε γενικές γραμμές η επικινδυνότητα ύπαρξης των ζυμών και των μυκήτων στα τρόφιμα είναι μικρή και περιορίζεται σε συγκεκριμένα στελέχη που έχουν την ικανότητα παραγωγής τοξινών. Ωστόσο η παρουσία τους δεν θα πρέπει να παραβλέπεται γιατί ενδέχεται να επηρεάσουν έμμεσα την ασφάλειά των προϊόντων καθώς, μέσω της μεταβολικής τους δραστηριότητας και της ανάπτυξης του pH που αυτή επιφέρει, ενδέχεται να αυξήσουν την επικινδυνότητα τροφίμων με αρχικές τιμές pH χαμηλότερες από το όριο ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών (φέτα, γιαούρτι), παρατείνοντας την επιβίωσή τους ή ακόμα και κατά περιπτώσεις, ευνοώντας την αύξησή τους (Belessi et al., 2008). Ωστόσο, κυρίως επειδή συμβάλουν σημαντικά στην ποιοτική υποβάθμιση των προϊόντων και αποτελούν ένδειξη για το γενικότερο επίπεδο υγιεινής των εγκαταστάσεων, συστήνεται η λήψη μέτρων για την εξάλειψή τους.

Σε όλα τα προϊόντα μετά την παστερίωση, τα κολοβακτηρίδια μετρήθηκαν σε τιμές μεγαλύτερες των 100 CFU/g, ενώ κυμάνθηκαν μεταξύ των 2 και 4 λογαρίθμων CFU/g (Σχ. 2.1. και 2.3.). Εξαίρεση αποτέλεσε το T3 στο οποίο το μεγαλύτερο ποσοστό (74%) βρέθηκε με τιμές <2 log CFU/ml-g (δεδομένα μη εμφανή). Στις επιφάνειες αντίθετα, ενδιαφέρον προκαλούν οι χαμηλοί πληθυσμοί των κολοβακτηριδίων που βρέθηκαν σε μαχαίρια, σιφώνια, καλούπια και εργαζόμενους (1-2 log CFU/cm²), σε αντίθεση με τους πάγκους και τα δάπεδα της τυροκόμησης και του ωριμαντηρίου (>2 log CFU/cm², Σχ. 2.2). Τα παραπάνω αποτελέσματα εφιστούν την προσοχή στη διαδικασία καθαρισμού και απολύμανσης των εγκαταστάσεων, μιας και η ύπαρξη κολοβακτηριδίων και εντεροβακτηρίων στα ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα, καθώς και στις επιφάνειες, είναι ένδειξη επιμόλυνσης (Salo et al., 2006, Christison et al., 2008).

Το *E. coli* χρησιμοποιείται σαν δείκτης υγιεινής των προϊόντων και των επιφανειών, για την ύπαρξη και άλλων βακτηρίων εντερικής προέλευσης, ενώ συνδέεται άμεσα με την γενικότερη υγιεινολογική κατάσταση της επιχείρησης, καθώς η εμφάνισή του αποδίδεται σε διασταυρούμενη επιμόλυνση (O' Brien et al., 2009). Στις επιφάνειες παραγωγής το *E. coli* εντοπίστηκε σε χαμηλούς πληθυσμούς (Σχ. 2.2). Στην παραγωγή της φέτας εμφανίστηκε στο αρχικό στάδιο της ωρίμασης με φθίνουσα ωστόσο πορεία, ενώ ανησυχητική κρίθηκε και η εμφάνισή του στη Μυζήθρα (Πιν. 2.1, Σχ. 2.1), τρόφιμο με φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που ευνοούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Συνολικά 30 (8,9%) δείγματα βρέθηκαν με πληθυσμό *E. coli* άνω του ορίου αρίθμησης από τα 337 που εξετάστηκαν, ενώ ο ανώτερος αυτών βρέθηκε σε νωπή φέτα πριν την ωρίμαση (7,6 log CFU/g),



Σχήμα 2.5. Συμπεριφορά κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, **α**) και την ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (PFGE, **β**) των απομονώσεων της *L. monocytogenes* από τις επιφάνειες και το προϊόν του T1 (Πιν. 2.1.). Για την PCR, τα στελέχη προετοιμάζονταν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους D'Agostino et al. (2004), με την χρήση των εκκινητών LIP1 και LIP2. Στην PFGE τα στελέχη που εμφανίζονται επεξεργάστηκαν με τα ένζυμα *ApaI* και *AscI* (Kagkli et al., 2009). Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης ήταν 6 V, με παλμούς που κυμαίνονταν από 4 μέχρι 40" για 18 ώρες. Οι αριθμοί στα αριστερά υποδεικνύουν τα κατά προσέγγιση μεγέθη DNA όπως έχουν προσδιοριστεί από τον δείκτη μοριακού βάρους (lambda DNA sizing ladder, Low range PFG, New England Biolab, Ipswich, MA, ΗΠΑ). Στήλες PCR: **λ**: δείκτης μοριακού βάρους (1 & 15), αρνητικό πρότυπο (ύδωρ, 2), **1**: Δάπεδο (πλακάκια υγιεινής), **2**: Μεταλλική επιφάνεια πιεστηρίου, **3**: Απόβλητα ξεπλύματος, **4**: Ανθότυρο, **Lm**: Πρότυπο στέλεχος *Listeria monocytogenes* Scott A. Στήλες PFGE: **λ**: δείκτης μοριακού βάρους, **S**: στέλεχος *Salmonella* (*XbaI*), **1**: Δάπεδο (πλακάκια υγιεινής), **2**: Μεταλλική επιφάνεια πιεστηρίου, **3**: Απόβλητα ξεπλύματος, **4**: Ανθότυρο

με την ποδιά εργαζομένης στην ίδια δειγματοληψία να έχει 4,5 log CFU/cm² *E. coli*. Σύμφωνα με το Σχ. 2.1 η παστερίωση επιτυγχάνει να θανατώσει τον αρχικό πληθυσμό *E. coli* του νωπού γάλακτος. Η μετέπειτα εμφάνισή του στο τυρόγαλα και το φρέσκο τυρί μπορεί να αποδοθεί σε διασταυρούμενη επιμόλυνση από τις επιφάνειες επεξεργασίας, το προσωπικό ή μολυσμένα προϊόντα (Christison et al., 2008).

Στην Ελληνική πραγματικότητα, ο χειρισμός των τροφίμων κατά την διαδρομή από το σημείο παραγωγής μέχρι και την κατανάλωσή τους, ιδιαίτερα οι θερμοκρασιακές μεταβολές που υφίστανται, έχουν σημαντική επίδραση στην συμπεριφορά τόσο των παθογόνων, όσο και των αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Manios et al., 2009, Koutsoumanis et al., 2010). Συγκεκριμένα, τυχόν προβλήματα στην ψυκτική αλυσίδα κατά την μεταφορά των προϊόντων από την βιομηχανία στην αγορά, αστοχίες που μπορεί να πραγματοποιηθούν στα ψυγεία των καταστημάτων πώλησης και η ελλιπής γνώση των καταναλωτών για την ανάγκη τήρησης των προτεινόμενων θερμοκρασιών ψύξης (συνήθως 2-4°C), καθώς και των ορθών κανόνων χειρισμού των τροφίμων, μπορεί να αυξήσουν σημαντικά τους πληθυσμούς των παθογόνων στα τρόφιμα και κατά συνέπεια την επικινδυνότητά τους. Η συνεισφορά των καταναλωτών στην κακή μεταχείριση των τροφίμων είναι σημαντική, καθώς έρευνες έχουν δείξει ότι η θερμοκρασία του ψυγείου στο 64 % των καταναλωτών ξεπερνούσε τους 5°C, ενώ σαν μέση θερμοκρασία μετρήθηκαν οι 6,4°C (Koutsoumanis et al., 2010). Εν κατακλείδι, οι συνθήκες που αντιμετωπίζει ένα τρόφιμο από την έξοδό του από την βιομηχανία μέχρι και την κατανάλωσή του είναι σε ελάχιστες περιπτώσεις διαχειρίσιμες. Επομένως, οι επιχειρήσεις που εμπλέκονται στην παραγωγή τροφίμων, επιβάλλεται να λαμβάνουν σοβαρά την ευθύνη παραγωγής προϊόντων με ελάχιστο ή μηδενικό επιβλαβές μικροβιακό φορτίο.

2.4 Συμπεράσματα

Η βελτίωση της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων και ιδιαίτερα των έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων αποτελεί έναν συνεχή στόχο, ο οποίος προϋποθέτει την υπεύθυνη συμπεριφορά και την συνεργασία μεταξύ των παραγωγών τροφίμων, των ελεγκτικών αρχών, των εμπλεκόμενων με την διανομή και διάθεση των προϊόντων και των καταναλωτών. Τα πρότυπα και οι κανονισμοί που υφίστανται τόσο σε παγκόσμιο όσο και σε εθνικό επίπεδο βοηθάνε τους παραγωγούς, σε περίπτωση που εφαρμόζονται σωστά, να μειώσουν στο ελάχιστο τις αστοχίες και τις απώλειες τους και να παράγουν τρόφιμα χαμηλής επικινδυνότητας και υψηλής διατροφικής αξίας. Ο χαμηλός επιπολασμός των παθογόνων που ανιχνεύτηκαν ή καταμετρήθηκαν στην έρευνα συνδέεται μεταξύ άλλων και με την φύση των περισσότερων γαλακτοκομικών προϊόντων, τα οποία θεωρούνται σχετικά σταθερά και ασφαλή τρόφιμα. Εντούτοις, η ύπαρξη παθογόνων σε προϊόντα αυξημένης επικινδυνότητας και στις επιφάνειες φύλαξης ή επεξεργασίας τους, τονίζει την ανάγκη λήψης πρόσθετων μέτρων με σκοπό την εξάλειψή τους, καθώς μελλοντικές λανθασμένες ενέργειες στην συντήρηση και διάθεση των προϊόντων μπορεί να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών. Οι υψηλοί πληθυσμοί, που μετρήθηκαν σε μικροοργανισμούς δείκτες της υγιεινής και της καθαριότητας των τυροκομείων φανερώνουν την ανάγκη υιοθέτησης αυστηρότερων κανόνων υγιεινής, αρτιότερης εκπαίδευσης του προσωπικού τους και τακτικού ελέγχου των εγκαταστάσεών τους. Επιπλέον, η βεβαρυμμένη μικροβιολογικά κατάσταση του νωπού γάλακτος φανερώνει την ανάγκη καλύτερης συνεργασίας των παραγωγών με τους προμηθευτές τους, με την θέσπιση ορίων ποιότητας και τον συνεχή έλεγχο των εγκαταστάσεων και των πρακτικών τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΪΜΕΝΙΩΝ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ *Listeria monocytogenes* ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ ΑΝΟΞΕΙΔΩΤΟΥ ΧΑΛΥΒΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ ΣΕ ΑΠΟΛΥΜΑΝΤΕΣ

Η εμφάνιση της *L. monocytogenes* στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων καθώς και η εμφάνισή του στα παραγόμενα προϊόντα, ιδιαίτερα σε όσα έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία, οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη προσκολλημένων στις επιφάνειες κυττάρων του μικροοργανισμού στην μορφή των βιοϋμενίων. Η φυσιολογία των κυττάρων του παθογόνου επηρεάζει, μεταξύ άλλων, τον σχηματισμό και την ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων. Ωστόσο ταυτόχρονα επηρεάζεται και από αυτήν, καθώς με βάση τη βιβλιογραφία, προσκολλημένα κύτταρα του μικροοργανισμού έχουν διαφορετική συμπεριφορά έναντι των καταπονήσεων σε σχέση με τα αντίστοιχα πλαγκτονικά. Στην προσπάθεια να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις της φυσιολογίας των κυττάρων της *L. monocytogenes* με τον σχηματισμό και την ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων έναντι της απολύμανσης, σχεδιάστηκαν και πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα.

3.1. Σχηματισμός βιοϋμενίων της *Listeria monocytogenes* σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα σε δύο θερμοκρασίες παρουσία γαλακτοκομικών προϊόντων και προσδιορισμός της κινητικής των αποκολλημένων κυττάρων σε γάλα και κρέμα.

Applied and Environmental Microbiology 75 (22), 7182-7188

3.1.1. Εισαγωγή

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, έχει την ικανότητα να επιβιώνει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων, από όπου δύναται να επιμολύνει τα τρόφιμα κατά την επεξεργασία τους (Wilks et al., 2006, Shi και Zhu, 2009.). Αποτελεί σταθερό σημείο ενδιαφέροντος της βιομηχανίας τροφίμων, καθώς προκαλεί λιστερίωση μια σοβαρή νόσο, με υψηλό ποσοστό νοσηλείας και θνητότητας (Kathariou, 2002). Η λιστερίωση, σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νόσων (ECDC), υπήρξε η πέμπτη πιο κοινή ζωνόσος στην Ευρώπη κατά τη διάρκεια του 2006 (EFSA-ECDC, 2007), ενώ της έχει αποδοθεί το 28% των θανάτων προερχόμενων από τροφιμογενείς λοιμώξεις στις ΗΠΑ (Mead et al., 1999).

Ορισμένα από τα στελέχη της *L. monocytogenes* έχουν την ικανότητα να παραμένουν στο δυσμενές περιβάλλον της επεξεργασίας τροφίμων για πολλά έτη, ενώ σημαντικός παράγοντας της

ικανότητας αυτής θεωρείται η προσκόλλησή τους στις επιφάνειες (Lundén et al., 2000, Mørseth και Langsrud, 2004). Μέσα από αναφορές φαίνεται ότι η *L. monocytogenes* προσκολλάται σε διάφορα υλικά που χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων και δημιουργεί βιοϋμένια (Beresford et al., 2001, Silva et al., 2008, Somers και Wong, 2004). Τα βιοϋμένια, τα οποία είναι προσκολλημένες μικροβιακές κοινότητες συνήθως με την κάλυψη ενός εξωπολυσακχαρήτη, εφόσον σχηματιστούν, υπόκεινται σε φαινοτυπικές μεταβολές, μέσω διακυτταρικής επικοινωνίας, γεγονός που τα καθιστά πιο ανθεκτικά έναντι αντιμικροβιακών παραγόντων, απολυμαντικών και της καταπόνησης από το περιβάλλον (Frank και Koffi, 1990, Ganesh Kumar και Anand, 1998, Pan et al., 2006, Garrett et al., 2008). Μία αυστηρή διαδικασία απολύμανσης του εξοπλισμού θα ελαχιστοποιούσε τον κίνδυνο ύπαρξης κυττάρων στις επιφάνειες. Εντούτοις, ο κίνδυνος εξακολουθεί να υπάρχει σε σημεία επεξεργασίας των τροφίμων, που δεν είναι εύκολα προσβάσιμα στον καθαρισμό και την απολύμανση (όπως κυρτές και κεκλιμένες επιφάνειες, ακμές, κόγχες, εγκοπές, κ.α., Taormina και Dorsa, 2007, Skandamis et al., 2009).

Στις καταγεγραμμένες επιδημίες λιστερίωσης έχουν εμπλακεί μεταξύ άλλων και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (De Buyser et al., 2001, Lundén et al., 2004). Στις περισσότερες από τις *in vitro* μελέτες της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* στα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν χρησιμοποιηθεί στελέχη του παθογόνου σε αιώρηση σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (Panagou και Nychas, 2008). Κατά την επεξεργασία, αποθήκευση και διάθεσή του, ένα προϊόν ενδέχεται να επιμολυνθεί από πλαγκτονικά και από προσκολλημένα σε επιφάνειες εργαλεία κ.α. κύτταρα του παθογόνου. Οι συνθήκες επώασης επηρεάζουν την μετέπειτα ανάπτυξη ή επιβίωση της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα (Buchanan και Klawitter, 1991, Dufrenne et al., 1997, Geornaras et al., 2006a, Geornaras et al., 2006b), όπως και ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές από άποψη φυσιολογίας μεταξύ των πλαγκτονικών και προσκολλημένων κυττάρων (Frank και Koffi, 1990, Kuchma και O'Toole, 2000, Tremoulet et al., 2002). Εντούτοις, οι πληροφορίες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για την συμπεριφορά της *L. monocytogenes* στα γαλακτοκομικά προϊόντα μετά από ενοφθαλμισμό αποκολλημένων κυττάρων είναι περιορισμένες.

Στόχος της μελέτης ήταν η αξιολόγηση του σχηματισμού βιοϋμενίων της *L. monocytogenes* σε ανοξείδωτο χάλυβα και η επίδραση των προηγούμενων συνθηκών επώασής του (προσκολλημένα σε επιφάνειες ανοξ. χάλυβα ή πλαγκτονικά κύτταρα σε γαλακτοκομικά προϊόντα) στην μετέπειτα κινητική ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε γάλα στους 5°C για 20 ημέρες. Η προετοιμασία των δύο εμβολίων πραγματοποιήθηκε σε δύο προϊόντα (γάλα και κρέμα εμπορίου) και δύο θερμοκρασίες (5 και 20°C). Επιπλέον, μελετήθηκε η εκούσια (αβίαστη) αποκόλληση κυττάρων, μετά από προσκόλλησή τους στο δυσμενές περιβάλλον του γιαουρτιού (5°C για 7 ημέρες), και η αύξησή τους σε γάλα και κρέμα εμπορίου στους 5°C για 20 ημέρες.

3.1.2 Υλικά και μέθοδοι

3.1.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα εκτεθειμένες σε διαφορετικά είδη γαλακτοκομικών προϊόντων (γάλα, κρέμα βανίλιας και γιαούρτι) χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό να προσομοιάσουν σημεία στις εγκαταστάσεις παραγωγής οι οποίες δεν μπορούν εύκολα να καθαριστούν και να απολυμανθούν και για τον λόγο αυτό λειτουργούν σαν καταφύγια των μικροοργανισμών. Η βακτηριακή προσκόλληση αξιολογήθηκε στους 5 και τους 20°C, ώστε να προσομοιάσει περιβαλλοντικές συνθήκες που συναντούνται κατά την παραγωγή και αποθήκευση γαλακτοκομικών προϊόντων. Για την διερεύνηση της παραπάνω υπόθεσης πραγματοποιήθηκαν τρεις κύριες μελέτες. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε προσκόλληση της *L. monocytogenes* σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα (ΑΧ) βυθισμένες σε γάλα, κρέμα και γιαούρτι για 7 ημέρες στους 5 και 20°C. Η επιλογή των 7 ημερών έκθεσης στα τρόφιμα έγινε για να υπάρχει επαρκής χρόνος ώστε να λάβουν χώρα αρκετοί κύκλοι αποκόλλησης-προσκόλλησης-ανάπτυξης του βιοϋμενίου (Todhanakasem και Young, 2008). Το πείραμα αυτό στόχευε στον προσδιορισμό της επίδρασης του περιβάλλοντος (π.χ. υπόστρωμα ανάπτυξης και θερμοκρασία) στην ικανότητα της *L. monocytogenes* να προσκολλάται και να σχηματίζει βιοϋμένια σε επιφάνειες ΑΧ με υπολείμματα τροφίμων. Σε επόμενο στάδιο, δύο είδη κυττάρων της *L. monocytogenes*, τα αποκολλημένα από επιφάνειες ή σε αιώρηση στο τρόφιμο (πλαγκτονικά) χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό γάλακτος με σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης του προηγούμενου περιβάλλοντος στην μετέπειτα κινητική ανάπτυξης του παθογόνου στους 5°C. Το πείραμα στόχευσε απευθείας στην συγκριτική ανάπτυξη δύο ειδών κυττάρων που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά σενάρια διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που αυξάνονταν σε αιώρηση προσομοίασαν επιμόλυνση από γάλα, υγρά ενδιάμεσα προϊόντα και υπολείμματα ή απόβλητα, ενώ τα προσκολλημένα κύτταρα προσομοίαζαν επιμόλυνση από επιφάνειες με υπολείμματα τροφίμων. Τέλος, εξετάστηκε η ικανότητα των κυττάρων της *L. monocytogenes* να αποκολλούνται εκουσίως από επιφάνειες ΑΧ, με υπολείμματα γιαουρτιού, και να διασκορπίζονται σε μη ενοφθαλμισμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως είναι το γάλα και η κρέμα βανίλια, στους 5°C. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τουλάχιστον 4 επαναλήψεις (n=4).

3.1.2.2. Βακτηριακό στέλεχος και προετοιμασία του εμβολίου

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes* Scott A (ορότυπος 4b, επιδημικό στέλεχος, απομονωμένο από νοσούντα). Η ικανότητα του στελέχους να προσκολλείται σε επιφάνειες έχει καταταχτεί στην μέση μιας λίστας με πολυάριθμες απομονώσεις

από τρόφιμα και κλινικές περιπτώσεις (Djordjevic et al., 2003, Tresse et al., 2007). Το στέλεχος επιλέχθηκε λόγω της κλινικής του προέλευσης και του ισχυρού επιδημιολογικού συσχετισμού του ορότυπου 4b με την λιστερίωση στους ανθρώπους (Kathariou, 2002, Lianou et al., 2006). Επιπλέον, η μονοκαλλιέργεια επιλέχθηκε έτσι ώστε τα ευρήματα στην συγκριτική ανάπτυξη των πλαγκτονικών και βιοϋμενικών κυττάρων και την αποκόλληση των τελευταίων να μην επηρεάζονται από την κυριαρχία διαφορετικών στελεχών ανά εξεταζόμενη περίπτωση με την χρήση πολυκαλλιέργειας. Το στέλεχος παρέμεινε υπό κατάψυξη (-22°C) σε Tryptic Soy Broth (Biolife Italiana Srl, Μιλάνο, Ιταλία) με προσθήκη 0,6% Yeast extract (LABM) (TSBYE) και 20% γλυκερόλης. Το στέλεχος ενεργοποιήθηκε, με την μεταφορά 0.1 ml της κατεψυγμένης καλλιέργειας σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος TSBYE και επώαση των τελευταίων στους 30°C για 24 ώρες. Η διαδικασία επαναλήφθηκε με την εκ νέου μεταφορά 0.1 ml από την καλλιέργεια μιας ημέρας σε 10 ml TSBYE και εκ νέου επώαση στους 30°C για 18 ώρες, στην διάρκεια των οποίων, όπως είχε υπολογιστεί από προκαταρκτικά πειράματα, ο μικροοργανισμός βρίσκεται στην στατική φάση. Ακολούθησε η διαδικασία της έκπλυσης των κυττάρων αρχικά με φυγοκέντρηση της καλλιέργειας (3600 x g for 15 min at 4°C; Heraeus Instruments Megafuge 1.0 R, Buckinghamshire, Αγγλία), απόρριψη του TSBYE και διπλή επαναιώρηση τους σε 10 ml αλατούχου διαλύματος (maximum recovery diluent, MRD; Biolife Italiana Srl, Μιλάνο, Ιταλία) με ενδιάμεση φυγοκέντρηση ώστε η τελική συγκέντρωση των κυττάρων να είναι 10⁸⁻⁹ CFU/ml.

3.1.2.3. Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων

Σαν υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν πλήρες παστεριωμένο αγελαδινό γάλα (υπερυψηλής παστερίωσης, HTST), παραδοσιακή κρέμα βανίλιας (εμπορική συσκευασία των 170 γ) και γιαούρτι (εμπορική συσκευασία των 200 γ) αγορασμένα από υπεραγορά και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο υπό ψύξη (4°C). Η σύσταση του γάλακτος ήταν 88% νερό, 3.5% λίπος, 3.2% πρωτεΐνη και 4.6% υδατάνθρακες, με τιμή pH από 6.6 μέχρι 6.7. Η κρέμα βανίλιας είναι ένα παραδοσιακό γλυκό γάλακτος, το οποίο είναι δημοφιλές στις χώρες της Μεσογείου (Panagou και Nychas, 2008). Παρασκευάζεται από γάλα αγελάδας, ζάχαρη, τροποποιημένο άμυλο σάγου, αλεύρι και καλαμποκάλευρο, κρόκο αυγού και βανιλίνη (Panagou και Nychas, 2008). Για την διασφάλιση της μικροβιολογικής της ασφάλειας η κρέμα υποβάλλεται σε θερμική επεξεργασία (82°C για 30 λεπτά) πριν την συσκευασία της. Σύμφωνα με τον παραγωγό η σύσταση του τελικού προϊόντος είναι 4.6% λίπος, 2.9% πρωτεΐνη, 17.8% υδατάνθρακες και η τιμή pH κυμαίνεται από 6.3 μέχρι 6.7. Το γιαούρτι κατασκευάστηκε από γάλα αγελάδας και περιείχε 4% λίπος, 4.5% πρωτεΐνη και 6.5% υδατάνθρακες, σύμφωνα με τον παραγωγό και η τιμή pH ήταν από 4 έως 4.4.

3.1.2.4. Προετοιμασία κουπονιών

Για τον σχηματισμό των βιοϋμενίων της *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκαν στείρες επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα, διαστάσεων ($\mu\text{π}\text{*}\text{υ}$) $2\text{*}5\text{*}0.1$ cm, αγορασμένες από τοπική επιχείρηση (type AISI-304, No. 2b, Χαλυβουργική Α.Ε., Αθήνα, Ελλάδα), έπειτα από ειδική παραγγελία στα πλαίσια του πειράματος. Το υλικό επιλέχθηκε λόγω της εκτεταμένης χρήσης του στον εξοπλισμό της βιομηχανίας τροφίμων (Boulangue-Petermann, 1996). Οι επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα μικρών διαστάσεων στην μεταλλουργία ονομάζονται κουπόνια (coupon: a sample of metal or metalwork submitted to a customer or testing agency for approval, Dictionary.com) και έτσι θα καλούνται στην παρούσα μελέτη. Μετά την αγορά τους τα κουπόνια εμβαπτίστηκαν σε ακετόνη μέχρι την πλήρη απομάκρυνση οποιουδήποτε λιπαντικού ή άλλου υλικού που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή τους. Εν συνεχεία φυλάσσονταν σε διάλυμα αλκοόλης (100%). Πριν την χρήση τους στα πειράματα τα κουπόνια καθαρίζονταν προσεκτικά (για την αποφυγή τριβών και χαραγών στον χάλυβα) με διάλυμα εμπορικού απολυμαντικού, ξεπλένονταν με αποσταγμένο ύδωρ, στέγνωσαν στον αέρα και συσκευάζονταν το καθένα ξεχωριστά σε φύλλο αλουμινίου για να μεταφερθούν σε κλίβανο, όπου και αποστειρώνονταν για 15 λεπτά στους 121°C .

3.1.2.5. Ενοφθαλμισμός γαλακτοκομικών προϊόντων και πειράματα προσκόλλησης

Πριν τον ενοφθαλμισμό πραγματοποιούνταν μεταφορά ποσότητας (40 ml) φρέσκου παστεριωμένου γάλακτος ασηπτικά σε στείρους πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου χωρητικότητας (50 ml). Ο ενοφθαλμισμός της κρέμας και του γιαουρτιού γινόταν στις εμπορικές τους συσκευασίες (170 γ για την κρέμα βανίλιας και 200 γ για το γιαούρτι). Συγκεκριμένα, ποσότητα 0,5ml της κατάλληλης αραιώσης κυττάρων της *L. monocytogenes* προστέθηκε σε κάθε πλαστικό σωλήνα ή συσκευασία θρεπτικού υποστρώματος έτσι ώστε ο αρχικός πληθυσμός του παθογόνου σε κάθε συσκευασία να είναι περί τα 10^7 CFU/γ ή /ml, όπως προσδιορίστηκε από προκαταρκτικά πειράματα. Για την εξασφάλιση της ομοιόμορφης διασποράς του εμβολίου, τα δείγματα γάλακτος αναμίχθηκαν με vortex για 30", ενώ τα δείγματα κρέμας και γιαουρτιού ανακατεύτηκαν επιμελώς με μία αποστειρωμένη σπάτουλα. Μετά τον ενοφθαλμισμό, οι μεταλλικές επιφάνειες τοποθετήθηκαν μία στο κέντρο του κάθε σωλήνα ή συσκευασίας, σε κάθετη θέση, ώστε ολόκληρη η επιφάνεια να είναι εκτεθειμένη στην καλλιέργεια και το θρεπτικό μέσο, κι επώαστηκαν σε υψηλής ακρίβειας ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) επωαστικούς θαλάμους (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Ιαπωνία) για 7 ημέρες στους 5°C ή τους 20°C . Μη ενοφθαλμισμένα δείγματα ελέγχου συντηρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες κι εξετάστηκαν περιοδικά για την απουσία της *L. monocytogenes* με το πρωτόκολλο εμπλουτισμού του ISO 11290 (Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης, ISO 11290-1:1998/FDAM 1:2004).

3.1.2.6. Αποκόλληση των προσκολλημένων κυττάρων της *L. monocytogenes* από κουπόνια AX και προσδιορισμός του πληθυσμού των βιοϋμενίων ή των πλαγκτονικών κυττάρων

Η αποκόλληση των προσκολλημένων κυττάρων από τα κουπόνια AX πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο μηχανικής απόξεσης με γυάλινα σφαιρίδια (bead vortexing method, Giaouris et al., 2005), η οποία έχει καθιερωθεί σαν η πλέον κατάλληλη μέθοδος για την απομάκρυνση των προσκολλημένων βακτηρίων (Lindsay και von Holy, 1997), χωρίς ωστόσο να μπορεί να διασφαλιστεί 100% απόξεση (Chorianopoulos et al., 2008). Συνοπτικά, μετά την πάροδο των 7 ημερών επώασης, κάθε κουπόνι AX απομακρύνονταν με προσοχή από τα δείγματα με μία αποστειρωμένη λαβίδα, εκπλένονταν επιμελώς με 25 ml MRD, για απομάκρυνση των χαλαρά προσδεμένων κυττάρων και των υπολειμμάτων τροφίμου, και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένους σωλήνες φυγοκέντρου των 50 ml, οι οποίοι περιείχαν με 40 ml MRD και από 12 γυάλινα σφαιρίδια (διαμέτρου 5 mm), ώστε να ακολουθήσει αποκόλληση των κυττάρων με ανάδευση σε vortex στην μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά. Τα αποκολλημένα κύτταρα, σε αιώρηση πλέον στο διάλυμα MRD, χρησιμοποιούνταν είτε ως εμβόλιο στα επόμενα πειράματα ή για την καταμέτρηση των βιοϋμενικών πληθυσμών με επιφανειακή επίστρωση ποσότητας 0.1 ml από την κατάλληλη δεκαδική αραιώση σε διπλά τρυβλία TSAYE (OMX, Biolife, 72h, 30°C) και PALCAM (Biolife, 48h, 37°C). Ο πληθυσμός των πλαγκτονικών κυττάρων της *L. monocytogenes* και της OMX στα γαλακτοκομικά προϊόντα από τα οποία αφαιρέθηκαν τα κουπόνια AX προσδιορίστηκε με ομογενοποίηση ποσότητας (1 ml από το γάλα και 25 γ από την κρέμα ή το γιαούρτι) με κατάλληλη ποσότητα (1:10 αραιώση) MRD. Στη συνέχεια, ποσότητα 0.1 ml από την κατάλληλη δεκαδική αραιώση μεταφέρθηκε επιφανειακά σε διπλά τρυβλία, όπως αναφέρεται παραπάνω. Επιπλέον, τυπικές αποικίες της *L. monocytogenes* από τα υποστρώματα PALCAM και TSAYE εξετάζονταν με βιοχημικές αναλύσεις σύμφωνα με το πρότυπο ISO 11290 (Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης, ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004). Οι τιμές pH και a_w των υποστρωμάτων μετρήθηκαν στο τέλος κάθε μικροβιολογικής ανάλυσης, με ψηφιακό pHμετρο (WTW, pH 526, Γερμανία), και ενεργόμετρο (Rotronic, HYGROLAB), αντίστοιχα.

3.1.2.7. Αξιολόγηση της κινητικής ανάπτυξης της *L. monocytogenes* σε γάλα ενοφθαλμισμένο με διαφορετικά είδη κυττάρων

Γάλα και κρέμα ενοφθαλμισμένα στους 5°C και 20°C για 7 ημέρες αποτέλεσαν τις περιβαλλοντικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την δημιουργία και την παραλαβή προσκολλημένων και πλαγκτονικών κυττάρων *L. monocytogenes*, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.1.2.6. Ποσότητα (1 ml) της κατάλληλης αραιώσης κάθε ενός από τα βακτηριακά αιωρήματα (αποκολλημένα ή πλαγκτονικά) χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό φρέσκου

παστεριωμένου γάλακτος (100 ml), όπως περιγράφηκε προηγουμένως, έτσι ώστε κάθε δείγμα να έχει αρχικό πληθυσμό κυττάρων περί τα 10^2 CFU/ml. Όλα ενοφθαλμισμένα δείγματα γάλακτος επώαστηκαν στους 5°C για διάστημα 20 ημερών, ενώ η κινητική της *L. monocytogenes* εξετάζονταν κάθε 24 ώρες σύμφωνα με τις διαδικασίες που έχουν περιγραφεί.

3.1.2.8. Εκούσια αποκόλληση των κυττάρων της *L. monocytogenes* από κουπόνια AX και αύξησή τους σε γαλακτοκομικά προϊόντα

Κουπόνια AX που έφεραν τα προσκολλημένα κύτταρα της *L. monocytogenes* παρέμειναν για 7 ημέρες στους 5°C (Κεφ. 3.1.2.5) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε φρέσκο γάλα και κρέμα. Αναλυτικά, με το πέρας της παραμονής, τα κουπόνια απομακρύνονταν ασηπτικά από το γιαούρτι, εκπλένονταν πλήρως με 25 ml MRD και τέλος τοποθετούνταν είτε σε κρέμα (170 γ στην εμπορική της συσκευασία) ή σε φρέσκο παστεριωμένο γάλα (50 ml σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου). Όλα τα ενοφθαλμισμένα δείγματα γάλακτος και κρέμας επώαστηκαν στους 5°C για διάστημα 20 ημερών, ενώ η κινητική της *L. monocytogenes* στα δύο προϊόντα εξετάζονταν κάθε 48 ώρες σύμφωνα με τις διαδικασίες που έχουν περιγραφεί. Επιπλέον προσδιορίστηκε (βλ. 3.1.2.6) ο πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων στα κουπόνια, πριν την μεταφορά τους.

3.1.2.9. Μικροσκοπική παρατήρηση των προσκολλημένων κυττάρων στα κουπόνια AX

Τα προσκολλημένα σε επιφάνειες AX κύτταρα της *L. monocytogenes* εξετάστηκαν και με την βοήθεια μικροσκοπίας φθορισμού (N-400F, Optika μικροσκόπια, Ιταλία), σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε από τους Pan et al. (2006). Συνοπτικά, κουπόνια AX που έφεραν κύτταρα του παθογόνου από τις διαφορετικές εξεταζόμενες περιπτώσεις απομακρύνονταν ασηπτικά από τα προϊόντα, εκπλένονταν πλήρως με 25 ml MRD και μεταφέρονταν σε ένα μικρό τρυβλίο petri (διάμετρος 5 cm). Τα κουπόνια βάζονταν με διάλυμα πορτοκαλί της ακριδίνης 0.01% (Sigma-Aldrich Ltd., Ελλάδα) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια εκπλένονταν τρεις φορές με διάλυμα Ringer για την απομάκρυνση της περίσσειας της βαφής. Οι εικόνες των προσκολλημένων κυττάρων ελήφθησαν με ψηφιακή κάμερα (Olympus, E-330, Ελλάδα) κι επεξεργάστηκαν με το λογισμικό ανάλυσης εικόνας Image-Pro Plus (version 4.5; Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

3.1.2.10. Προσαρμογή δεδομένων και στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα από τις μετρήσεις των αποικιών (CFU ανά γραμμάριο) αποκολλημένων και σε αιώρηση κυττάρων της *L. monocytogenes*, όλων των επαναλήψεων ($n = 4$) κάθε πειραματικής συνθήκης μετασχηματίστηκαν σε δεκαδικούς λογαρίθμους (\log_{10}). Οι δεκαδικοί λογάριθμοι στη

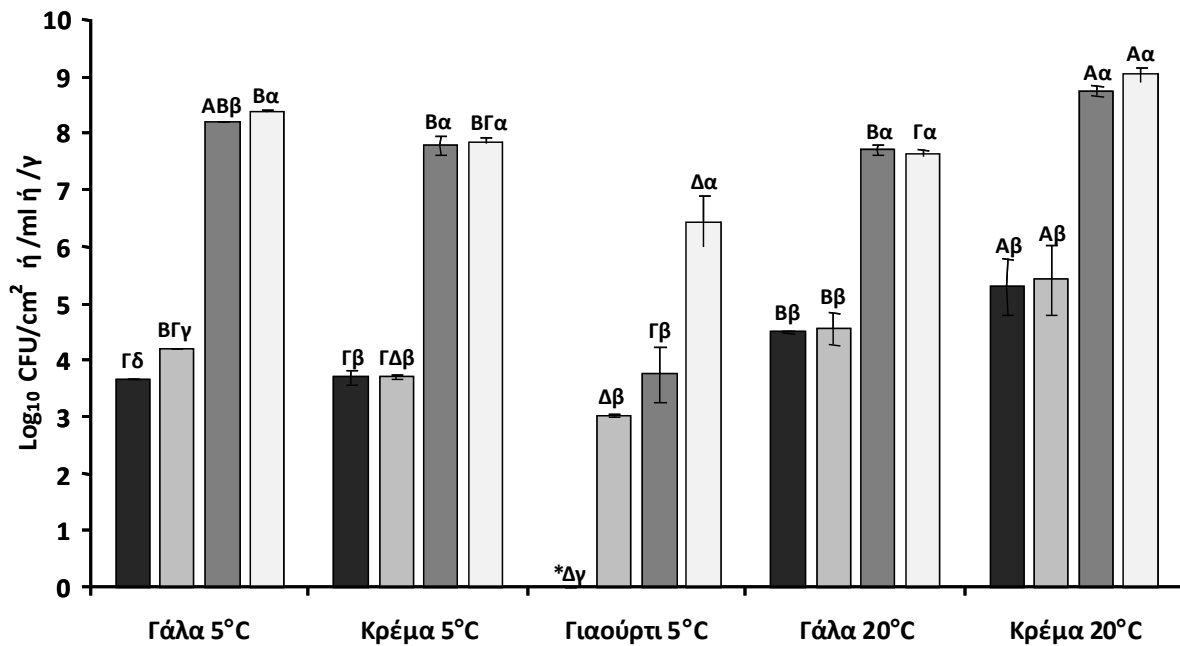
συνέχεια προσαρμόστηκαν στο μοντέλο Baranyi με την βοήθεια του προγράμματος DMFit ver 2.1 (διαθέσιμο στο <http://www.ifr.ac.uk/Safety/DMfit/default.html>), με σκοπό την εκτίμηση της κινητικής των παραπάνω πληθυσμών. Για κάθε καμπύλη ανάπτυξης, προσδιορίστηκε ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ_{max} ; ημέρες⁻¹), ο χρόνος προσαρμογής (t_{lag} ; ημέρες), η κατώτερη ασύμπτωτη (y_0 ; log CFU/ml) και η ανώτερη ασύμπτωτη (y_{end} ; log CFU/ml). Τα δεδομένα ανάπτυξης καθώς και οι παράμετροι που υπολογίστηκαν από την προσαρμογή αναλύθηκαν με την βοήθεια της ανάλυσης παραμέτρων (ANOVA) με το γενικό γραμμικό μοντέλο του στατιστικού προγράμματος SPSS (SPSS 10.0.1 for Windows; SPSS, Inc., Chicago, Ill., ΗΠΑ). Οι μέσες τιμές συγκρίθηκαν με τον έλεγχο πολλαπλού πεδίου Tukey's και οι διαφορές αναφέρθηκαν με επίπεδο σημαντικότητας άλφα 0.05.

3.1.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

Η ικανότητα των βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου της *L. monocytogenes*, να προσκολλούνται και να εποικούν σε επιφάνειες επηρεάζεται από πολλούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (Katsikogianni και Missirlis, 2004) που επιδρούν στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων (Briandet et al., 1999, Di Bonaventura et al., 2008, Mai και Conner, 2007) και/ή αλλάζουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της επιφάνειας (Katsikogianni και Missirlis, 2004). Το είδος και η σύνθεση του υπολείμματος τροφίμου στον βιομηχανικό εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει τον πληθυσμό των προσκολλημένων κυττάρων, καθώς και την ανθεκτικότητά τους ενάντια στην απολύμανση (Briandet et al., 1999, Somers και Wong, 2004, Gram et al., 2007, Mai και Conner, 2007, Jullien et al., 2008).

Η προσκόλληση των βακτηρίων στα κουπόνια ΑΧ και ο πολλαπλασιασμός στους σε διαφορετικά υποστρώματα τροφίμων ήταν περισσότερο εμφανής ($P < 0.05$) στους 20°C από ότι τους 5°C (Σχ. 3.1.1). Στους 20°C, σημαντικά ($P < 0.05$) υψηλότεροι πληθυσμοί προσκολλημένων κυττάρων ανακτήθηκαν από κουπόνια που είχαν τοποθετηθεί σε κρέμα (5.30 και 5.42 Log_{10} CFU/cm² για την *L. monocytogenes* και την ΟΜΧ, αντίστοιχα) σε σχέση με αυτά που είχαν τοποθετηθεί σε γάλα (4.49 και 4.55 Log_{10} CFU/cm² για την *L. monocytogenes* και την ΟΜΧ, αντίστοιχα). Επιπλέον, και στα δύο τρόφιμα στους 20°C βρέθηκαν παρόμοιοι πληθυσμοί της *L. monocytogenes* και της ΟΜΧ, γεγονός που υποδηλώνει την κυριαρχία του παθογόνου έναντι της ενδογενούς χλωρίδας. Στους 5°C, οι χαμηλότεροι πληθυσμοί παρατηρήθηκαν στο γιαούρτι, ενώ στο γάλα και την κρέμα η *L. monocytogenes* και η ΟΜΧ είχαν παρόμοια επίπεδα προσκόλλησης (3.7 Log_{10} CFU/cm² και 3.9 Log_{10} CFU/cm², αντίστοιχα). Τέλος, η επώαση σε γάλα και γιαούρτι στους 5°C είχε σαν αποτέλεσμα σημαντικά υψηλότερους πληθυσμούς ($P < 0.05$) προσκολλημένων κυττάρων της ΟΜΧ σε σχέση με τα βιοϋμένια της *L. monocytogenes*, υποδηλώνοντας την ύπαρξη μικτού πληθυσμού προσκολλημένων κυττάρων στα κουπόνια ΑΧ. Ανεξάρτητα από την θερμοκρασία συντήρησης, οι βακτηριακοί πληθυσμοί που αυξήθηκαν σε αιώρηση ήταν σημαντικά υψηλότεροι ($P < 0.05$) από τους προσκολλημένους (Σχ. 3.1.1). Με εξαίρεση το γιαούρτι, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των πλαγκτονικών πληθυσμών της *L. monocytogenes* και της ΟΜΧ (Σχ. 3.1.1). Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, η προσκόλληση *L. monocytogenes* βρέθηκε ότι αυξάνεται με την ανάπτυξη της θερμοκρασίας (Briandet et al., 1999, Giaouris et al., 2005, Mai και Conner, 2007, Norwood και Gilmour, 2001). Οι διαφορές αυτές στην προσκόλληση θεωρούνται ανεξάρτητες από την κυτταρική πυκνότητα (Mai και Conner, 2007). Γενικά, η αυξημένη προσκόλληση έχει αποδοθεί σε αυξημένη παραγωγή μαστίγιων, τα οποία συσχετίζονται με την προσκόλληση των κυττάρων σε επιφάνειες κάτω από στατικές συνθήκες (Chavant et al., 2002, Vatanyoorsarn et al., 2000). Αντίθετα, οι Lemon et al. (2007) έδειξαν ότι η κινητικότητα που προέρχεται από τα μαστίγια και όχι

τα μαστίγια τα ίδια είναι καθοριστικός παράγοντας για την προσκόλληση και τον σχηματισμό βιοϋμενίου της *L. monocytogenes* σε αβιοτικές επιφάνειες. Πιθανώς, οι διαφορές μεταξύ των μελετών υπάρχουν κυρίως λόγω των διαφορετικών πειραματικών προσεγγίσεων (διαφορετικό pH, δυναμικό οξειδοαναγωγής και διαθεσιμότητας των θρεπτικών συστατικών), οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα διαφορετική συμπεριφορά του παθογόνου (Todhanakasem και Young, 2008).



Σχήμα 3.1.1. Πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* (■) και ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (□) σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) ή των σε αιώρηση κυττάρων *Listeria monocytogenes* (■) και ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (□) ($\log \text{CFU}/\text{ml}$ ή $\log \text{CFU}/\text{g}$) σε γάλα, κρέμα βανίλιας και γιαούρτι, μετά από επώαση στους 5 και τους 20°C για 7 ημέρες. Οι μέσες τιμές που μοιράζονται τουλάχιστον ένα γράμμα δεν είναι στατιστικώς διαφορετικές ($P \geq 0.05$). *:Κάτω από το όριο αρίθμησης της μεθόδου ($1.3 \text{ Log CFU}/\text{cm}^2$).

Σε αντίθεση με την θερμοκρασία, χαμηλές τιμές pH έχουν δείξει ότι ενισχύουν την αρχική προσκόλληση της *L. monocytogenes* σε ανοξείδωτο χάλυβα, καθώς ομάδες αρνητικά φορτισμένες στην επιφάνεια του κυττάρου λαμβάνουν πρωτόνια από το περιβάλλον (Briandet et al., 1999). Για τον λόγο αυτό, η μειωμένη προσκόλληση του παθογόνου σε επιφάνειες παρουσία γιαουρτιού (Σχ. 3.1.1.) μπορεί να αποδοθεί στην ανασταλτική επίδραση του χαμηλού pH στα επόμενα βήματα σχηματισμού του βιοϋμενίου (σχηματισμός μικροαποικίας, ωρίμαση και ανάπτυξη του βιοϋμενίου). Επομένως, περαιτέρω έρευνα χρειάζεται για την διευκρίνιση της επίδρασης που δύναται να έχει το όξινο περιβάλλον στα διαφορετικά βήματα ανάπτυξης των βιοϋμενίων. Επιπλέον, η επιβίωση του

παθογόνου στο περιβάλλον υπόστρωμα (Σχ. 3.1.1.) μπορεί να αποδοθεί στους μηχανισμούς οξεοανθεκτικότητας που επάγονται από την παρατεταμένη έκθεση στο γιαούρτι για 7 ημέρες (Belessi et al., 2008).

Η ενδογενής χλωρίδα του γάλακτος και της κρέμας δεν φάνηκε να αναστέλλει την προσκόλληση της *L. monocytogenes*, αφού η καταμέτρηση των πληθυσμών στις επιφάνειες που είχαν εμβαπτιστεί στα προϊόντα αυτά κυμάνθηκε από 3.5 μέχρι 5.5 log CFU/cm² (Σχ. 3.1.1.). Στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων τα είδη *Listeria* spp. συνυπάρχουν με άλλα βακτήρια σε βιοϋμένια, ενώ η ανταγωνιστική μικροχλωρίδα δεν φαίνεται ούτε να ευνοεί ούτε όμως και να αναστέλλει την προσκόλληση της *L. monocytogenes* στις επιφάνειες (Bremer et al., 2001, Carpentier και Chassaing, 2004, Zhao et al., 2004). Η παρουσία άλλων βακτηρίων μπορεί να καθιστά το παθογόνο περισσότερο ανθεκτικό σε συνθήκες καταπόνησης (Bremer et al., 2001). Από την άλλη, οι Zhao et al. (2004) έδειξαν ότι ορισμένα είδη βακτηρίων ενδέχεται να περιορίζουν την προσκόλληση της *L. monocytogenes* παράγοντας ανασταλτικούς μεταβολίτες. Χρειάζεται επομένως περεταίρω έρευνα σχετικά με την επίδραση της ενδογενούς μικροχλωρίδας ενός τροφίμου στον σχηματισμό βιοϋμενίων της *L. monocytogenes* σε επιφάνειες ΑΧ παρουσία των υπολειμμάτων του.

Η στατιστική ανάλυση πολλαπλών παραμέτρων (multivariate statistical analysis) αποκάλυψε ότι οι συνθήκες πριν την επώαση (θερμοκρασία συντήρησης, μέσο επώασης και είδος κυττάρων) επηρέασαν σημαντικά ($P < 0.05$) την μετέπειτα κινητική ανάπτυξης του *L. monocytogenes* σε γάλα στους 5°C. Η παρατεταμένη έκθεση στους 20°C καθυστέρησε ($P < 0.05$) την μετέπειτα ανάπτυξη των προσκολλημένων και των πλαγκτονικών κυττάρων της *L. monocytogenes* στο γάλα, όπως προκύπτει από την αυξημένη φάση προσαρμογής, σε σχέση με την παραμονή στους 5°C (Πίν. 3.1.1., Σχ. 3.1.2). Στους 5°C, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ειδών κυττάρων στην μετέπειτα κινητική ανάπτυξης (φάση προσαρμογής και ρυθμός ανάπτυξης) της *L. monocytogenes* σε γάλα (Πίν. 3.1.1.). Ανεξαρτήτως θερμοκρασίας, η έκθεση της *L. monocytogenes* σε γάλα μείωσε την φάση προσαρμογής των κυττάρων που ήταν προσκολλημένα σε σχέση με αυτά που ήταν σε αιώρηση (Πίν. 2.1.1., Σχ. 3.1.2). Αντίθετα, ο ρυθμός ανάπτυξης των πλαγκτονικών κυττάρων που επώαστηκαν σε γάλα ήταν υψηλότερος από τον αντίστοιχο των βιοϋμενίων (Πίν. 3.1.1.). Η έκθεση των κυττάρων σε κρέμα οδήγησε σε αυξημένη φάση προσαρμογής των προσκολλημένων σε σχέση με τα πλαγκτονικά κύτταρα (Πίν. 3.1.1., Σχ. 3.1.2). Σε γενικές γραμμές, ο υψηλότερος μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης παρατηρήθηκε όταν οι συνθήκες έκθεσης ήταν ίδιες με τις μετέπειτα συνθήκες ανάπτυξης (Πίν. 3.1.1.). Επιπλέον, ο πληθυσμός των συνολικών βακτηρίων μετρήθηκε στους 6-7 Log₁₀ CFU/ml, ανεξαρτήτως των συνθηκών που προϋπήρχαν.

Πίνακας 3.1.1. Κινητικές παράμετροι (μέσες τιμές \pm τυπική απόκλιση^α, n=4) της ανάπτυξης του *L. monocytogenes* σε γάλα στους 5°C, μετά από επώαση σε διαφορετικές συνθήκες^β.

Προηγούμενες συνθήκες επώασης			Χρόνος προσαρμογής (ημέρες)	Ρυθμός ανάπτυξης (ημέρες ⁻¹)	Y ₀ (log CFU/ml) ^γ	Y _{end} (log CFU/ml) ^δ	R ²
Μέσο ανάπτυξης	Θερμοκρασία	Είδος κυττάρων					
Γάλα	5°C	Προσκολλημένα	0.00 α \pm 0.00	0.51 γ \pm 0.02	1.66 αβ \pm 0.02	5.98 β \pm 0.10	0.982-0.987
		Πλαγκτονικά	1.85 αβ \pm 0.19	0.57 γ \pm 0.02	1.54 αβ \pm 0.09	5.26 α \pm 0.06	0.977-0.991
	20°C	Προσκολλημένα	3.04 β \pm 0.95	0.23 α \pm 0.03	1.61 αβ \pm 0.43	- ^ε	0.938-0.981
		Πλαγκτονικά	6.23 γ \pm 1.31	0.26 α \pm 0.00	2.07 β \pm 0.16	- ^ε	0.963-0.975
Κρέμα βανίλιας	5°C	Προσκολλημένα	1.41 αβ \pm 0.30	0.25 α \pm 0.01	2.12 β \pm 0.16	6.42 γ \pm 0.18	0.983-0.991
		Πλαγκτονικά	0.00 α \pm 0.00	0.24 α \pm 0.01	2.09 β \pm 0.32	6.62 δ \pm 0.00	0.986-0.965
	20°C	Προσκολλημένα	9.07 δ \pm 1.87	0.41 β \pm 0.08	1.15 α \pm 0.21	- ^ε	0.975-0.976
		Πλαγκτονικά	5.71 γ \pm 0.65	0.27 α \pm 0.03	1.89 β \pm 0.46	- ^ε	0.975-0.979

^α: Μέσες τιμές σε μία στήλη που μοιράζονται τουλάχιστον ένα γράμμα δεν είναι σημαντικά διαφορετικές (P<0.05)

^β: Επιφάνειες με υπολείμματα τροφίμων από τις οποίες αποκολλήθηκαν κύτταρα ή τρόφιμα στα οποία αυξήθηκε ο πλαγκτονικός πληθυσμός πριν την μεταφορά του στο γάλα

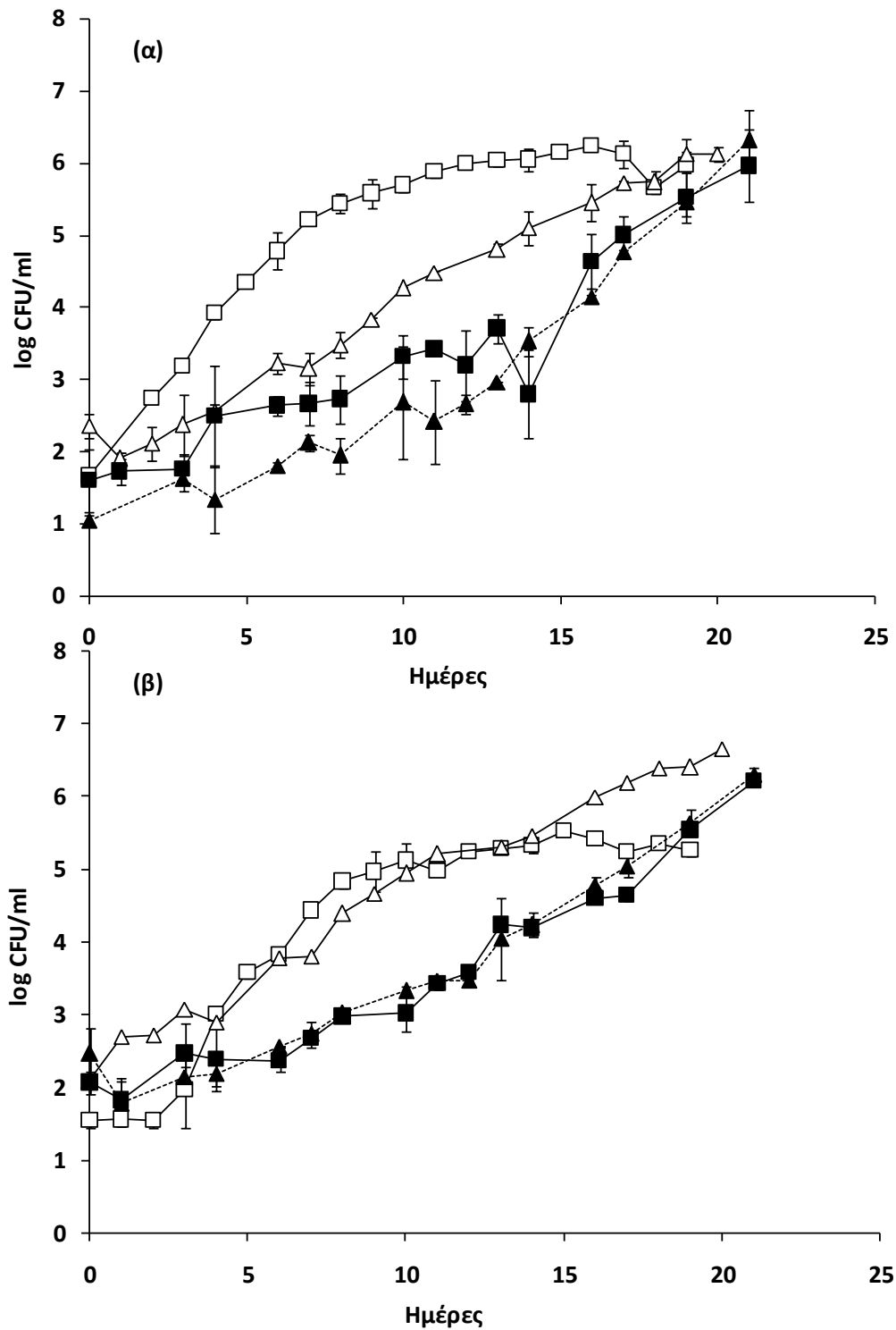
^γ: Ανώτερη ασύμπτωτη γραμμή

^δ: Κατώτερη ασύμπτωτη γραμμή

^ε: Δεν προέκυψε ανώτερη ασύμπτωτη γραμμή

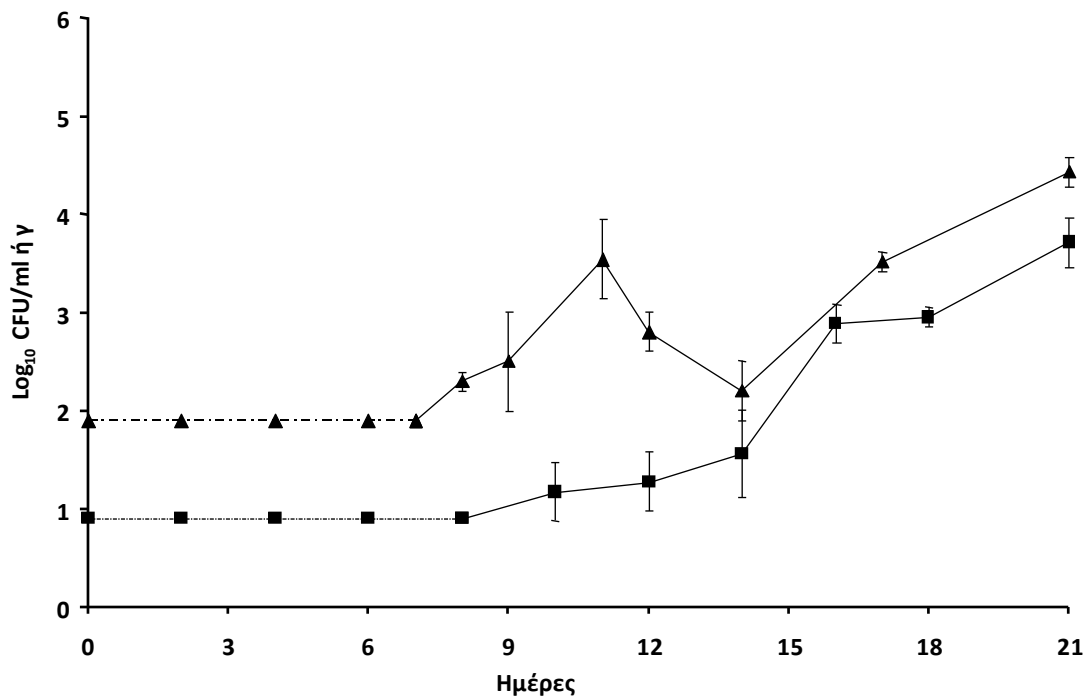
Τα αποκολλημένα κύτταρα της *L. monocytogenes* από επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα ενδέχεται να επιμολύνουν διαφορετικά προϊόντα και να πολλαπλασιαστούν σε συνθήκες ψύξης. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδηλώνουν ότι η παρατεταμένη έκθεση της *L. monocytogenes* στις επιφάνειες ΑΧ στους 20°C καθυστέρησε την μετέπειτα ανάπτυξη των αποκολλημένων κυττάρων σε γάλα στους 5°C, σε σχέση με την προηγούμενη παραμονή στους 5°C. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες έδειξαν ότι η μεταφορά του μικροοργανισμού σε χαμηλότερες θερμοκρασίες αύξησε τον χρόνο προσαρμογής των πλαγκτονικών κυττάρων *L. monocytogenes* (Buchanan και Klawitter, 1991, Dufrenne et al., 1997). Εκτός της θερμοκρασίας, η διαφορετικότητα των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρατεταμένη έκθεση και την προσκόλληση επηρέασε σημαντικά την κινητική ανάπτυξης, τόσο των αποκολλημένων, όσο και των πλαγκτονικών κυττάρων. Οι Geornaras et al. (2006a, b) ερεύνησαν την επίδραση της προέλευσης του εμβολίου στην επιβίωση και την κινητική ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, κατά την διάρκεια του ελέγχου μετά την επεξεργασία εμπορικών λουκάνικων καπνιστών και τύπου Φρανκφούρτης. Κατέληξαν ότι η οικολογική προέλευση των κυττάρων (π.χ. προσκολλημένα σε ανοξείδωτο χάλυβα ή σε αιώρηση) επηρέασαν την συμπεριφορά ανάπτυξης του παθογόνου, συμπεριλαμβανομένης και της φάσης προσαρμογής, και την γενικότερη απόκρισή του σε διαφορετικά αντιμικροβιακά διαλύματα (Geornaras et al., 2006a, b).

Στην παρούσα μελέτη, οι παρατηρούμενες παραλλαγές στην ανάπτυξη των αποκολλημένων κυττάρων της *L. monocytogenes* από επιφάνειες με υπολείμματα διαφορετικών προϊόντων φάνηκε ότι εξαρτήθηκε από την θερμοκρασία, την κατάσταση (π.χ. υγρό ή στερεό) και την σύνθεση του τροφίμου. Συγκεκριμένα, αποκολλημένα κύτταρα από επιφάνειες σε επαφή με γάλα είχαν καλύτερη μετέπειτα ανάπτυξη σε γάλα από τα κύτταρα σε επαφή με κρέμα σε υψηλή και χαμηλή θερμοκρασία. Πιθανώς, η αποκόλληση και ο διασκορπισμός των κυττάρων σε διαφορετικά οικοσυστήματα τροφίμων σε σχέση με αυτά που έγινε η προσκόλληση, αύξησαν την προσαρμογή του μικροοργανισμού. Μελέτες σε υγρά εργαστηριακά υποστρώματα έχουν δείξει ότι η προσαρμογή των πλαγκτονικών κυττάρων *L. monocytogenes* αυξάνεται σε απότομες περιβαλλοντικές μεταβολές (π.χ. pH και a_w , Mellfont et al., 2003, Tiganitas et al., 2009). Η κυτταρική προσαρμογή είναι ένα σημαντικό ζήτημα στις μελέτες πρόκλησης (challenge studies) αφού η προετοιμασία του εμβολίου κάτω από διαφορετικές συνθήκες από αυτές που συνάντησαν στο προς εξέταση τρόφιμο μπορούν να οδηγήσουν στην υποεκτίμηση της βακτηριακής ανάπτυξης κι επιβίωσης. Επιπλέον, η παρατήρηση ότι αποκολλημένα κύτταρα από γάλα παρουσίασαν ταχύτερη ανάπτυξη από τα σε αιώρηση ομόλογά τους, υπερτονίζει την σημασία της φυσιολογικής ή μεταβολικής ιστορίας των κυττάρων στην μετέπειτα αύξησή τους (Mellfont et al., 2003, Tiganitas et al., 2009). Σε γενικές γραμμές, σε περίπτωση επιμόλυνσης των τροφίμων από την *L. monocytogenes*,



Σχήμα 3.1.2. Συγκριτική ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε γάλα στους 5°C, κατόπιν μεταφοράς αποκολλημένων από κουπόνια AX (α) ή πλαγκτονικών (β) κυττάρων του, σχηματισμένων σε κρέμα (τριγωνικά σύμβολα) και γάλα (τετράγωνα σύμβολα) στους 5°C (ανοιχτά σύμβολα) και 20°C (κλειστά σύμβολα). Τα σύμβολα του σχήματος αντιπροσωπεύουν σχηματισμό βιοϋμενίου ή παρατεταμένη έκθεση πλαγκτονικών κυττάρων στις εξής συνθήκες: Γάλα 5°C (□), γάλα 20°C (■), κρέμα 5°C (Δ) και κρέμα 20°C (▲). Οι γραμμές τυπικού σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικές αποκλίσεις τεσσάρων επαναλήψεων (n=4).

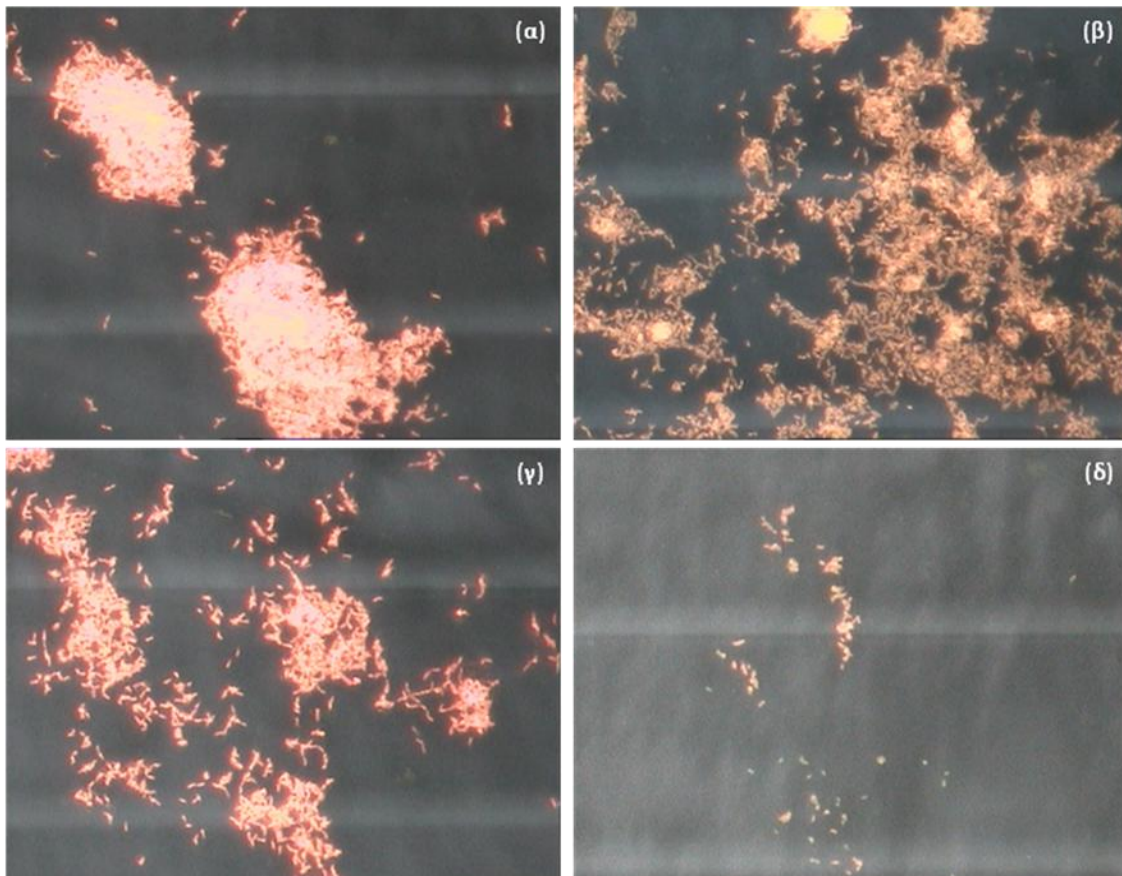
κύτταρα προέρχονται από βιοϋμένια μπορούν να επιδείξουν καλύτερη κινητική από αντίστοιχα κύτταρα που προέρχονται από υγρά τρόφιμα ή υπολείμματα. Για τον λόγο αυτό, μελέτες που αξιολογούν την επίδραση των διαδικασιών συντήρησης ή περιγράφουν μαθηματικά τις αποκρίσεις των μικροβίων θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τους την διαφορετική συμπεριφορά των κυττάρων που αποκολλούνται από βιοϋμένια.



Σχήμα 3.1.3. Πληθυσμός της *L. monocytogenes* σε γάλα (■) και κρέμα βανίλιας (▲) στους 5°C, μετά από εκούσια αποκόλληση κυττάρων του, από επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα, εξοικειωμένων σε γιαούρτι για 7 ημέρες στους 5°C. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν σημεία δειγματοληψίας στα οποία ο πληθυσμός βρέθηκε κάτω από το όριο αρίθμησης της μεθόδου (1 log CFU/ml και 2 log CFU/γ, για το γάλα και την κρέμα αντίστοιχα) με την κλασική μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης. Οι γραμμές τυπικών σφαλμάτων αντιπροσωπεύουν τυπικές αποκλίσεις από τέσσερις επαναλήψεις ($n=4$).

Τα προσκολλημένα κύτταρα της *L. monocytogenes* που εξοικειώθηκαν στο γιαούρτι, όταν μεταφέρθηκαν σε καινούρια υποστρώματα αποκολλήθηκαν εκούσια από τα κουπόνια AX και μετανάστευσαν στα ευνοϊκότερα για την αύξησή τους γάλα και κρέμα στους 5°C (Σχ. 3.1.3.). Κατά τον προσδιορισμό της προσκόλλησης και του σχηματισμού βιοϋμενίων, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* ήταν μη ανιχνεύσιμος στα κουπόνια που είχαν επωαστεί για 7 ημέρες σε γιαούρτι (Σχ. 3.1.1.). Εντούτοις, η μεταφορά ολόκληρων των κουπονιών σε φρέσκο παστεριωμένο γάλα και κρέμα βανίλιας είχε σαν αποτέλεσμα την αποκόλληση και τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου στα

προϊόντα (Σχ. 3.1.3.). Συγκεκριμένα, μετρήσιμη ανάπτυξη των κυττάρων της *L. monocytogenes* παρουσιάστηκε έπειτα από 9 και 10 ημέρες στην κρέμα και το γάλα αντίστοιχα (Σχ. 3.1.3.). Στο τέλος της περιόδου επώασης (21 ημέρες) μετρήθηκαν υψηλότεροι πληθυσμοί του παθογόνου στην κρέμα ($4.4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$) σε σχέση με το γάλα ($3.7 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/ml}$) (Σχ. 3.1.3.). Συνολικά, η κρέμα βρέθηκε περισσότερο ευνοϊκό υπόστρωμα από το γάλα για την αποκόλληση και τον πολλαπλασιασμό της *L. monocytogenes* (Σχ. 3.1.3.). Το γεγονός αυτό μπορεί να σχετίζεται με την δομική ανομοιογένεια και την διαφορετική σύνθεση σε θρεπτικά συστατικά που ενδεχομένως ευνοούν την ταχύτερη ανάπτυξη του βακτηρίου. Επιπλέον, η πυκνότητα, η δομή και η στερεότητα των προσκολλημένων μικροβιακών πληθυσμών είναι ορισμένοι από τους παράγοντες που μεταξύ άλλων, επηρεάζουν την βακτηριακή αποκόλληση (Midelet και Carpentier, 2002, Hunt et al., 2004, Herrera et al., 2007).



Σχήμα 3.1.4. Μικροσκοπική απεικόνιση (φωτογραφίες) των βιοϋμενίων της *L. monocytogenes* σχηματισμένων σε μεταλλικές επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα σε γιαούρτι στους 5°C για 7 ημέρες, μετά από μεταφορά τους σε γάλα (α) και κρέμα (β) ή ως είχαν (γ, δ). Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή, έπειτα από χρώση των επιφανειών με πορτοκαλί της ακριδίνης (1%) και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού (Μεγέθυνση 40 φορές).

Το φαινόμενο καταγράφηκε και με μικροσκοπική απεικόνιση των κουπονιών που εμβολιάστηκαν στα τρόφιμα (Σχ. 3.1.4.). Ιδιαίτερα στην περίπτωση του γιαουρτιού, ενώ ο πληθυσμός του βιοϋμενίου του παθογόνου μετρήθηκε κάτω από το όριο αρίθμησης (Σχ. 3.1.1.), στο Σχήμα 3.1.4. φαίνεται καθαρά η ύπαρξη κυττάρων στα κουπόνια. Η παρατήρηση αυτή αρχικά υποδηλώνει ότι η μέθοδος απόξεσης και/ή επιφανειακής επίστρωσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ενδεχομένως υποεκτιμά (ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα) τον προσκολλημένο πληθυσμό κυττάρων στα κουπόνια ΑΧ, δίνοντας έτσι ανακριβή στοιχεία για τον πραγματικό κίνδυνο των μολυσμένων επιφανειών (Asséré et al., 2008). Μία άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι τα κύτταρα πολλών παθογόνων μικροοργανισμών εισέρχονται σε μια κατάσταση αδρανοποίησης, στην οποία θεωρούνται βιώσιμα αλλά μη ικανά να καλλιεργηθούν (viable but nonculturable, VBNC), με σκοπό να μπορέσουν να επιβιώσουν κάτω από αντίξοες για αυτά συνθήκες (Wong και Wang, 2004). Στην λανθάνουσα αυτή κατάσταση διατηρούν μεν την μεταβολική τους δραστηριότητα και την παθογένεια, αλλά δεν μπορούν να καλλιεργηθούν και να αυξηθούν με τις κλασικές εργαστηριακές μεθόδους (Nystrom, 2003). Μια τέτοια θεωρία έρχεται να υποστηριχτεί από τους Giaouris et al. (2005), οι οποίοι έδειξαν ότι μεταβολικώς ενεργά αλλά μη καλλιεργήσιμα κύτταρα από την συμβατική μέθοδο επιφανειακής επίστρωσης (όριο ανίχνευσης $1.3 \log_{10}$ CFU/cm²), παρέμεναν προσκολλημένα σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα μετά από την μέθοδο απόξεσης.

3.1.4 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι τα κύτταρα της *L. monocytogenes* που βρίσκονται προσκολλημένα σε βιομηχανικές επιφάνειες ενδέχεται να αποτελούν ένα σημαντικό κίνδυνο, λόγω της πιθανής αποκόλλησής τους και του πολλαπλασιασμού τους στα διερχόμενα από αυτές τρόφιμα. Επιπλέον, τα αποκολλημένα κύτταρα ενδέχεται να παρουσιάσουν αυξημένη ανθεκτικότητα σε καταπονήσεις σε σχέση με τα κύτταρα σε αιώρηση, ανάλογα με το περιβάλλον ανάπτυξης πριν και μετά από την μεταφορά τους. Τα αποκολλημένα κύτταρα ανεξάρτητα αν είναι γερασμένα ή τραυματισμένα, εξακολουθούν να αποτελούν ένα μείζον κίνδυνο για την δημόσια υγεία που σχετίζεται με την βιομηχανία τροφίμων. Τα υπολείμματα τροφίμων, σαν μέρος της οικολογικής προϊστορίας, επηρεάζουν την ανάπτυξη και την συμπεριφορά της *L. monocytogenes*, επίδραση που διαφέρει μεταξύ της πλαγκτονικής και βιοϋμενικής ανάπτυξης. Σαν μελλοντικός στόχος θα μπορούσε να τεθεί η εκτίμηση παρόμοιων σεναρίων επιμόλυνσης με πολλαπλά στελέχη της *L. monocytogenes*, όπως και η αξιολόγηση των γονοτυπικών μεταβολών λόγω της προσκόλλησης και της αποκόλλησης του βακτηρίου. Κάτι τέτοιο θα βελτίωνε την κατανόηση των μηχανισμών που επιτρέπουν στη *L. monocytogenes* να επιβιώνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα στις επιφάνειες των τυροκομικών επιχειρήσεων.

3.2. Ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων της *Listeria monocytogenes* σε πρακτικές εξυγίανσης

International Journal of Food Microbiology 145 (2011), S46-S52

3.2.1 Εισαγωγή

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι ευρέως διαδεδομένος στην φύση, ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, και θεωρείται υπεύθυνος για πολυάριθμες εκδηλώσεις λιστερίωσης που σχετίζονται με τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα (Schlech, 1991; Waak et al., 2002, FDA, 2003). Έχει απομονωθεί από το έδαφος, ζωοτροφές, επιφανειακά ύδατα και έχει βρεθεί ότι επιβιώνει σε επιφάνειες επεξεργασίας για 10-12 χρόνια (Wilks et al., 2006). Η ικανότητα του βακτηρίου να εποικίζει σε επιφάνειες, να σχηματίζει δομές βιοϋμενίων και να αντιστέκεται σε διάφορες καταπονήσεις σχετικές με τα τρόφιμα είναι σημαντική για την παρατεταμένη παραμονή του στα περιβάλλοντα επεξεργασίας (Rieu et al, 2008). Ο *L. monocytogenes* αναμένεται να σχηματίσει βιοϋμένια στις επιφάνειες επεξεργασίας, όπου υπάρχει συγκέντρωση υπολειμμάτων τροφίμων (Gandhi και Chikindas, 2007; Roimenidou et al. 2009), σαν μηχανισμός ανθεκτικότητας έναντι αντιμικροβιακών παραγόντων, βακτηριοκτόνων ουσιών και της θερμότητας (Bower και Daeschel, 1999; Cloete, 2003). Η ανθεκτικότητα των προσκολλημένων βακτηρίων στις βακτηριοκτόνες ουσίες έχει συσχετιστεί αρχικά με εξωτερικούς παράγοντες (μηχανική προστασία) λόγω της σύνθεσης εξωπολυσακχαριτών (EPS), θρεπτικών και του κελύφους του βιοϋμενίου ή με εσωτερικούς (φυσιολογία) παράγοντες, όπως είναι η προσαρμογή σε καταπονήσεις (π.χ., όξινη, οξειδωτική, έλλειψη θρεπτικών, κ.α.) μέσα στην βιοϋμενική κοινότητα (Morton et al., 1998; Pan et al., 2006, Chaitiemwong et al., 2010).

Σημαντικοί παράγοντες για την φαινοτυπική μετάβαση από την πλαγκτονική στην βιοϋμενική κατάσταση μεταξύ άλλων είναι το pH, η ενεργότητα ύδατος, η θερμοκρασία και η σύσταση των θρεπτικών συστατικών των υπολειμμάτων τροφίμων (Shi και Zhu, 2009), οι οποίοι μπορεί να επηρεάσουν και την ευαισθησία των προσκολλημένων κυττάρων της *L. monocytogenes* στους απολυμαντές (Aarnisalo et al., 2007; Gram et al., 2007). Όταν εκτίθενται σε συνθήκες ήπιας όξινης ή οσμωτικής καταπόνησης, όπως είναι οι τιμές pH 5 ή οι συγκεντρώσεις 3-5% NaCl, έχει βρεθεί ότι τα βακτήρια αναπτύσσουν μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε δριμύτερες συνθήκες καταπόνησης (Lou και Yousef, 1997, Stopfoth et al., 2005). Οι Naitali et al. (2009) μελέτησαν την επίδραση τιμής pH του περιβάλλοντος στην ανεκτικότητα των πλαγκτονικών κυττάρων *L. monocytogenes* κατά την απολύμανση και συμπέραναν ότι κύτταρα που αυξήθηκαν σε pH 5.2 χρειάστηκαν τέσσερις φορές υψηλότερη ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση (ΕΒΣ, MBC) των τεταρτοταγών ενώσεων του

αμμωνίου (QAC) και δύο φορές υψηλότερη ΕΒΣ χλωρίνης (CF), από τα αντίστοιχα που αυξήθηκαν σε pH 7.2. Οι Pan et al., (2006) έλεγξαν έναν εμπορικό απολυμαντικό παράγοντα με βάση το υπεροξειδίο του υδρογόνου και συμπέραναν ότι ήταν μη αποτελεσματικός στην εξάλειψη των βιοϋμενίων της *L. monocytogenes*. Εντούτοις, η έκθεση στον παράγοντα αυτό αύξησε την ανθεκτικότητα του βιοϋμενίου σε άλλους απολυμαντές (QAC, Shi και Zhu, 2009). Επιπλέον, οι Storforth et al. (2002) παρατήρησαν παρόμοια συμπεριφορά έναντι των απολυμαντών μεταξύ των οξυάντοχων ή μη οξυάντοχων προσκολλημένων κυττάρων της *L. monocytogenes*, τα οποία είχαν επωαστεί σε υγρά απορρίμματα όξινης απολύμανσης κρεάτων. Η λεπτομερής γνώση της προσαρμοστικής ικανότητας των βιοϋμενίων στους απολυμαντές είναι σημαντική για την βιοϊχνηλασιμότητα και συγκεκριμένα για τον εντοπισμό της αιτίας του προβλήματος, καθώς μπορεί να βοηθήσει στον συσχετισμό της παρουσίας της *L. monocytogenes* σε συγκεκριμένο στάδιο την παραγωγικής διαδικασίας με την προϊστορία των κυττάρων και την φυσιολογική τους κατάσταση. Επιπλέον, η γνώση της αποτελεσματικότητας των διεργασιών απολύμανσης ενάντια των βιοϋμενίων που σχηματίστηκαν κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να συνεισφέρει στην αξιόπιστη εκτίμηση του κινδύνου που τίθεται από τις ακατάλληλες διαδικασίες εξυγίανσης. Η πληροφορία αυτή είναι επιπλέον χρήσιμη για την λεγόμενη “λειτουργική” βιοϊχνηλασιμότητα, π.χ. σε περίπτωση επιδημίας, όπου επιχειρείται ο προσδιορισμός των πιθανών πηγών της επιμόλυνσης από την *L. monocytogenes* (Barker et al. 2009).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας διαφόρων διαδικασιών απολύμανσης -χημικών και θερμικών- στην επιβίωση των βιοϋμενίων της *L. monocytogenes*, σχηματισμένων σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα (προσομοιάζοντας τις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων) κάτω από όξινες ή οσμωτικές περιβαλλοντικές συνθήκες, σχετικές με αυτές ενός τυροκομείου.

3.2.2. Υλικά και Μέθοδοι

3.2.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Για την διερεύνηση της επίδρασης του χρόνου έκθεσης, της θερμοκρασίας, της φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων και των περιβαλλοντικών συνθηκών (pH και a_w) σχεδιάστηκαν δύο διαφορετικά πειράματα (Σχ. 3.2.1).

Στο πρώτο πείραμα, τα κύτταρα της *L. monocytogenes* αφέθηκαν να σχηματίσουν βιοϋμένιο σε στείρες επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα (κουπόνια AX) σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSBYE με διαφορετικές τιμές ενεργότητας ύδατος (ρυθμισμένο με NaCl) στους 5 και τους 20°C. Ανά τακτά διαστήματα τα κουπόνια, που έφεραν τα προσκολλημένα κύτταρα υποβάλλονταν σε είτε θερμική επεξεργασία (20 λεπτά σε νερό στους 60°C) ή χημική απολύμανση με υπεροξικό οξύ (PAA 2%). Συγκεκριμένα, αποστειρωμένα κουπόνια AX τοποθετούνταν σε στείρους πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου (50 ml), οι οποίοι περιείχαν 40 ml TSBYE με a_w 0.995, 0.970 και 0.960, έπειτα από προσθήκη 0.5%, 7.5% και 9.5% NaCl αντίστοιχα. Στη συνέχεια τα δείγματα ενοφθαλμίστηκαν με 0.1 ml της *L. monocytogenes* (10^8 CFU/ml) και επώαστηκαν για 12 και 19 ημέρες στους 20 και 5°C, αντίστοιχα. Προτού υποβληθούν στην θερμική ή χημική επεξεργασία τα κουπόνια αφαιρούνταν με προσοχή από τους σωλήνες με την βοήθεια λαβίδας κι εκπλένονταν επιμελώς με 25 ml MRD, ώστε να απομακρυνθεί το υπόστρωμα και τα χαλαρά προσκολλημένα κύτταρα (Giaouris et al., 2005). Οι πλαστικοί σωλήνες επιλέχτηκαν λόγω της ικανότητάς τους να διατηρούν το κουπόνι σε κάθετη στάση, ώστε να μπορεί να σχηματιστεί το βιοϋμένιο και στις δύο πλευρές του κουπονιού. Οι σωλήνες ήταν πάντα συμπληρωμένοι με 40 ml θρεπτικού μέσου, νερού, απολυμαντή ή υγρού εξουδετέρωσης των απολυμαντών (neutralizer), ώστε τα κουπόνια να καλύπτονται πλήρως.

Για την θερμική επεξεργασία, τα κουπόνια τοποθετούνταν σε στείρους πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου (Falcon) που περιείχαν 40 ml αποσταγμένου νερού. Στη συνέχεια οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο, προθερμασμένο στους 60°C (SBS40, Stuart, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, HB). Για την καταγραφή της θερμοκρασίας στην επιφάνεια των κουπονιών AX, χρησιμοποιήθηκε ειδικό θερμοζεύγος (ηλεκτρικό θερμόμετρο), το οποίο εφαρμόστηκε με ειδικό λάστιχο σε ένα επιπλέον κουπόνι τοποθετημένο σε πλαστικό σωλήνα με 40 ml αποσταγμένου νερού που εισήλθε στο υδατόλουτρο ταυτόχρονα με τα δείγματα. Η θερμοκρασία αποτυπωνόταν γραφικά ανά 10", για 22 λεπτά, σε καταγραφέα (PicoLog PP222, Pico Technology, Cambridgeshire, HB). Σε όλες τις περιπτώσεις, η θερμοκρασία στην επιφάνεια των κουπονιών AX αυξήθηκε στους 57°C τα πρώτα 2 λεπτά και στους 58.5-60°C τα πρώτα 3 λεπτά. Με την ολοκλήρωση των 20 λεπτών, τα δείγματα μεταφέρθηκαν αμέσως σε νερό με πάγο και αφέθηκαν να κρυσώσουν (25°C) μέχρι την αποκόλληση και καταμέτρηση των κυττάρων. Για την χημική επεξεργασία, τα κουπόνια (που έφεραν

τα κύτταρα) τοποθετούνταν σε πλαστικούς σωλήνες που περιείχαν 40 ml διαλύματος 2% PAA, στους οποίους παρέμειναν για 1, 2, 3 και 6 λεπτά. Μετά το πέρας της παραμονής τους στο διάλυμα υπεροξικού οξέος, τα κουπόνια αφαιρούνταν, εκπλένονταν και τοποθετούνταν εκ νέου σε πλαστικούς σωλήνες οι οποίοι περιείχαν διάλυμα εξουδετέρωσης (DE neutralizer) και 10-12 αποστειρωμένα γυάλινα σφαιρίδια (διαμέτρου 5 mm) για την αποκόλληση και την καταμέτρηση των προσκολλημένων κυττάρων. Παράλληλα, σαν μάρτυρες εξετάστηκαν κουπόνια χωρίς καμία επεξεργασία, τα οποία αφαιρέθηκαν από πλαστικούς σωλήνες με TSBYE με διαφορετικές ενεργότητες, εκπλύθηκαν και επεξεργάστηκαν με την μέθοδο "bead vortex" για την καταμέτρηση των κυττάρων.

Στο δεύτερο πείραμα, στόχος ήταν η επίδραση της αποτελεσματικότητας τριών απολυμαντών που χρησιμοποιούνται ευρέως από τη βιομηχανία τροφίμων (Cl⁻, PAA και QAC) στην επιβίωση οξυάντοχων (OA) και μη (MA) βιοϋμενικών κυττάρων της *L. monocytogenes* σχηματισμένων σε επιφάνειες AX σε ουδέτερο ή όξινο pH, στους 4°C (Σχ. 3.2.1). Για τον σκοπό αυτό, ποσότητα (0.1 ml) οξυάντοχων και μη κυττάρων (Κεφ. 3.2.2.2) της *L. monocytogenes* ενοφθαλμίστηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSBYE με τιμές pH 5.0 και 7.0 (ρυθμισμένο με γαλακτικό οξύ, DL-Lactic acid, 85% w/w, Sigma), παρουσία στείρων επιφανειών AX και αφέθηκαν να σχηματίσουν βιοϋμένια στους 4°C. Μετά την πάροδο 4, 8 ή 12 ημερών συντήρησης, οι μεταλλικές επιφάνειες αφαιρούνταν κι εκπλένονταν με 25 ml MRD. Στη συνέχεια τα κουπόνια έρχονταν σε επαφή με 40 ml χλωρίνης (Cl⁻, 0.465%), υπεροξικού οξέος (PAA, 2%) κι ενώσεων του τεταρτοταγούς αμμωνίου (QAC, 1%) για διάστημα 6 λεπτών. Η διαδικασία καθαρισμού των κουπονιών παρακάμφτηκε, έτσι ώστε να εκτιμηθεί αποκλειστικά και μόνο η απολυμαντική ικανότητα των τριών διαλυμάτων. Μετά από την επαφή με τους απολυμαντές τα κουπόνια εκπλένονταν επιμελώς και μεταφέρονταν σε 40 ml διαλύματος εξισορρόπησης μαζί με 10-12 γυάλινα σφαιρίδια και ακολουθούσε ο προσδιορισμός των κυττάρων που επιβίωσαν (Giaouris et al., 2005). Όλα τα πειράματα απολύμανσης πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με τουλάχιστον τέσσερις επαναλήψεις.

3.2.2.2. Βακτηριακό στέλεχος και προετοιμασία του εμβολίου

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το παθογόνο στέλεχος *L. monocytogenes* Scott A (ορότυπος 4b, επιδημικό στέλεχος, απομονωμένο από νοσούντα). Οι συνθήκες διατήρησής του στελέχους, καθώς και η διαδικασία ενεργοποίησής του, περιγράφονται λεπτομερώς στην παράγραφο 3.1.2.2. Για την προετοιμασία των μη οξεοανθεκτικών (MO) κυττάρων, ποσότητα (0.1 ml) της ενεργοποιημένης καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε 10 ml TSB χωρίς γλυκόζη (καζεΐνη 17g/l, πεπτόνη σόγιας 3g/l, NaCl 5g/l, K₂HPO₄ 2,5g/l) με την προσθήκη 0.6% yeast extract (TSBYE-G) και επωάστηκαν στους 37°C για 18 ώρες. Ομοίως προετοιμάστηκαν και τα οξεοανθεκτικά κύτταρα (OA)

με μεταφορά (0.1 ml) σε 10 ml διαλύματος TSBYE-G με την προσθήκη 1% γλυκόζη (TSBYE+G) κι επώαση στους 37°C για 18 ώρες (Buchanan and Edelson, 1996). Τα τελικά εμβόλια προέκυψαν μετά από φυγοκέντρηση, έκπλυση κι επαναδιάλυση σε MRD (10^9 CFU/ml, Κεφ. 3.1.2.2).

3.2.2.3. Προετοιμασία επιφανειών ανοξειδωτου χάλυβα.

Μεταλλικές επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα χρησιμοποιήθηκαν σαν αβιοτικά υποστρώματα για τον σχηματισμό των βιοϋμενίων της *L. monocytogenes*. Η διαδικασία συντήρησης και προετοιμασίας των επιφανειών περιγράφεται λεπτομερώς στην παράγραφο 3.1.2.4.

3.2.2.4. Προετοιμασία των απολυμαντών

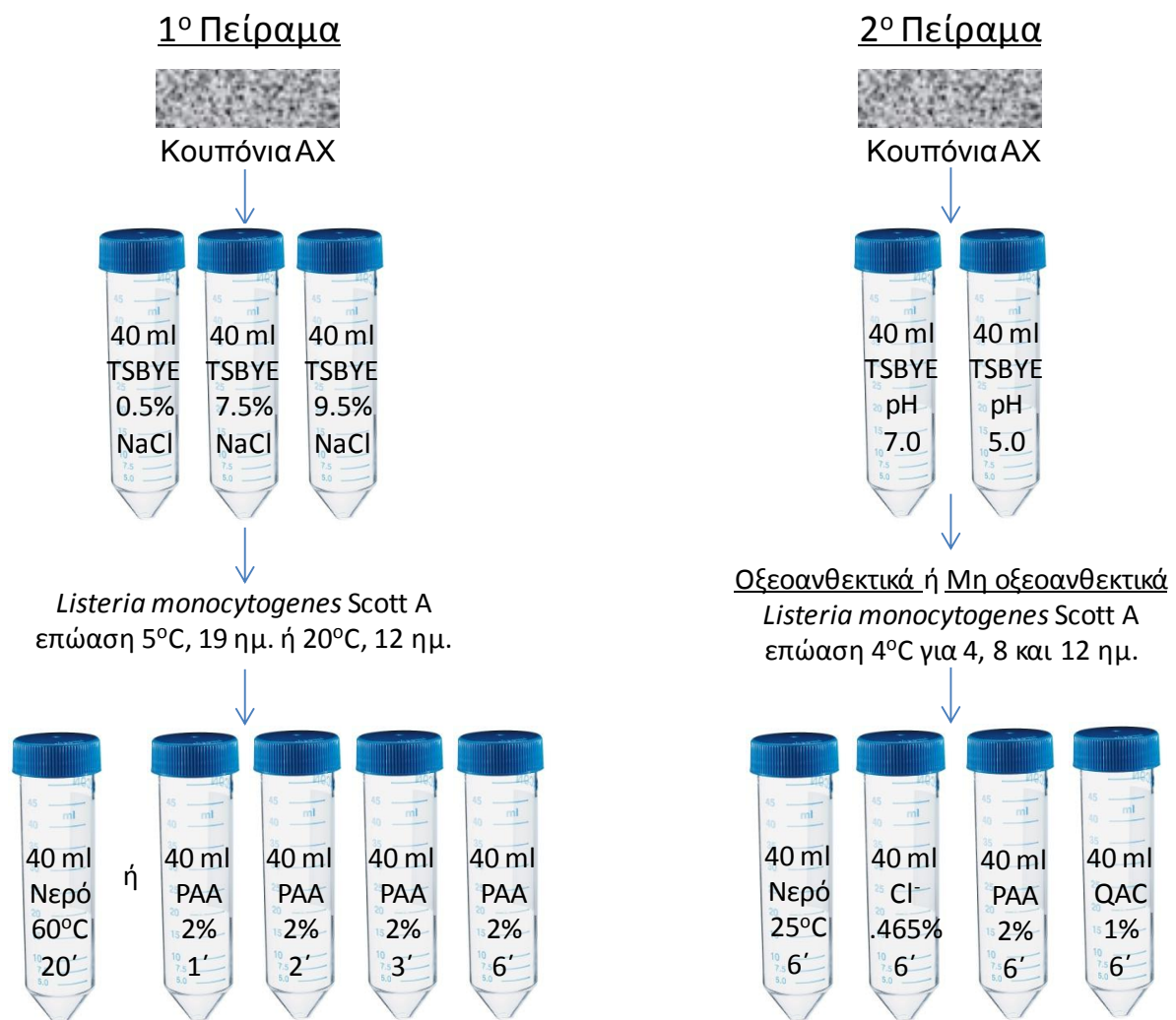
Οι τρεις απολυμαντές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, επιλέχθηκαν με βάση τις διαφορές τους στην υδροφοβικότητα, το ηλεκτρικό φορτίο, καθώς και του μηχανισμού δράσης τους (Naitali et al., 2009). Εμπορικό διάλυμα χλωρίνης (4,3% υποχλωριώδες νάτριο, Χλωρίνη Klinex, Unilever Hellas, Ελλάδα) χρησιμοποιήθηκε σαν παράγοντας απελευθέρωσης χλωρίου, το οποίο αραιώθηκε σε τελική συγκέντρωση Cl_2 τα 0.465% (pH 10.35 ± 0.25). Εμπορικό διάλυμα ενώσεων του τεταρτοταγούς αμμωνίου (QAC, Septanol 10, Ecochemical S.A., Ελλάδα, pH 7.8 ± 0.12) κι εμπορικό διάλυμα υπεροξικού οξέος (PAA, P3-topactive®DES, Ecolab, Ελλάδα, pH 3.61 ± 0.20) διαλύθηκαν σε τελικές συγκεντρώσεις 1% και 2% αντίστοιχα. Επιπλέον, παρασκευάστηκε στείρο διάλυμα εξουδετέρωσης (Dey-Engley Neutralizing Broth, Difco, pH 7.20 ± 0.30) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όλα τα χημικά διαλύματα παρασκευάζονταν τις ημέρες που λάμβαναν χώρα οι επεξεργασίες.

3.2.2.5. Προσδιορισμός των πλαγκτονικών και αποκολλημένων από τις επιφάνειες ΑΧ κυττάρων *L. monocytogenes*

Η αποκόλληση των προσκολλημένων στις επιφάνειες ΑΧ κυττάρων της *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο “bead vortex” (Κεφ. 3.1.2.6.). Ο προσδιορισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με επιφανειακή επίστρωση ποσότητας (0.1 ml) από την κατάλληλη δεκαδική αραιώση σε διπλά τρυβλία TSAYE (Tryptic Soy Agar με 0.6% yeast extract, Biolife, Ιταλία) και επώαση στους 37°C για 48 ώρες. Για τον προσδιορισμό των πλαγκτονικών κυττάρων, ποσότητα (1 ml) από το υπερκείμενο κάθε εξεταζόμενου δείγματος αφαιρούνταν πριν από οποιαδήποτε επεξεργασία και ακολουθούσε επιφανειακή επίστρωση σε διπλά τρυβλία TSAYE. Οι τιμές pH και a_w των υποστρωμάτων μετρήθηκαν μετά την αποστείρωση στα αρχικά διαλύματα ή στο τέλος κάθε μικροβιολογικής ανάλυσης, με ψηφιακό pHμετρο (WTW, pH 526, Γερμανία), και ενεργόμετρο (Rotronic, HYGROLAB), αντίστοιχα.

3.2.2.6. Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα από τις μετρήσεις των αποικιών (CFU/ml) αποκολλημένων και σε αιώρηση κυττάρων της *L. monocytogenes*, όλων των επαναλήψεων ($n = 4$) κάθε περίπτωσης μετασηματίστηκαν σε δεκαδικούς λογαρίθμους (\log_{10}). Τα λογαριθμικά δεδομένα αναλύθηκαν με την βοήθεια της ανάλυσης παραμέτρων (ANOVA) με το γενικό γραμμικό μοντέλο του στατιστικού προγράμματος SPSS (SPSS 10.0.1 for Windows, SPSS, Inc., Chicago, Ill., ΗΠΑ). Οι μέσες τιμές συγκρίθηκαν με τον έλεγχο πολλαπλού πεδίου Tukey. Όλες οι διαφορές αναφέρθηκαν με επίπεδο σημαντικότητας 95%.



Σχήμα 3.2.1. Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού σχεδιασμού. Προσκολλημένα κύτταρα (βιοϋμένια) του *L.monocytogenes*, σχηματισμένα σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα, σε TSBYE διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (0.5, 7.5 και 9.5%), ή τιμών pH 7.0 και 5.0, υποβλήθηκαν σε θερμική επεξεργασία ή χημική απολύμανση. Cl⁻: Χλωρίνη, PAA: διάλυμα υπεροξικού οξέως, QAC: διάλυμα τεταρτοταγών ενώσεων του αμμωνίου.

3.2.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

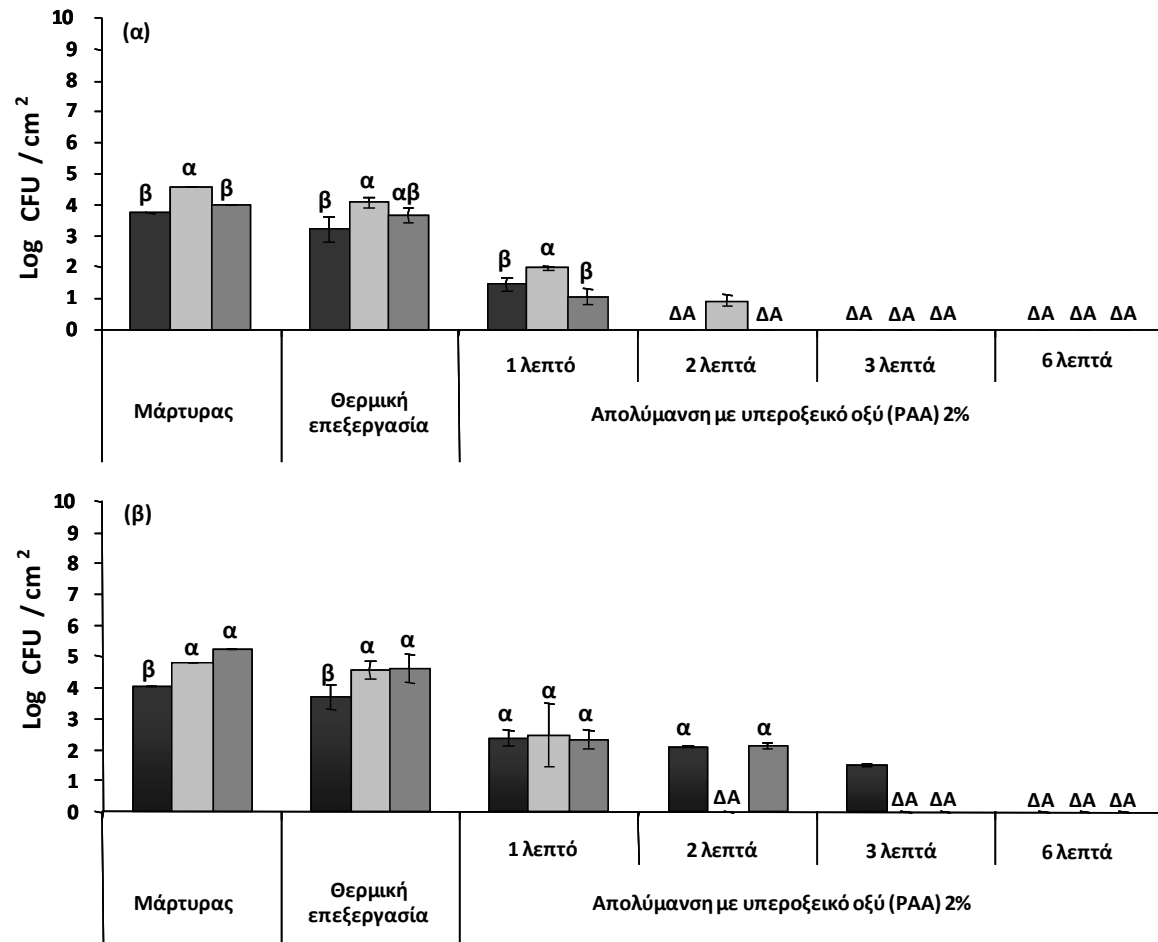
Ο σχηματισμός βιοϋμενίων από τα βακτήρια, καθώς και η ανθεκτικότητα αυτών σε απολυμαντές μπορεί να επηρεαστεί από το υλικό της επιφάνειας, στην οποία σχηματίζονται (π.χ. το ανοξειδωτο ατσάλι ενισχύει την μικροβιακή προσκόλληση σε σχέση με το πολυαιθυλένιο και το γυαλί, καθώς και από το γεγονός ότι μη λείες επιφάνειες έχουν κοιλότητες, οι οποίες βοηθάνε στην καλύτερη προσκόλληση των μικροβίων (Moltz και Martin 2005, Pan et al. 2006, Chaitiemwong et al., 2010). Η προϊστορία των προσκολλημένων κυττάρων της *L. monocytogenes*, η οποία καθορίζεται κυρίως από εσωτερικούς (σύσταση, φυσικοχημικές ιδιότητες) και εξωτερικούς (θερμοκρασία, υγρασία) περιβαλλοντικούς παράγοντες που έχει βρεθεί διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ευαισθησία των βιοϋμενίων στην απολύμανση (Storforth et al., 2002, 2005, Somers και Wong, 2004, Gram et al., 2007, Naïtali et al., 2009). Επομένως, η εφαρμογή κατάλληλης διαδικασίας εξυγίανσης λαμβάνοντας υπόψη το είδος, την συγκέντρωση και τον χρόνο εφαρμογής των απολυμαντικών είναι απαραίτητη για την πλήρη εξάλειψη των κυττάρων του *L. monocytogenes* από τον βιομηχανικό εξοπλισμό.

Η πρώτη πειραματική προσέγγιση στόχευσε στην μελέτη της επίδρασης της ενεργότητας ύδατος, της χρήσης ζεστού νερού και της διάρκειας της απολύμανσης στην μείωση των προσκολλημένων κυττάρων *L. monocytogenes*. Αρχικά, κατά την προσκόλληση ο πληθυσμός των κυττάρων *L. monocytogenes* στα κουπόνια ανοξειδωτου ατσαλιού κυμάνθηκε από 10^4 μέχρι 10^5 CFU/cm² (Σχ. 3.2.2.α, β), σε όλες τις ενεργότητες ύδατος και θερμοκρασίες που εξετάστηκαν, ενώ ο αντίστοιχος πληθυσμός των πλαγκτονικών κυττάρων παρέμεινε στα 10^9 CFU/ml. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, η προσκόλληση των κυττάρων *L. monocytogenes* στα κουπόνια AA στους 20°C ήταν περισσότερη από ότι στους 5°C, κυρίως σε υψηλές αλατοπεριεκτικότητες (Σχ. 3.2.2, Mai και Conner 2007, Roimenidou et al., 2009), πιθανώς λόγω της αυξημένης παραγωγής των μαστιγίων στους 20°C. Τα μαστίγια συσχετίζονται ευρέως με την κυτταρική προσκόλληση κάτω από στατικές συνθήκες (Vatanyoornaisarn et al., 2000, Chavant et al., 2002). Επιπλέον, στους 20°C, σημαντικά μεγαλύτερος πληθυσμός αναλήφθηκε από τα κουπόνια ΣΑ που είχαν επωαστεί σε υπόστρωμα με 9.5% NaCl από τα αντίστοιχα που ελήφθησαν από 0,5% NaCl (Σχ. 3.2.2.). Είναι γνωστό ότι η ταχύτητα προσκόλλησης των κυττάρων αυξάνεται με την ανάπτυξη του ιοντικού δυναμικού (ionic strength) του μέσου π.χ. με την προσθήκη NaCl (Uyen et al., 1988, Morisaki και Tabuchi, 2009). Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι αυτή η επίδραση γίνεται περισσότερο εμφανείς σε υψηλές θερμοκρασίες (Σχ. 3.2.2.).

Ανεξάρτητα από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν για την βακτηριακή προσκόλληση και τον σχηματισμό βιοϋμενίων, η απολύμανση των κουπονιών AA με ζεστό νερό (60°C, 20 λεπτά) είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση του πληθυσμού του παθογόνου στις

επιφάνειες, λιγότερο από $1 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ ($P > 0.05$; Σχ. 3.2.2.α, β, Taormina και Dorsa, 2007). Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι διαδικασίες που χρησιμοποιούν ζεστό νερό για την απολύμανση μικρών επιφανειών ΑΑ, όπως είναι τα μαχαίρια, δεν μπορεί να θεωρηθεί σαν ικανοποιητική μέθοδος απολύμανσης, αν δεν ακολουθείται από περαιτέρω χημική απολύμανση. Αν και οι υπάρχουσες διαδικασίες που συνίσταται για την εξυγίανση μικρών εργαλείων ΑΑ περιλαμβάνουν την εμβάπτιση σε τρεχούμενο νερό $\geq 82^\circ\text{C}$ για απροσδιόριστο χρονικό διάστημα (SCVMPH 2001), ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι η χρήση χαμηλότερων θερμοκρασιών ($60-72^\circ\text{C}$) για περισσότερο χρόνο μπορεί να έχουν αντίστοιχα αποτελέσματα στην θανάτωση των προσκολλημένων βακτηρίων (π.χ. $>3 \log$ μείωση, Eustace et al., 2007, Goulter et al., 2008). Η ασυμφωνία μεταξύ των διαφορετικών μελετών πιθανώς να αντανακλά τις διαφορές θερμοανθεκτικότητας των μικροοργανισμών και των στελεχών που χρησιμοποιούνται, καθώς και του είδους των κυττάρων (προσκολλημένα ή πλαγκτονικά). Συγκεκριμένα, τα προσκολλημένα κύτταρα είναι πιο ανθεκτικά στην θερμότητα από τα πλαγκτονικά, ενώ άλλες συνθήκες που μπορούν να αυξήσουν την θερμοανθεκτικότητα ενός βακτηρίου περιλαμβάνουν τις προηγούμενες συνθήκες ανάπτυξης ή έκθεσης σε υποθανάτιες καταπονήσεις, όπως η θερμοκρασία και τα οξέα και τέλος η στελεχειακή παραλλακτικότητα (Doyle et al., 2001, Sergelidis και Abraham, 2009).

Σε αντίθεση με την χρήση ζεστού νερού, η επεξεργασία των κουπονιών με διάλυμα υπεροξικού οξέως (2%), μείωσε σημαντικά τον αριθμό των προσκολλημένων κυττάρων, η οποία μείωση αυξάνονταν με την αντίστοιχη αύξηση του χρόνου εφαρμογής του απολυμαντικού. Συγκεκριμένα, η έκθεση των κουπονιών ΟΑ στο PAA (2%) για 1 λεπτό μείωσε τον αριθμό των βιοϋμενίων περί τους 2 με $2.9 \log \text{CFU}/\text{ml}$ (Σχ. 3.2.2.). Η μείωση αυτή ήταν πιο εμφανείς στα βιοϋμένια που σχηματίστηκαν στους 5°C από αυτά των 20°C (Σχ. 3.2.2.α, β). Η επεξεργασία των κουπονιών με PAA (2%) για 2 λεπτά μείωσε το πληθυσμό του παθογόνου στις επιφάνειες κάτω από το όριο αρίθμησης ($0.3 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$) στα κουπόνια που επωάστηκαν στους 5°C , ενώ μη σημαντικές μεταβολές παρατηρήθηκαν για τα κουπόνια που επωάστηκαν στους 20°C . Όταν όμως ο χρόνος έκθεσης των κουπονιών στο PAA (2%) αυξήθηκε στα 6 λεπτά, ο πληθυσμός βιοϋμενίου της *L. monocytogenes* στα κουπόνια μετρήθηκε κάτω από το όριο αρίθμησης, ανεξάρτητα από τις συνθήκες σχηματισμού του (Σχ. 3.2.2.). Τα αποτελέσματα αυτά απεικονίζουν την ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση του PAA στη *L. monocytogenes*. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για την μικτή καλλιέργεια *L. monocytogenes/Pseudomonas* sp. όταν εκτέθηκε σε διάφορους απολυμαντές, συμπεριλαμβανομένου του PAA (20, 80 mg/l, Fatemi και Frank, 1999) και για βιοϋμένια της *L. monocytogenes* που σχηματίστηκαν παρουσία υπολειμμάτων κρέατος και εκτέθηκαν σε 2.600 ppm διάλυμα υπεροξικού και υπεροξεοκτανικού οξέως (Somers και Lee Wong, 2004). Η αντιμικροβιακή ιδιότητα του υπεροξικού οξέως έχει συνδεθεί με την παραγωγή των



Σχήμα 3.2.2. Πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων (βιοϋμένια) της *L. monocytogenes* σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα, σχηματισμένων σε TSBYE με τρεις συγκεντρώσεις NaCl; 0.5% (■), 7.5% (■) και 9.5% (■), μετά από παραμονή στους (α) 5°C για 19 ημέρες και (β) στους 20°C για 12 ημέρες, ως είχαν (Μάρτυρες), μετά από θερμική επεξεργασία (60°C, 20 λεπτά) και μετά από απολύμανση με υπεροξικό οξύ (PAA 2%) για 1, 2, 3 και 6 λεπτά. Οι μέσες τιμές μεταξύ κάθε επεξεργασίας που μοιράζονται τουλάχιστον ένα γράμμα δεν είναι στατιστικώς διαφορετικές ($P \geq 0.05$). ΔΑ: Δεν Ανιχνεύτηκαν (<0.30 log CFU/cm²)

υπεροξικών ανιόντων και την απότομη απελευθέρωση ελευθέρων ριζών υδροξυλίου (OH⁻), οι οποίες μπορούν να τραυματίσουν το βακτηριακό DNA και να προκαλέσουν τον θάνατο του κυττάρου (Clapp et al., 1994). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η θερμοκρασία, τα υπολείμματα τροφίμων και η ηλικία του βιοϋμενίου μπορούν να επηρεάσουν την ανθεκτικότητά του έναντι των απολυμαντών (Storforth et al., 2002, Gram et al., 2007, Mai και Corner, 2007). Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι βιοϋμένια της *L. monocytogenes* που σχηματίστηκαν στους 20°C είναι πιο ανθεκτικά στο PAA από αυτά που σχηματίστηκαν στους 5°C, ενώ η συγκέντρωση άλατος στο υπόστρωμα ανάπτυξης και προσκόλλησης δεν είχε σημαντικό αποτελέσματα στην επιβίωση έναντι του PAA. Τα αποτελέσματα στην επιβίωση της *L. monocytogenes* στις επιφάνειες AA μετά από επεξεργασία με ζεστό νερό ή με χημικούς απολυμαντές αποκαλύπτουν το μέγεθος του κινδύνου μιας ελλιπούς διαδικασίας εξυγίανσης. Μπορούν εν μέρει να εξηγήσουν τη μακρόχρονη επιβίωση του παθογόνου στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων. Μη ικανοποιητικός καθαρισμός και απολύμανση του βιομηχανικού εξοπλισμού, λόγω μειωμένης επαφής των απολυμαντικών με τις επιφάνειες ή μικρότερης διάρκειας επαφής από αυτή που απαιτείται (Pan et al., 2006, Skandamis et al., 2009), μπορεί να οδηγήσει στην συσσώρευση κυττάρων της *L. monocytogenes* στις επιφάνειες, με συνέπεια να αυξηθεί η δυσκολία της ολοκληρωτικής απομάκρυνσής τους (Shi and Zhu, 2009).

Η δεύτερη πειραματική διαδικασία της παρούσας εργασίας στόχευσε στην μελέτη της επίδρασης του pH και της οξεοανθεκτικότητας των βιοϋμενίων *L. monocytogenes* στην ανθεκτικότητά τους έναντι εξυγίανσης με νερό, χλωρίνη (Cl⁻), υπεροξικό οξύ (PAA) και ενώσεις του τεταρτοταγούς αμμωνίου (QACs). Ο πληθυσμός των προσκολλημένων MO (μη οξεοανθεκτικών) κυττάρων *L. monocytogenes* στις επιφάνειες AX κυμάνθηκε μεταξύ 4.2 και 4.6 log CFU/cm² σε όλη την διάρκεια επώασης στους 4°C, ανεξαρτήτως από το pH του υποστρώματος (Σχ. 3.2.3.α και γ). Ομοίως, ο αριθμός των προσκολλημένων OA (οξεοανθεκτικών) κυττάρων *L. monocytogenes* ήταν μεταξύ των 3.6 και 4.6 log CFU/cm² στα κουπόνια AX που είχαν επωαστεί για 12 ημέρες σε pH 5.0 ή 7.0 (Σχ. 3.2.3.β και δ). Τα πλαγκτονικά MO κύτταρα έφτασαν τους 8.4 και 9 log CFU/ml σε pH 5.0 και 7.0 αντίστοιχα, ενώ τα πλαγκτονικά OA κύτταρα την 12^η ημέρα μετρήθηκαν στους 9.2 log CFU/ml στο TSBYE με pH 7.0 και σταθερά στους 8 log CFU/ml στο TSBYE με pH 5.0 (Σχ. 3.2.3.). Σε γενικές γραμμές δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση της οξεοανθεκτικότητας στην προσκόλληση και τον σχηματισμό βιοϋμενίων *L. monocytogenes* στα κουπόνια AX (Storforth et al., 2002, Chorianopoulos et al., 2011). Εντούτοις, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες (Chorianopoulos et al., 2011), το όξινο περιβάλλον (pH 5) επηρέασε ανασταλτικά τον σχηματισμό των οξεοανθεκτικών προσκολλημένων κυττάρων (Σχ. 3.2.3.δ), με δεδομένο την μείωση του πληθυσμού τους, πιθανώς λόγω την επίδρασης του pH σε διαφορετικά στάδια σχηματισμού (σχηματισμός μικροαποικίας, ωρίμαση κ.α.) ενός βιοϋμενίου (Poimenidou et al., 2009).

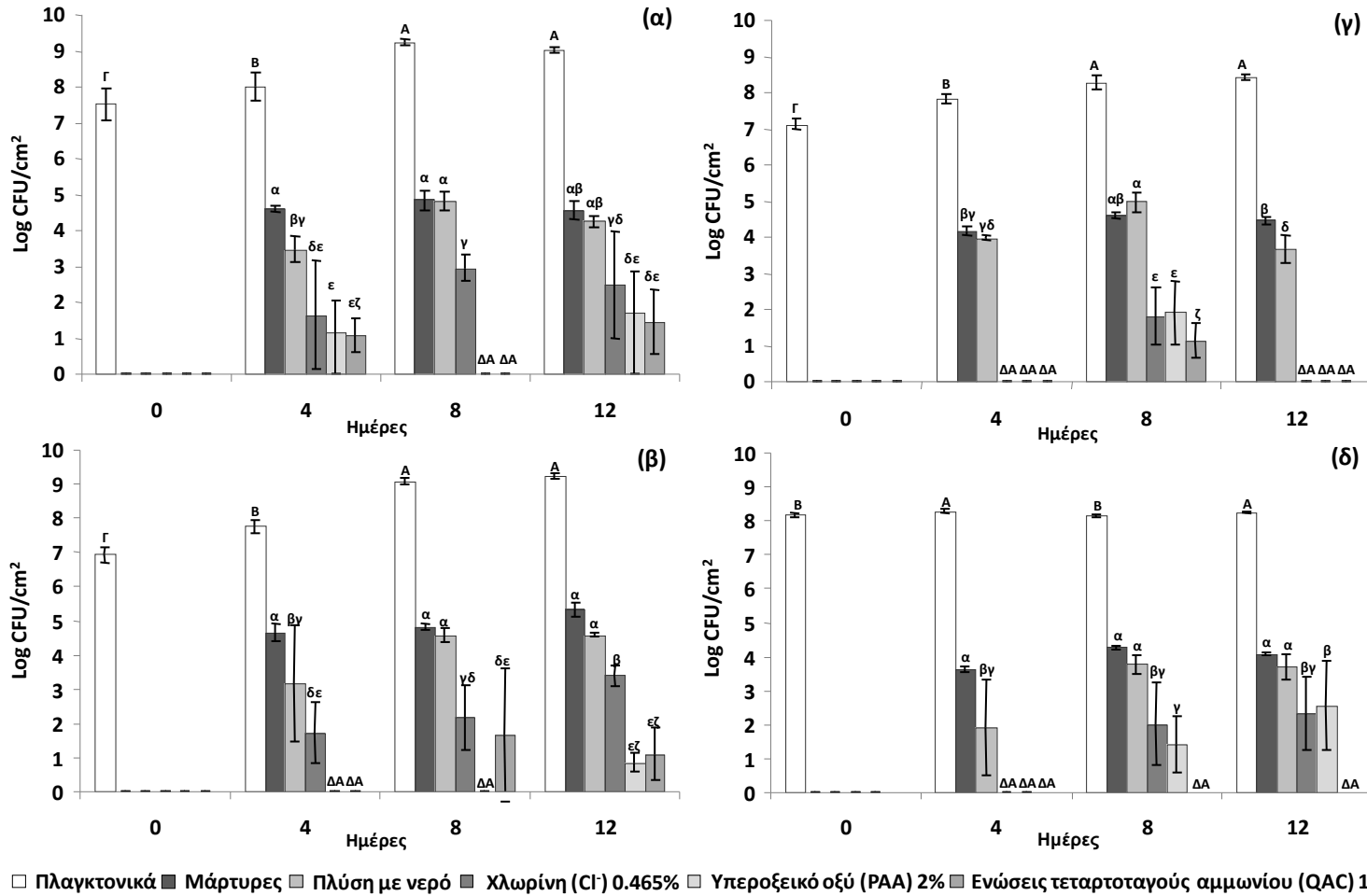
Όσον αφορά την ανθεκτικότητα των προσκολλημένων κυττάρων στους απολυμαντές, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση ($<1 \log \text{ CFU/cm}^2$) του πληθυσμού των βιοϋμενίων *L. monocytogenes* έπειτα από πλύση με νερό (25°C για 6 λεπτά) των κουπονιών, σε σχέση με τους μάρτυρες στις περισσότερες από τις εξεταζόμενες περιπτώσεις (Σχ. 3.2.3.). Αντιθέτως, η επεξεργασία των κουπονιών AX με χλωρίνη (0.465%) συντέλεσε στην μείωση των βιοϋμενίων του παθογόνου κατά 1-3 $\log \text{ CFU/cm}^2$, ανεξαρτήτως του υποστρώματος σχηματισμού τους (Σχ. 3.2.3.). Στην περίπτωση αυτή, το ενδιαφέρον έγκειται στην αύξηση της ανθεκτικότητας των βιοϋμενίων έναντι της χλωρίνης με την αύξηση του χρόνου σχηματισμού τους (Frank και Koffi, 1990). Σύμφωνα με το Σχ. 3.2.3., τα προσκολλημένα κύτταρα που επιβιώνουν έπειτα από την εφαρμογή της χλωρίνης είναι αρκετά υψηλότερα στις ημέρες 8 και 12, από την ημέρα 4 (κατά την οποία στις περισσότερες περιπτώσεις ήταν μη ανιχνεύσιμα) ή δεν επηρεάζονταν καθόλου από την εφαρμογή. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση της ανθεκτικότητας των βιοϋμενίων έναντι των καταπονήσεων από το υπόστρωμα (όξινη καταπόνηση, χαμηλό pH) και την καλύτερη προσκόλλησή τους στις επιφάνειες AX μετά την 4^η ημέρα επώασης (Mai και Conner, 2007). Έχει επίσης αναφερθεί ότι τα προσκολλημένα κύτταρα διαθέτουν αυξημένη ανθεκτικότητα στην χλωρίνη σε σχέση με τα πλαγκτονικά, η οποία εξαρτάται από την συγκέντρωση του διαλύματος, τον χρόνο έκθεσης και την διάρκεια σχηματισμού του βιοϋμενίου (Frank και Koffi, 1990, Fatemi και Frank, 1999). Ακόμα ένας παράγοντας που επηρεάζει την ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων στην χλωρίνη είναι το pH του διαλύματος (Bremer et al., 2002, Naitali et al., 2009), με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε τιμές $\text{pH} < 8.0$ (Bremer et al., 2002). Μπορεί επομένως, η μειωμένη αποτελεσματικότητα της χλωρίνης, που προέκυψε από τα αποτελέσματα του πειράματος να εξηγηθεί από την υψηλή αλκαλικότητα του διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε ($\text{pH} 10.3$). Παρά την γνώση των προηγούμενων συμπερασμάτων, η επιλογή των διαλυμάτων έγινε με βάση τον στόχο της παρούσας μελέτης, ο οποίος ήταν η προσομοίωση κλασικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων, όπως διατίθενται και η απευθείας διάλυση εμπορικής χλωρίνης στο νερό χωρίς κάποια ρύθμιση του pH του διαλύματος.

Οι παράγοντες που επηρέασαν την μείωση του πληθυσμού των βιοϋμενικών κυττάρων έπειτα από την επεξεργασία των κουπονιών AX με τα διαλύματα PAA (2%) και QAC (1%) για 6 λεπτά, ήταν το είδος του απολυμαντικού καθώς και οι συνθήκες σχηματισμού των βιοϋμενίων (ο χρόνος, το pH του μέσου και η αρχική καλλιέργεια). Σε γενικές γραμμές, ο πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων της *L. monocytogenes* μειώθηκε κατά 1.5-4.8 $\log \text{ CFU/cm}^2$, ενώ το QAC φάνηκε να έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι των βιοϋμενίων του παθογόνου σε σχέση με το διάλυμα του υπεροξικού οξέος (PAA) (Σχ. 3.2.3.). Στις περισσότερες από τις εξεταζόμενες περιπτώσεις, ο αριθμός των βιοϋμενίων που επιβίωναν της απολύμανσης αυξήθηκε με την αύξηση της περιόδου

επώασης στους 4°C (Σχ. 3.2.3.). Συγκεκριμένα, την τέταρτη μέρα επώασης όλα τα είδη προσκολλημένων κυττάρων, εκτός των ΜΟ κυττάρων σε pH 7.0 βρέθηκαν, μετά από την εφαρμογή PAA και QAC κάτω από το όριο αρίθμησης της μεθόδου (0.3 log CFU/cm²). Για την όγδοη ημέρα επώασης, παρατηρήθηκαν περισσότερες περιπτώσεις επιβίωσης των βιοϋμενίων, ενώ μετά από 12 ημέρες παραμονής στους 4°C, σχεδόν όλες οι εξεταζόμενες περιπτώσεις (εκτός των ΜΟ κυττάρων σε pH 5.0) παρέμειναν σε μετρήσιμες τιμές (1-2.5 log CFU/cm²) μετά την εφαρμογή των διαλυμάτων (Σχ. 3.2.3.).

Μελετώντας την επίδραση του pH του μέσου σχηματισμού των βιοϋμενίων, στην μετέπειτα ανθεκτικότητά τους έναντι του PAA, τα ΜΟ βιοϋμένια που σχηματίστηκαν σε pH 7.0 βρέθηκαν πιο ανθεκτικά από τα αντίστοιχα που σχηματίστηκαν σε pH 5.0, ενώ το αντίθετο συνέβη με τα ΟΑ βιοϋμένια (Σχ. 3.2.3.α-δ). Ομοίως, μελετώντας την επίδραση της προϊστορίας των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχηματισμό των βιοϋμενίων, στην μετέπειτα ανθεκτικότητα των τελευταίων έναντι της επεξεργασίας τους με PAA, τα ΜΟ βιοϋμένια βρέθηκαν περισσότερο ανθεκτικά από τα αντίστοιχα ΟΑ βιοϋμένια (μείωση >4.4 log CFU/cm², και τα δύο σχηματισμένα σε pH 7.0) (Σχ. 3.2.3.γ, δ). Αντίθετα, σε μέσο σχηματισμού με pH 5.0 τα οξεοανθεκτικά βιοϋμένια εμφάνισαν καλύτερη ανθεκτικότητα από τα αντίστοιχα μη οξεοανθεκτικά, η οποία αυξήθηκε με τον χρόνο επώασης (1.5 log CFU/cm² την 8^η ημέρα και >2.5 log CFU/cm² την 12^η) (Σχ. 3γ, δ). Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Storph et al. (2002), η οξεοανθεκτικότητα των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχηματισμό των βιοϋμενίων σε όξινο μέσο (pH 5) επηρέασε σημαντικά την ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων έναντι της απολύμανσης με PAA (2%). Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι στις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες που έλαβε χώρα ο σχηματισμός και η παρατεταμένη έκθεση των ΟΑ βιοϋμενίων (pH 5, 4°C), η οξεοανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* διατηρήθηκε πιθανώς λόγω της δράσης των αντλιών πρωτονίων (Booth, 1985, Shabala et al., 2002, Samelis et al., 2004), η οποία εν συνεχεία εισήγαγε διασταυρούμενη προστασία στα βιοϋμένια, κατά την μετέπειτα απολύμανσή τους με το όξινο διάλυμα του υπεροξικού οξέος (pH 3.6, Lou και Yousef, 1997, Greenacre και Brockhurst, 2006, Tiganitas et al., 2009, Chorianopoulos et al., 2011).

Σχετικά με την ανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* μετά την εφαρμογή 1% QAC, και τα ΜΑ και τα ΟΑ κύτταρα της *L. monocytogenes* που προσκολλήθηκαν σε pH 7.0 παρουσίασαν επιβίωση στους 2-3 log CFU/cm², η οποία αυξήθηκε με τον χρόνο, ειδικά στα ΜΟ κύτταρα (Σχ. 3.2.3.α και β). Αντίθετα, ο πληθυσμός του παθογόνου και από τα δύο είδη κυττάρων που σχημάτισαν βιοϋμένιο σε pH 5.0 εμφανίστηκαν κάτω από όριο αρίθμησης της μεθόδου, μετά από την εφαρμογή του QAC (Σχ. 3.2.3.γ και δ). Οι παρατηρήσεις αυτές μπορεί να σχετίζονται με την έκθεση των κυττάρων στην σταδιακή μείωση του pH από την τιμή 7.0 στο 4.8, κατά την διάρκεια της αύξησής τους στο θρεπτικό



Σχήμα 3.2.3. Πληθυσμός των πλαγκτονικών και βιοϋμενικών οξεοανθεκτικών (OA, β , δ) και μη (MO, α , γ) κυττάρων της *L. monocytogenes* σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα σχηματισμένων σε TSBYE με pH 7.0 (α , β) ή pH 5.0 (γ , δ) στους 4°C, ως είχαν (Μάρτυρες), ή μετά από επεξεργασία με νερό (25°C), χλωρίνη (Cl⁻, 0.465%), υπεροξικό οξύ (PAA, 2%) και ενώσεις του τεταρτοταγούς αμμωνίου (QAC, 1%), για 6 λεπτά. Οι μέσες τιμές των πλαγκτονικών κυττάρων που μοιράζονται τουλάχιστον ένα κοινό κεφαλαίο ή των βιοϋμενίων που μοιράζονται τουλάχιστον ένα πεζό γράμμα δεν είναι στατιστικώς διαφορετικές ($P \geq 0.05$). ΔΑ: Δεν Αριθμήθηκαν (<0.30 log CFU/cm²).

υπόστρωμα TSBYE+G (προσαρμογή στο οξύ), ακολουθούμενη από την μεταφορά τους σε ουδέτερο (7.0) ή όξινο pH (5.0). Οι διαδοχικές μεταφορές σε υποστρώματα διαφορετικών pH ενδεχομένως να έθεσε υψηλό ενεργειακό εμπόδιο στα κύτταρα, κατά την προσπάθειά τους να διατηρήσουν την ομοιοστάση τους, και συνεπώς να αύξησε την ευαισθησία τους στην απολύμανση (Lou και Yousef, 1997, Stopforth et al., 2002, Tiganitas et al., 2009).

Ομοίως, έχει παρατηρηθεί ότι οξεοανθεκτικά κύτταρα που εμβολιάστηκαν πάνω σε φέτες κρέατος, οι οποίες στην συνέχεια εκτέθηκαν σε όξινες μαρινάδες και ξήρανση, ήταν πιο ευαίσθητα από τα μη οξεοανθεκτικά κύτταρα (Calicioglu et al., 2002, 2003). Επομένως, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων στους απολυμαντές είναι αυξημένη όταν το pH του απολυμαντή είναι παρόμοιο με το pH του μέσου σχηματισμού του βιοϋμενίου και το αντίθετο. Σε ανάλογα συμπεράσματα κατέληξαν και μελέτες οξεοανθεκτικότητας βιοϋμενίων που σχηματίστηκαν σε νερό (pH 6.8-7.0) και διάλυμα όξινων υπολειμμάτων καθαρισμού κρέατος (pH 3.1-4.7). Στη μελέτη αυτή, οι Samelis et al. (2004) συμπέραναν ότι η έκφραση της αυξημένης οξεοανθεκτικότητας από ΟΑ κύτταρα του *Escherichia coli* O157:H7 μπορεί να διατηρηθεί ή να αυξηθεί σε όξινα διαλύματα σε τιμές pH (>4.5) και να επιτρέψει παρατεταμένη επιβίωση στους 10°C. Επομένως, η επιλογή κατάλληλου απολυμαντή θα μπορούσε να εξαρτηθεί από τις εσωτερικές ιδιότητες των προϊόντων που αφήνουν υπολείμματα στις επιφάνειες, ενώ η εναλλαγή των όξινων και των αλκαλικών απολυμαντικών θα μείωνε τον κίνδυνο αύξησης της ανθεκτικότητας των βιοϋμενίων.

3.2.4. Συμπεράσματα

Από την στιγμή που τα βιοϋμένια σχηματίζονται σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων, μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα, και σαν συνέπεια, η ανθεκτικότητά τους στην απολύμανση μπορεί να αυξάνεται με τον χρόνο (Pan et al., 2006, Aarnisalo et al., 2007). Βάση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, τα βιοϋμένια της *L. monocytogenes* έχουν την δυνατότητα να επιβιώνουν για μακροχρόνια περίοδο ενάντια στην θερμική επεξεργασία και την χημική απολύμανση, ανάλογα με την θερμοκρασία περιβάλλοντος, το είδος, τη συγκέντρωση και τον χρόνο εφαρμογής του απολυμαντή και την φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων (Naitali et al., 2009). Η παρακολούθηση και καταγραφή των αποτελεσμάτων του καθαρισμού και της απολύμανσης σε τακτά διαστήματα, είναι σημαντική λόγω της δυνατότητας τροποποίησης της διαδικασίας προς τα βέλτιστα αποτελέσματα. Επιπλέον, επειδή η ύπαρξη βιοϋμενίων μπορεί, εν μέρει, να εξηγήσει την παρουσία της *L. monocytogenes* στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων (Møretrø and Langsrud, 2004), ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων μας με άλλες πληροφορίες (π.χ. από μεθόδους ταχείας ανίχνευσης, μοριακές μεθόδους και μαθηματικά μοντέλα) μπορεί να βοηθήσει στην βιοιχνηλασιμότητα (Barker et al., 2009). Αυτό είναι εφικτό συνδέοντας την παρουσία της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα ή στο περιβάλλον επεξεργασίας και κάποιο συγκεκριμένο σημείο, με την "προϊστορία" των κυττάρων. Ο όρος "προϊστορία" μεταξύ άλλων, μπορεί να συμπεριλαμβάνει την επιβίωση λόγω ανεπαρκούς απολύμανσης, ή την δημιουργία ισχυρού βιοϋμενίου. Περαιτέρω έρευνα στους παράγοντες που μπορούν να τροποποιήσουν την ανθεκτικότητα του βιοϋμενίου της *L. monocytogenes* έναντι της απολύμανσης, μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση του φαινομένου και να διευκολύνει τον σχηματισμό καινούριων στρατηγικών καθαρισμού και απολύμανσης, αυξάνοντας έτσι την ασφάλεια των τροφίμων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΟΡΙΩΝ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *Listeria monocytogenes* ΣΕ ΥΓΡΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΚΑΙ ΣΕ ΓΑΛΑ ΚΑΤΑ ΤΑ ΠΡΩΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΤΥΡΟΚΟΜΗΣΗΣ

Η πιθανότητα ανάπτυξης της *L. monocytogenes* όταν βρεθεί σε ένα τρόφιμο εξαρτάται άμεσα από τις ιδιότητες του τροφίμου και του περιβάλλοντός του, καθώς και από την φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων του παθογόνου. Οι σημαντικότερες και συνηθέστερες παράμετροι που εξετάζονται είναι η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, η οξύτητα και η αλατότητα του τροφίμου, ενώ σε δεύτερο επίπεδο επίδραση στην πιθανότητα ανάπτυξης του μικροοργανισμού έχουν η ενδογενής χλωρίδα, η υγρασία και η σύσταση της ατμόσφαιρας του περιβάλλοντος. Επιπλέον, η προϊστορία της *L. monocytogenes* και οι τυχόν διαφοροποιήσεις που έχει εισάγει στην φυσιολογία των κυττάρων του ενδέχεται να μετακινήσουν τα όρια αύξησής του προς περισσότερο ευνοϊκές ή δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Προς μια πιο ολοκληρωμένη θεώρηση της συμπεριφοράς του παθογόνου συναρτήσε των ποικίλων παραμέτρων που την επηρεάζουν πραγματοποιήθηκαν τα δύο πειράματα που ακολουθούν.

4.1 Εκτίμηση της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης κυττάρων της *Listeria monocytogenes* σε αιώρηση, αποκολλημένων από βιοϋμένια ή προσκολλημένων σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα, σε σχέση με το pH και το NaCl

International Journal of Food Microbiology 145 (2011), S53–S60

4.1.1 Εισαγωγή

Η επιμόλυνση των τροφίμων μετά την επεξεργασία τους με τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* έχει αναγνωριστεί παγκοσμίως σαν ο κύριος παράγοντας που ευθύνεται για τα κρούσματα λιστερίωσης (Wilks et al., 2006, Gandhi and Chikindas, 2007). Τα κύτταρα της *L. monocytogenes* έχουν την ικανότητα να προσκολλούνται στις επιφάνειες που απαντώνται στην γραμμή παραγωγής και αποθήκευσης των τροφίμων, ιδιαίτερα σε σημεία δυσπρόσιτα κατά τον καθαρισμό και την απολύμανση (Pan et al., 2006, Ribeiro et al., 2006). Επιπλέον, τα προσκολλημένα κύτταρα ενδέχεται να επιδείξουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες σε σχέση με τα κύτταρα σε αιώρηση, να παραμένουν στις επιφάνειες για χρόνια (Pan et al., 2006, Gandhi and Chikindas, 2007), και να αποτελούν σταθερή πηγή επιμόλυνσης των προϊόντων (Den Aantrekker et al., 2003, Leite et al., 2006, Wilks, et al., 2006). Ο προσδιορισμός των ορίων ανάπτυξης

και η διερεύνηση της φυσιολογίας των βιοϋμενίων της *L. monocytogenes*, καθώς και των αποκολλημένων κυττάρων από τα βιοϋμένια αυτά, μπορεί να βοηθήσει στην αποτελεσματική εφαρμογή του συστήματος HACCP (Sharma και Anand, 2002) στη βιομηχανία τροφίμων.

Μια στρατηγική που χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια για τον έλεγχο της ανάπτυξης των παθογόνων στα τρόφιμα είναι η τεχνολογία των εμποδίων, στην οποία εφαρμόζονται δύο ή περισσότεροι παράγοντες ήπιας καταπόνησης στη θέση μια δριμύτερης καταπόνησης (McMeekin et al., 2000). Το αποτέλεσμα των ήπιων καταπονήσεων στο ενδεχόμενο έναρξης της ανάπτυξης του παθογόνου, στις εκάστοτε συνθήκες, περιγράφεται από τα μοντέλα πιθανοτήτων (probability models, Tienungoon et al., 2000, Gysemans et al., 2007). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολυάριθμα μοντέλα πιθανοτήτων που περιγράφουν την μεσεπιφάνεια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης των παθογόνων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου της *L. monocytogenes*, σε σχέση με ποικίλες συνθήκες (Presser et al., 1998, Masana και Baranyi, 2000, Tienungoon et al., 2000, Le Marc et al., 2002, Koutsoumanis et al., 2004, Skandamis et al., 2007, Vermeulen et al., 2007b). Τα περισσότερα από αυτά επικεντρώνονται στην επίδραση των συνήθως χρησιμοποιούμενων εμποδίων (π.χ. pH, a_w , θερμοκρασία και συντηρητικά) στα πλαγκτονικά (σε αιώρηση) κύτταρα της *L. monocytogenes* ή σε κύτταρα που αυξάνονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ή σε επιφάνειες τροφίμων (Koutsoumanis et al., 2004, Mataragas et al., 2006). Αντίθετα, υπάρχουν περιορισμένα ποσοτικά δεδομένα στην πιθανότητα ανάπτυξης κυττάρων της *L. monocytogenes*, ιδιαίτερα σε χαμηλούς αριθμούς (1-10 κύτταρα), προσκολλημένων ή αποκολλημένων από ανοξειδωτες επιφάνειες. Τέτοιου είδους πληροφορία είναι μεγάλης σημασίας για την βιομηχανία τροφίμων, καθώς η προσκόλληση των κυττάρων στις επιφάνειες ενδέχεται να επηρεάσει την μετέπειτα συμπεριφορά τους στα τρόφιμα (Tremoulet et al., 2002, Gandhi και Chikindas, 2007). Πιο συγκεκριμένα, ενδέχεται οι μηχανισμοί που ευθύνονται για την προσκόλληση των κυττάρων στις επιφάνειες (Garrett et al., 2008, Keskinen et al., 2008) και την αυξημένη τους ανθεκτικότητα στους αντιμικροβιακούς παράγοντες, να επιδρούν και στο εύρος των περιβαλλοντικών συνθηκών που υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* ή ακόμα να μετατοπίζουν την μεσεπιφάνεια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης σε πιο δυσμενείς συνθήκες, σε σχέση με την αντίστοιχη των κυττάρων σε αιώρηση.

Μεταβολές στη φυσιολογία της *L. monocytogenes* μπορεί να επηρεάσουν την ικανότητα του να αυξάνεται ανάμεσα σε διαδοχικά στάδια της αλυσίδας τροφίμων. Η κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν τις αλλαγές μπορεί να οδηγήσει σε βελτιωμένη και ακριβέστερη βιοιχνηλασιμότητα, προσδιορίζοντας την πηγή της επιμόλυνσης. Ο κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης της προσκόλλησης και αποκόλλησης από επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα, στη μεσεπιφάνεια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης της *L. monocytogenes* και η σύγκρισή της με την αντίστοιχη των πλαγκτονικών κυττάρων στις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες.

4.1.2. Υλικά και μέθοδοι

4.1.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Στη παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η μεσεπιφάνεια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης (**A/MA**) των τριών φυσιολογικών καταστάσεων των κυττάρων της *L. monocytogenes*: προσκολλημένα κύτταρα ή βιοϋμένια (**BK**), αποκολλημένα κύτταρα (**AK**) και πλαγκτονικά κύτταρα (**ΠΚ**) στους 10°C, σε σχέση με το pH και την a_w του περιβάλλοντος. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε ένας πολυπαραγοντικός σχεδιασμός έξι τιμών pH (6.6, 6.3, 5.9, 5.6, 5.2 και 4.8), πέντε τιμών a_w (0.996, 0.982, 0.977, 0.966 και 0.955), και δεκατριών εμβολίων από τρία είδη κυττάρων της *L. monocytogenes* (BK × 1 εμβόλιο, AK × 4 εμβόλια και ΠΚ × 8 εμβόλια). Η επιλογή των τιμών pH και a_w σε ένα σχετικά μεγάλο εύρος και όχι κοντά στα όρια ανάπτυξης του παθογόνου ($a_w < 0.97$ και $pH < 5.6$), έγινε με σκοπό να συμπεριληφθούν τα προσκολλημένα κύτταρα (βιοϋμένια) στον σχεδιασμό και με την παραδοχή ότι στους 10°C η μεσεπιφάνεια A/MA του μικροοργανισμού ενδέχεται να κινηθεί προς υψηλότερες τιμές pH και a_w από την αντίστοιχη των 30°C. Σαν μέσο ανάπτυξης της *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκε το μη εκλεκτικό υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSBYE (εμπορικό pH 7.2 και 0.5% NaCl), τροποποιημένο ανάλογα στις επιθυμητές περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι τιμές pH των υποστρωμάτων τροποποιήθηκαν με προσθήκη 0.1-0.6 ml γαλακτικού οξέως (85% w/w, DL-Lactic acid, Sigma-Aldrich Ltd., Life Science Chemilab S.A., Αθήνα, Ελλάδα) και ελάχιστης ποσότητας 10N NaOH (όταν κρίνονταν απαραίτητο, Sodium Hydroxide pellets, Panreac, Ισπανία), ενώ οι τιμές a_w με την προσθήκη 0, 3, 4.5, 6 και 8 g NaCl σε 100 ml υποστρώματος (τελικός όγκος). Η επιλογή του γαλακτικού οξέως και του χλωριούχου νατρίου για την ρύθμιση του pH και της αλατότητας, αντίστοιχα, βασίστηκε στο γεγονός ότι το γαλακτικό οξύ είναι το κατεξοχήν ασθενές οξύ που απαντάται στα γαλακτοκομικά προϊόντα, ενώ ένα από τα κύρια στάδια της τεχνολογίας τους είναι η προσθήκη άλμης ή η ξηρή αλάτιση. Επομένως, η εμβάπτιση των επιφανειών ανοξειδωτού χάλυβα στα υποστρώματα αποσκοπούσε στην προσομοίωση της επιμόλυνσης βιομηχανικών επιφανειών στις οποίες παρασκευάζονται προϊόντα, που διαθέτουν στην σύστασή τους γαλακτικό οξύ και NaCl. Όλες οι τιμές pH και a_w , που αναφέρονται ανωτέρω, μετρήθηκαν με ηλεκτρόδιο pH (pH 691, Metrohm, Zofingen, Ελβετία) και ενεργόμετρο (HygroLab, Rotronic, Bassersdorf, Ελβετία) αντίστοιχα, μετά την αποστείρωσή τους (121°C, 15 min). Τα δεκατρία εμβόλια της *L. monocytogenes* που μελετήθηκαν είχαν ως εξής: Πλαγκτονικά κύτταρα σε οκτώ αρχικές συγκεντρώσεις (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 και 10^8 CFU/ml), αποκολλημένα κύτταρα σε τέσσερις αρχικές συγκεντρώσεις (10^1 , 10^2 , 10^3 και 10^4 CFU/ml), και προσκολλημένα σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα κύτταρα σε συγκέντρωση 10^4 με 10^5 CFU/cm². Η θερμοκρασία (10°C) επιλέχτηκε σαν μια μέση θερμοκρασία των χώρων παρασκευής και αποθήκευσης των τροφίμων.

4.1.2.2. Βακτηριακά στελέχη και προετοιμασία καλλιέργειας

Μίγμα από τρία στελέχη της *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα της παρούσας μελέτης. Το μίγμα αποτελούταν από το στέλεχος 6179 (ορότυπος 1/2a) απομονωμένο από τυρί, το στέλεχος C₅ (ορότυπος 4b) απομονωμένο από περιβάλλον τυροκομείου και το στέλεχος ScottA (ορότυπος 4b, επιδημικό στέλεχος) απομονωμένο από νοσούντα. Τα στελέχη επιλέχθηκαν σύμφωνα με την προϋστορία τους, έτσι ώστε να καλύπτουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερο εύρος αποκρίσεων στις καταπονήσεις του πειράματος (χαμηλό pH, a_w , Lianou et al., 2006, Kagkli et al., 2009). Οι αποθηκευμένες καλλιέργειες του κάθε στελέχους διατηρούνταν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSBYE στους -22°C. Κάθε στέλεχος ενεργοποιήθηκε, ανεξάρτητα από τα υπόλοιπα, με την μεταφορά 0.1 ml της κατεψυγμένης καλλιέργειας σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος TSBYE και επώαση των τελευταίων στους 37°C για 24 ώρες. Η διαδικασία επαναλήφθηκε με την εκ νέου μεταφορά 0.1 ml από την καλλιέργεια μιας ημέρας σε 10 ml TSBYE και εκ νέου επώαση στους 37°C για 18 ώρες, στην διάρκεια των οποίων, όπως είχε υπολογιστεί από προκαταρκτικά πειράματα, ο μικροοργανισμός βρίσκεται στην στατική φάση. Ακολούθησε η διαδικασία της έκπλυσης των κυττάρων αρχικά με φυγοκέντρηση της καλλιέργειας (3600 x g for 15 min at 4°C; Heraeus Instruments Megafuge 1.0 R, Buckinghamshire, Αγγλία), απόρριψη του TSBYE και διπλή επαναίωρηση τους σε 10 ml αλατούχου διαλύματος MRD με ενδιάμεση φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια 2 ml από κάθε μία από τις καλλιέργειες (10⁹ CFU/ml) ενώθηκαν σε στείρο δοκιμαστικό σωλήνα δημιουργώντας το τυποποιημένο μίγμα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα.

Το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε περιέχει στην σύνθεση του 0.25% γλυκόζη, η οποία αναμενόταν να εισάγει μερική οξεοανθεκτικότητα στα κύτταρα της *L. monocytogenes* λόγω του καταβολισμού της από αυτά (Buchanan et al., 1994, Simpson et al., 2008). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται στη στατική φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού, ενδέχεται να δημιουργήσει πληθυσμούς με αυξημένη ανθεκτικότητα στις καταπονήσεις. Επομένως, αν και οι καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν δεν μπορούν να θεωρηθούν πλήρως προσαρμοσμένες στα οξέα, σε σχέση με αντίστοιχες που τα κύτταρα προέρχονταν από ανάπτυξη σε 1% γλυκόζη (Buchanan και Edelson, 1996), εντούτοις μπορούν να προσεγγίσουν ένα σενάριο επιμόλυνσης των τροφίμων ή των επιφανειών με καταπονημένα κύτταρα.

4.1.2.3. Προετοιμασία κουπονιών και σχηματισμός βιοϋμενίων

Για τον σχηματισμό των βιοϋμενίων της *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκαν στείρες επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα (ΑΧ), διαστάσεων (μ*π*υ) 2*5*0.1 cm, αγορασμένες από τοπική

επιχείρηση. Η διαδικασία συντήρησης και προετοιμασίας των επιφανειών περιγράφεται λεπτομερώς στο Κεφ. 3.1.2.4.

Οι τρεις φυσιολογικές καταστάσεις της *L. monocytogenes* που μελετήθηκαν (ΑΠ, ΠΚ και ΒΚ) ελήφθησαν μετά από σχηματισμό βιοϋμενίου από το μίγμα των στελεχών του παθογόνου στους 20°C για 72 ώρες, σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και κουπόνια. Συγκεκριμένα, ποσότητα TSBYE (40 ml) στην εμπορική του σύνθεση (pH 7.2 και 0.5% NaCl) διαμοιράστηκαν σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες (Falcon) χωρητικότητας 50 ml, στους οποίους προστέθηκε από ένα κουπόνι ΑΧ σε κάθετη θέση, ώστε να καλύπτεται πλήρως από το υπόστρωμα και να διαβρέχεται και από τις δύο πλευρές. Ακολούθησε ενοφθαλμισμός του υποστρώματος με 10^9 CFU/ml του μίγματος των στελεχών της *L. monocytogenes* και επώαση στους 20°C σε υψηλής ακρίβειας ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) επωαστικό θάλαμο (MIR-153; Sanyo Electric Co., Osaka, Japan) για 72 ώρες. Θεωρήθηκε ότι το χρονικό διάστημα των τριών ημερών ήταν αρκετό για την ισοκατανομή των βιοϋμενίων των τριών στελεχών στα κουπόνια (ΒΚ) και στο περιβάλλον υπόστρωμα (ΠΚ), στο οποίο λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του αρχικού εμβολίου δεν αναμένονταν ανάπτυξη. Η επιλογή της θερμοκρασίας των 20°C για τον σχηματισμό βιοϋμενίων βασίστηκε σε προηγούμενα πειράματα (Κεφ. 3.1), που έδειξαν ότι η συγκεκριμένη θερμοκρασία υπερτερεί έναντι άλλων (5-20°C) στο σχηματισμό βιοϋμενίων. Επιπλέον είναι μία θερμοκρασία που απαντάται συχνά στο περιβάλλον της βιομηχανίας τροφίμων. Η ποσοτικοποίηση των βιοϋμενίων πραγματοποιήθηκε μετά την αποκόλληση των βιοϋμενίων με την μέθοδο "beat vortex" (Κεφ. 3.1.2.6, Storphoth et al., 2002, Poimenidou et al. 2009), την σπειροειδή επιφανειακή εξάπλωση με τη χρήση Spiral plater (Autoplate® 4000; Spiral Biotech, Inc, MA, USA) σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα TSAYE και την επώαση στους 37°C για 48 ώρες.

4.1.2.4. Ανανέωση του υποστρώματος ανάπτυξης των βιοϋμενικών κυττάρων (ΒΚ) *L. monocytogenes* σε κουπόνια ΑΧ

Η ικανότητα των προσκολλημένων κυττάρων να ενεργοποιούν μηχανισμούς ανάπτυξης, αφού αποκολληθούν σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα εξετάστηκε με την συνεχή ανανέωση του υποστρώματος για διάστημα 30 ημερών. Συγκεκριμένα, μετά τον σχηματισμό των βιοϋμενίων (20°C, 72 h), τα κουπόνια απομακρύνονταν από τους πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες (Falcon) με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας, εκπλένονταν πλήρως με 25 ml MRD από κάθε πλευρά, με τέτοιο τρόπο ώστε να απομακρυνθούν κατάλοιπα του υποστρώματος και χαλαρά προσκολλημένα κύτταρα και μεταφέρονταν εκ νέου σε θρεπτικό μέσο, της ίδιας σύστασης με το προηγούμενο (30 συνδυασμοί pH/a_w). Τα κουπόνια επώαση στους 10°C σε υψηλής ακρίβειας επωαστικούς θαλάμους, ενώ το υπόστρωμα στο οποίο ήταν εμβαιπισμένα ανανεώνονταν κάθε 2 μέρες μετά από

έκπλυση του κουπονιού με 25 ml MRD. Η ανανέωση του υποστρώματος ανά 2 μέρες στόχευε στην προσομοίωση της συνεχούς εναλλαγής των τροφίμων ή άλλων υγρών υπολειμμάτων στις επιφάνειες (πάγκους, σωλήνες, εξαρτήματα) των βιομηχανικών επιφανειών. Η ποσοτικοποίηση των προσκολλημένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε την μηδενική "0" και την 30^η ημέρα επώασης των κουπονιών, με τον τρόπο που περιγράφηκε στο Κεφ. 3.1.2.6. Την 30^η ημέρα, παράλληλα με την επιφανειακή επίστρωση των ΒΚ, εφαρμόστηκε και το πρωτόκολλο εμπλουτισμού (ISO 11290-1, 1998) για να καλυφθούν οι περιπτώσεις στις οποίες ο πληθυσμός του παθογόνου βρέθηκε κάτω από το επίπεδο αρίθμησης της μεθόδου (Spiral plate, 1.3 log CFU/cm²). Όλες οι περιπτώσεις εξετάστηκαν σε τουλάχιστον 3 επαναλήψεις.

4.1.2.5. Μεσεπιφάνεια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης των πλαγκτονικών (ΠΚ) και των αποκολλημένων (ΑΚ) κυττάρων *L. monocytogenes* από τα κουπόνια

Μετά τον σχηματισμό των βιοϋμενίων (72 ώρες στους 20°C) στην επιφάνεια κουπονιών ΑΧ εμβαπτισμένων σε υπόστρωμα (pH 7.2, a_w 0.996) μέσα σε πλαστικούς σωλήνες, ποσότητα του υποστρώματος (10 ml) που περιείχε αιωρούμενα κύτταρα (ΠΚ) της *L. monocytogenes* (περίπου 10⁹ CFU/ml) αφαιρέθηκαν με τη βοήθεια πιπέτας πριν από οποιαδήποτε μεταχείριση ή ανάδευση και μεταφέρθηκαν σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου χωρητικότητας 15 ml. Ακολούθησε φυγοκέντρηση, διπλή έκπλυση των ΠΚ και επαναιώρηση σε MRD με τελική συγκέντρωση τα 10⁹ CFU/ml. Τα ΑΚ ελήφθησαν από τα κουπόνια ΑΧ (μετά την απομάκρυνση των χαλαρά προσκολλημένων κυττάρων) με την μέθοδο "bead vortex" (Κεφ. 3.1.2.6.) σε MRD σε τελική συγκέντρωση τα 10⁵ CFU/ml. Ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, και για τους δύο τύπους κυττάρων, μέχρι τα 1-10 κύτταρα ανά βοθρίο (well). Αμέσως μετά την αραιώση ποσότητα (25 μl) των ΠΚ ή των ΑΚ από την κάθε συγκέντρωση κυττάρων, που περιγράφεται στον πειραματικό σχεδιασμό, χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό 225 μl TSBYE τροποποιημένο σε 30 συνδυασμούς pH και a_w και έξι επαναλήψεις (n=6) για το καθένα, μέσα σε βοθρία ειδικά διαμορφωμένης μικροπλάκας (96-wells microplate). Δεδομένου ότι τα υποστρώματα παρασκευάστηκαν με χλωριούχο νάτριο και για την αποφυγή της εξάτμισής τους, κατά την διάρκεια της συντήρησής τους στους 10°C, κάθε μικροπλάκα (microplate) περιείχε αποκλειστικά και μόνο περιπτώσεις της ίδιας ενεργότητας, ενώ αμέσως μετά τον ενοφθαλμισμό οι πλάκες σφραγίστηκαν αεροστεγώς με parafilm (Panfix cellulose tape, Nichiban co., LTD., Τόκυο, Ιαπωνία). Η ανάπτυξη των ΠΚ και των ΑΚ καταγράφονταν καθημερινά, για διάστημα 30 ημερών, με οπτική παρατήρηση (για ανίχνευση ορατού θολώματος) και με ειδικό όργανο μέτρησης της ορατής πυκνότητας στα 620 νανόμετρα (OD at 620 nm; Tecan Sunrise Absorbance Reader, Tecan Group Ltd, Männedorf, Ελβετία). Στην περίπτωση που στα βοθρία εμφανίζονταν μεταβολές άνω των 0.1 μονάδων, το σύνολο του

υποστρώματος (250 μl) μεταφέρονταν σε τρυβλίο (με Spiral plater) ή σε εμπλουτιστικό υλικό (ISO 11290-1, 1998) για περαιτέρω ανάλυση, ανάλογα με το επίπεδο του αρχικού του εμβολίου.

4.1.2.6. Ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου

Η ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE) εφαρμόστηκε με σκοπό τον διαχωρισμό των απομονωθέντων αποικιών, οι οποίες συλλέχτηκαν με την ολοκλήρωση του πειράματος και την σύγκρισή τους με το προφίλ των τριών αρχικών στελεχών, ώστε να προκύψει το αν και κατά πόσο ένα από αυτά επικράτησε στον αποικισμό των κουπονιών. Μετά την αποκόλληση και την καταμέτρηση των ΒΚ, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 4.1.2.4, η πλειοψηφία των αποικιών (σύνολο 250) που εμφανίστηκαν στα τρυβλία στις κατάλληλες συγκεντρώσεις απομονώθηκε και αποθηκεύτηκε (κάθε αποικία ξεχωριστά) σε 5 ml TSBYE με προσθήκη 20% γλυκερόλης στους -20°C. Ένα ποσοστό (10%) από τις απομονώσεις του κάθε συνδυασμού pH-a_w προετοιμάστηκε κατάλληλα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Kagkli et al. (2009), με την χρήση των περιοριστικών ενζύμων *AscI* και *ApaI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, ΗΠΑ). Ο διαχωρισμός των τμημάτων του DNA που προέκυψαν έγινε με την χρήση συσκευής ηλεκτροφόρησης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (CHEF-DR11; Bio-Rad, Hercules, CA, ΗΠΑ), με τη βοήθεια του τυποποιημένου πρωτοκόλλου PulseNet για την κατηγοριοποίηση των στελεχών της *L. monocytogenes* μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα (Graves και Swaminathan, 2001). Στο στέλεχος του Σαλμονέλα (*Salmonella* ser. Braenderup, H9812), το οποίο χρησιμοποιήθηκε σαν πρότυπο αναφοράς (Graves και Swaminathan, 2001), η προετοιμασία έγινε με το περιοριστικό ένζυμο *XbaI* (*XbaI*; New England Biolabs). Η βαφή των πηκτωμάτων έγινε με διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0.5 mg/ml) σε νερό για 2 ώρες, ενώ ακολούθησε 1 ώρα αποχρωματισμός πριν τη φωτογράφησή του με ένα σύστημα GelDoc Bio-Rad.

4.1.2.7. Ανάπτυξη πολυωνυμικού μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης

Τα αποτελέσματα του πειράματος προσαρμόστηκαν σε ένα πολυωνυμικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης (ordinary logistic regression model) με την έκφραση του *logit* (P) σαν μια πολυωνυμική αναλογία των pH και b_w (V(1-a_w), Skandamis et al., 2007) με τη χρήση του προγράμματος SYSTAT 11.0. Λόγω των μικρών ποσοτήτων γαλακτικού οξέως που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για την ρύθμιση του pH, θεωρήθηκε ότι η επίδραση του γαλακτικού οξέως περιγράφεται έμμεσα μέσω της παραμέτρου του pH (Skandamis et al., 2007). Συγκεκριμένα στο εύρος pH από 5.2 ως 6.3, το ποσό του αδιάστατου γαλακτικού οξέως είναι αμελητέο εξαιτίας της σημαντικά χαμηλότερης pKa του (3.89) σε σχέση με τις προαναφερθείσες τιμές. (Lindblad και Lindqvist, 2009). Εξίσου αμελητέα θεωρήθηκε η συνεισφορά του δισταμένου ανιόντος σε σχέση με

αυτή του αδιάστατου μορίου και του pH του υποστρώματος, ακολουθώντας προηγούμενες αντίστοιχες μελέτες στη *L. monocytogenes* και τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Tienungoon et al., 2000; Vermeulen et al., 2007a, b). Η μεσεπειφάνεια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης που προέκυψε, υπολογίστηκε με τη βοήθεια του Microsoft Excel Solver. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν ορισμένες παράμετροι για την εκτίμηση της διαφορετικότητας στην συμπεριφορά των απομονωμένων ΠΚ και ΑΚ κυττάρων στις συνθήκες που εξετάστηκαν. Οι παράμετροι αυτές ήταν: η P_{in} , η πιθανότητα ενός κυττάρου να ξεκινήσει να αυξάνεται κάτω από κάθε μία από τις πειραματικές συνθήκες, η CN , ο αριθμός των κυττάρων που χρειάζονται για ξεκινήσει η ανάπτυξη κάτω από τις ίδιες συνθήκες, η P_{max} , η υψηλότερη πιθανότητα της εκκίνησης ανάπτυξης ενός κυττάρου σε μία συγκεκριμένη συνθήκη σε διάστημα 30 ημερών, και η t_{au} , ο χρόνος που χρειάζεται ένα κύτταρο για να αποκτήσει πιθανότητα εκκίνησης ανάπτυξης ίση με $P_{max}/2$.

Η επί τοις εκατό (%) πιθανότητα ενός κυττάρου να ξεκινήσει να αυξάνεται (P_{in}), όπως επίσης τα κύτταρα που απαιτούνται για να ξεκινήσει η ανάπτυξη (CN) υπολογίστηκαν από το ποσοστό των επαναλήψεων που εμφάνισαν ανάπτυξη σε κάθε μία από τις εξεταζόμενες συνθήκες και τους πίνακες των πιο πιθανών αριθμών (Most Probable Number (MPN) Tables, Razavilar και Genigeorgis, 1998):

$$P_{in} = 100/antilog(\log_{10} I/G) \quad (1)$$

όπου I είναι ο αριθμός των κυττάρων που εμβολιάστηκαν στο βοθρίο με την υψηλότερη συγκέντρωση κυττάρων και G είναι ο πλέον πιθανός αριθμός των κυττάρων στο ίδιο βοθρίο, τα οποία κατάφεραν να αυξηθούν. Οι παράμετροι P_{max} και t_{au} υπολογίστηκαν από την λογιστική εξίσωση τριών παραμέτρων που ακολουθεί (Whiting και Oriente, 1997):

$$P_{in} = \frac{P_{max}}{1 + e^{k(t_{au}-t)}} \quad (2)$$

στην οποία το k είναι η ταχύτητα ανάπτυξης του P_{in} .

4.1.2.8. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα από την επιφανειακή εξάπλωση των πληθυσμών εκφρασμένα σε CFU/cm² για τα ΒΚ ή CFU/ml για τα ΠΚ και ΑΚ των τριπλών δειγμάτων δύο επαναλήψεων ($n \geq 6$) μετατράπηκαν σε δεκαδικούς λογαρίθμους \log_{10} . Τα δεδομένα ανάπτυξης αναλύθηκαν με την ανάλυση διακύμανσης χρησιμοποιώντας το γενικό γραμμικό μοντέλο του στατιστικού προγράμματος SPSS. Για τη σύγκριση των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Tukey πολλαπλής εμβέλειας. Όλες οι διαφορές που αναφέρονται αφορούν σε επίπεδο σημαντικότητας (α) 0.05.

4.1.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1.3.1. Έλεγχος των αλλαγών των βιοϋμενίων (BK) της *L. monocytogenes* σε κουπόνια ΑΧ

Ο πληθυσμός του βιοϋμενίου της *L. monocytogenes* που σχηματίστηκε στα κουπόνια σε άριστες συνθήκες (pH 7.2 και a_w 0.996) μετά από τρεις ημέρες στους 20°C ήταν 4.5 ± 0.5 log CFU/cm². Τα συγκεκριμένα κουπόνια χρησιμοποιήθηκαν είτε αυτούσια (BK) ή μετά από απόξεση (AK), ενώ το υπερκείμενό τους (9 log CFU/ml) χρησιμοποιήθηκε για τα πλαγκτονικά κύτταρα (ΠΚ). Έπειτα από τη μεταφορά των παραπάνω κουπονιών στις 30 διαφορετικές περιπτώσεις pH- a_w του πειραματικού σχεδιασμού και την παραμονή τους για 30 ημέρες στους 10 °C με συνεχή (ανά 2 ημέρες) ανανέωση του θρεπτικού υποστρώματος, παρατηρήθηκε επιβίωση του παθογόνου στην αρχική ή σε οριακά υψηλότερη (0.2-0.6 log CFU/cm²) συγκέντρωση στις ευνοϊκές ή άριστες περιπτώσεις (a_w 0.996 και pH 5.9-6.6, a_w 0.982 και pH 6.6; Πίν. 4.1.1.). Στις υπόλοιπες 16 περιπτώσεις που μετρήθηκε το παθογόνο παρατηρήθηκε σημαντική ($P < 0.05$) μείωση του πληθυσμού, η οποία αυξανόταν σταδιακά όσο οι συνθήκες του μέσου γίνονταν πιο δυσμενείς. Οι πλέον δυσμενείς περιπτώσεις, με a_w 0.955 ή pH 4.8 (σύνολο 10), οδήγησαν σε θανάτωση του παθογόνου αφού δεν μετρήθηκαν κύτταρα με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης (όριο 1.3 log CFU/cm²) και δεν ανιχνεύτηκε το παθογόνο με τη μέθοδο του εμπλουτισμού.

Πίνακας 4.1.1. Πληθυσμοί των προσκολλημένων κυττάρων (BK) της *L. monocytogenes* (μέσοι log CFU/cm² ± Τυπική Απόκλιση) σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα (ΑΧ) σε διαφορετικές συνθήκες pH και a_w , μετά από 30 ημέρες συντήρησης στους 10°C. Οι περιπτώσεις που παρουσίασαν επιβίωση ή οριακή ανάπτυξη σκιαγραφούνται με γκρι χρώμα, μείωση με ανοιχτό γκρι, ενώ τα λευκά κελιά αντιπροσωπεύουν τις περιπτώσεις που δεν ανιχνεύτηκαν κύτταρα της *L. monocytogenes* (αρχικός πληθυσμός 4.5 ± 0.5 log CFU/cm²).

pH/ a_w	0.996	0.982	0.977	0.966	0.955
6.6	4.8 ^{Cc} ±0.3	5.2 ^{Cd} ±0.2*	3.0 ^{Bb} ±0.3	2.6 ^{Ba} ±0.3	MM
6.3	4.6 ^{Cc} ±0.1	3.5 ^{Bb} ±1.4	1.6 ^{Aa} ±1.4	1.3 ^{Aa} ±1.5	MM
5.9	4.9 ^{Cc} ±0.3*	3.2 ^{ABb} ±1.2	2.5 ^{Ba} ±0.8	2.8 ^{Bab} ±0.4	MM
5.6	3.3 ^{Bb} ±0.6	3.1 ^{ABb} ±0.5	2.9 ^{Bb} ±0.7	2.2 ^{Ba} ±1.1	MM
5.2	2.6 ^{Ab} ±1.2	2.5 ^{Ab} ±1.3	1.3 ^{Aa} ±1.4	1.3 ^{Aa} ±1.2	MM
4.8	MM	MM	MM	MM	MM

^{ABC}: οι μέσες τιμές ανά στήλη που μοιράζονται τουλάχιστον ένα κοινό γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($P \geq 0.05$).

^{abc}: οι μέσες τιμές ανά σειρά που μοιράζονται τουλάχιστον ένα κοινό γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($P \geq 0.05$).

*: Σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) σε σύγκριση με το αρχικό επίπεδο προσκόλλησης.

MM: Υπό του ορίου ανίχνευσης (1.3 log CFU/cm², Μη Μετρήσιμα) με την μέθοδο επιφανειακής επίστρωσης και μη παρουσία *L. monocytogenes* με τη μέθοδο του εμπλουτισμού.

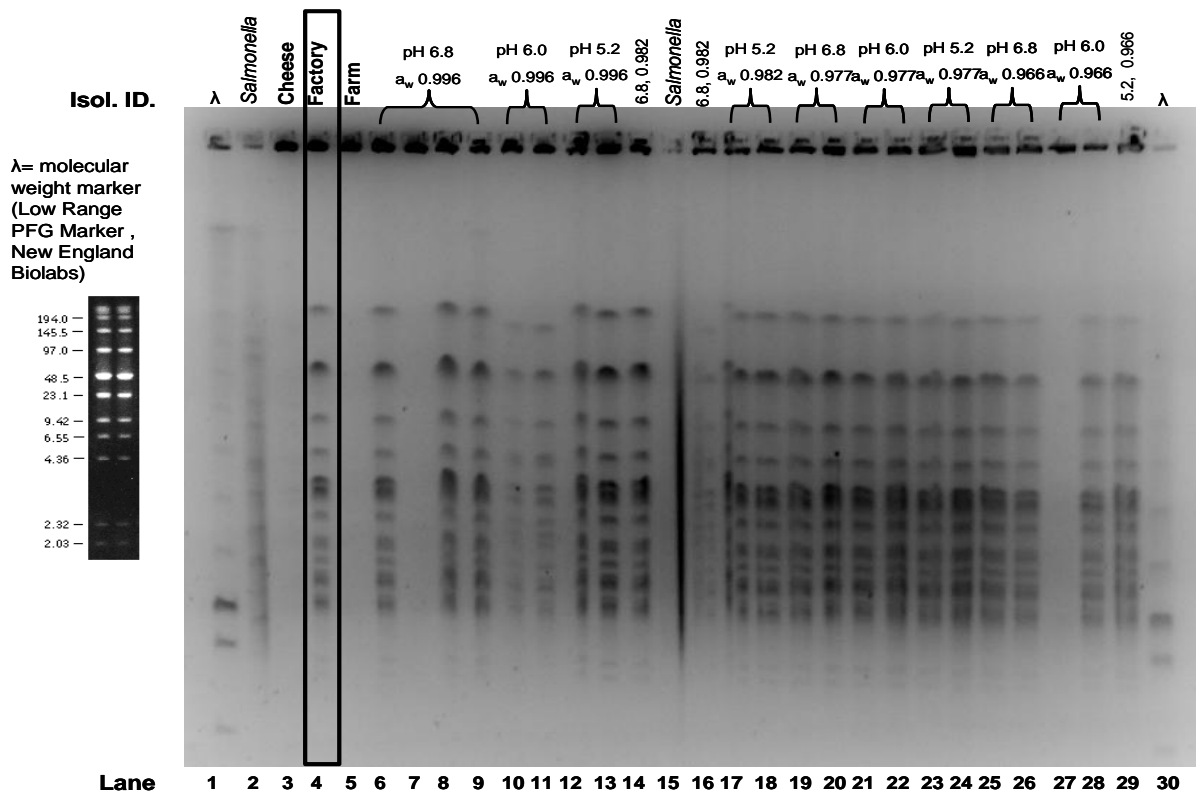
Συσχετίζοντας τα ΠΚ (Σχ. 4.1.2.α, γ), με τα ΒΚ (Πίν. 4.1.1) στις ίδιες συνθήκες pH και a_w , συμπεραίνεται ότι τα τελευταία εμφάνισαν μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, σε συνθήκες που αναμένεται ανάπτυξη των κυττάρων της *L. monocytogenes* (π.χ. pH>5.5 και a_w >0.960 στους 10°C, σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα: Koutsoumanis et al., 2004, pH>5.6 και a_w >0.960 στους 7°C: Vermeulen et al., 2007b), οι πληθυσμοί των προσκολλημένων κυττάρων μειώθηκαν ή απλά επιβίωσαν στα αρχικά τους επίπεδα. Μια πιθανή εξήγηση του μπορεί να σχετίζεται με την εγγύτητα των κυττάρων στον σχηματισμό του βιοϋμενίου, η οποία ενδεχομένως να επάγει επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων (αντίληψη απαρτίας, quorum sensing) μέσω ενώσεων σηματοδότησης. Η αντίληψη απαρτίας βοηθάει τα κύτταρα να αισθάνονται την πληθυσμιακή τους πυκνότητα και πιθανά αναστέλλει την αύξησή τους (Kjelleberg και Molin, 2002). Επιπλέον, όπως έχει αναφερθεί, το θρεπτικό μέσο της κάθε περίπτωσης ανανεώνονταν κάθε 2 ημέρες με ενδιάμεση έκπλυση των κουπονιών. Απομακρύνοντας συνεχώς τα χαλαρά προσκολλημένα κύτταρα πριν την εκ νέου μεταφορά τους στους δοκιμαστικούς σωλήνες με το καινούριο θρεπτικό υπόστρωμα ενδεχομένως να συνεισέφερε στη μείωση των ΒΚ στις περιπτώσεις που αναμένονταν ανάπτυξη και αποκόλληση των θυγατρικών κυττάρων (Storforth et al., 2002, Roimenidou et al., 2009). Θα μπορούσε επίσης να ειπωθεί ότι η συνεχόμενη εναλλαγή των θρεπτικών μέσων ενδεχομένως να είχε σαν αποτέλεσμα μια παρατεταμένη ή συνεχή φάση προσαρμογής των κυττάρων. Εντούτοις, στην περίπτωση που τα σε αιώρηση κύτταρα γύρω από το κουπόνι είχαν φτάσει την στατική φάση ανάμεσα στις δύο ανανεώσεις, ο πληθυσμός τους θα ήταν σε ικανό επίπεδο ώστε αυξήσει και τον πληθυσμό των ΒΚ στα κουπόνια (Roimenidou et al., 2009). Επομένως, η πιθανή φάση προσαρμογής λόγω της μεταφοράς των κουπονιών δεν αναμένεται να επηρεάσει την προσκόλληση των κυττάρων, εκτός αν αυτά ξεπλυθούν. Επιπλέον, δεδομένου ότι η μεταφορά γινόταν σε θρεπτικό μέσο της ίδιας σύστασης με το προηγούμενο, σε περίπτωση που είχε ξεκινήσει η ανάπτυξη του παθογόνου δεν θα διαταράσσονταν από τις ανανεώσεις (Tiganitas et al., 2009, Le Marc et al., 2010). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο σχηματισμός και η ανάπτυξη των βιοϋμενίων της *L. monocytogenes* στις επιφάνειες ΑΧ, σε συνθήκες συνεχούς ανανέωσης των υπολειμμάτων, είναι εφικτός σε λιγότερο δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες σε σχέση με τις αντίστοιχες που αυξάνονται τα ΠΚ. Παρόλα αυτά, η παρατεταμένη επιβίωση των ΒΚ στις επιφάνειες για το διάστημα των 30 ημερών παρά τις σχετικά δυσμενείς συνθήκες (π.χ. pH 5.2 και a_w 0.966) σε σχέση με τα ΠΚ (Pan et al, 2006, Wilks et al., 2006), μπορεί να οφείλεται στην φυσιολογία τους και την χρόνια παραμονή τους σε αντίστοιχες συνθήκες. Το γεγονός αυτό τα καθιστά επικίνδυνα για τη βιομηχανία τροφίμων.

Η χρήση του μίγματος στελεχών της *L. monocytogenes* αποσκοπούσε στην παραγωγή αντιπροσωπευτικών αποτελεσμάτων, δεδομένης και της παραλλακτικότητας των στελεχών που αναμένεται να υπάρχουν στην φύση ή στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων (Kathariou, 2002,

Faleiro et al., 2003; Van der Veen et al., 2008). Ένα καθιερωμένο εργαλείο διαχωρισμού των βακτηριακών απομονώσεων και σύγκρισής τους με ένα αρχικά μικτό πληθυσμό για τον προσδιορισμό του στελέχους που υπερισχύει είναι η ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (PFGE, Kagkli et al., 2009). Από τις συνολικές απομονώσεις της 30^{ης} ημέρας επώασης (10°C) ελέγχθηκε ένα ποσοστό (10%) σε κάθε συνδυασμό (pH/a_w) και τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι η πλειονότητα των απομονώσεων (91%) είχε παρόμοια συμπεριφορά με το στέλεχος C₅, το οποίο είχε απομονωθεί από περιβάλλον τυροκομείου (ορότυπος 4b, Πίν. 4.1.2., Σχ. 4.1.2.). Υπολείμματα όξινων και αλατούχων τροφίμων στις επιφάνειες παραγωγής ενδέχεται να συνεισφέρουν στην ενδυνάμωση των βακτηρίων λόγω καταπόνησης και στην παρατεταμένη παραμονή τους σε αυτές. Επιπλέον, τέτοια στελέχη ενδέχεται να εμφανίσουν ανθεκτικότητα στα απολυμαντικά και να εποικίσουν τις επιφάνειες μιας εγκατάστασης και να επιμολύνουν συνεχώς τα παραγόμενα προϊόντα (Lunden et al., 2003, Ribero et al., 2006, Aarnisalo et al., 2007). Οι ανωτέρω παρατηρήσεις έχουν σημασία στην βιοκινηλασιμότητα και στον προσδιορισμό της προέλευσης των παθογόνων, λόγω της ικανότητας ορισμένων στελεχών να υπερισχύουν σε συγκεκριμένα σημεία κι επιφάνειες της γραμμής παραγωγής ενός προϊόντος.

Πίνακας 4.1.2. Συνολικός αριθμός απομονώσεων της *L. monocytogenes* (Σύνολο), που συλλέχθηκαν μετά από 30 ημέρες συντήρησης των κουπονιών AX που έφεραν τα προσκολλημένα κύτταρα (BK) της *L. monocytogenes* σε υγρό θρεπτικό μέσο (TSBYE) προσαρμοσμένο σε 30 συνδυασμούς pH και a_w. Στη τέταρτη στήλη αναγράφεται ο αριθμός των απομονώσεων που εξετάστηκαν με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (PFGE) και στην πέμπτη ο αριθμός εξ αυτών που εμφάνισε παρόμοια συμπεριφορά με το στέλεχος C₅.

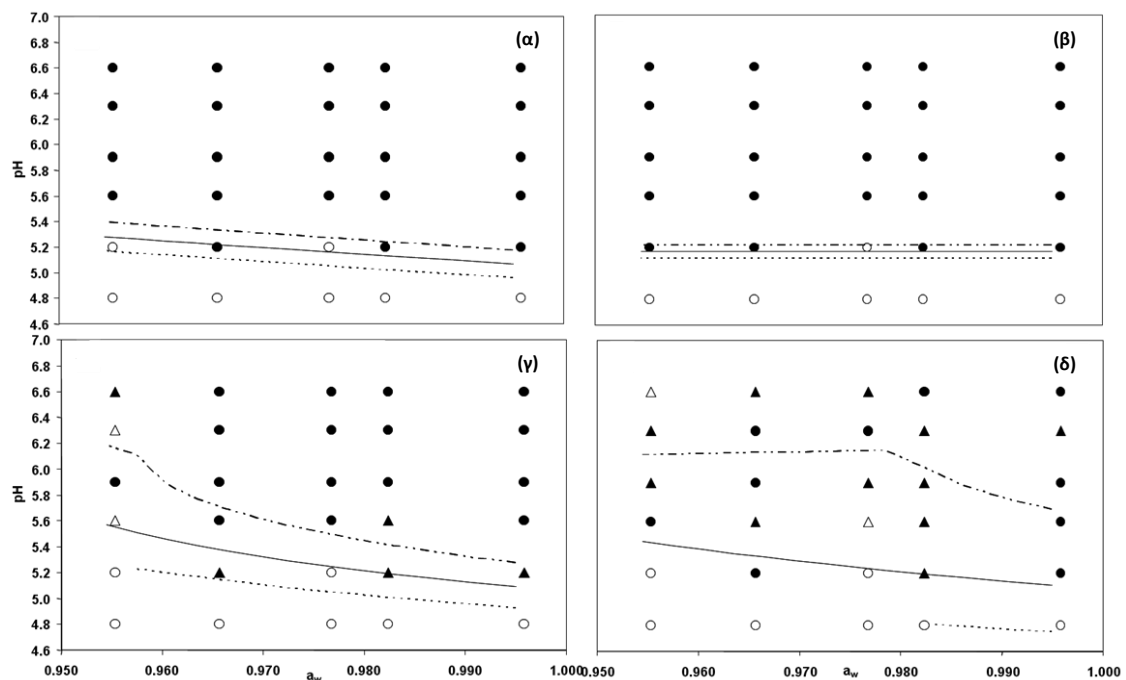
Πειραματική περίπτωση		Απομονώσεις <i>L. monocytogenes</i>		
pH	a _w	Σύνολο	PFGE	C ₅
6.8	0.996	40	4	3
6.8	0.982	35	2	2
6.8	0.977	20	2	2
6.8	0.966	21	2	2
6.0	0.996	30	2	2
6.0	0.977	17	2	2
6.0	0.966	19	2	1
5.2	0.996	23	2	2
5.2	0.982	29	2	2
5.2	0.977	15	2	2
5.2	0.966	1	1	1
Σύνολο		250	23	21



Σχήμα 4.1.1. Συμπεριφορά κατά την ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (PFGE) των απομονώσεων της 30^{ης} ημέρας της μελέτης και των τριών αρχικών στελεχών της *L. monocytogenes* επεξεργασμένα με το ένζυμο *Xba*I. Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης ήταν 6 V, με παλμούς που κυμαίνονταν από 4 μέχρι 40" για 18 ώρες. Οι αριθμοί στα αριστερά υποδεικνύουν τα κατά προσέγγιση μεγέθη DNA όπως έχουν προσδιοριστεί από τον δείκτη μοριακού βάρους (lambda DNA sizing ladder, Low range PFG, New England Biolab, Ipswich, MA, USA). Στήλες: **1 & 30**, δείκτης μοριακού βάρους, **2 & 15**, στέλεχος *Salmonella* (*Xba*I), **3**, απομόνωση τυριού 6179, **4**, απομόνωση επιφανειών C5, **5**, Scott A, **6-14 & 16-29**: στελέχη απομονωμένα από τις αντίστοιχους συνδυασμούς pH-*a_w* που αναγράφονται στο σχήμα.

4.1.3.2. Μεσεπιφάνεια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης των πλαγκτονικών (ΠΚ) και αποκολλημένων (ΑΚ) από τα κουπόνια ΑΧ κύτταρων της *L. monocytogenes*

Ένας από τους στόχους της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των συνθηκών που επιτρέπουν την ανάπτυξη διαφορετικών τύπων και αρχικής συγκέντρωσης κυττάρων της *L. monocytogenes*. Για το σκοπό αυτό έγινε προσδιορισμός των μεσεπιφανειών ανάπτυξης/μη ανάπτυξης (Α/ΜΑ) των πλαγκτονικών (ΠΚ) και των αποκολλημένων (ΑΚ) κυττάρων σε όλες τις περιπτώσεις που περιγράφονται στον πειραματικό σχεδιασμό. Και τα δύο είδη κυττάρων παρουσίασαν ανάπτυξη στις 30 ημέρες σε τουλάχιστον μία από τις έξι επαναλήψεις σε τιμές pH 5.2 και άνω (Σχ. 4.1.2.), σε αντίθεση με την τιμή 4.8, στην οποία παρατηρήθηκε μείωση του παθογόνου κατά 1.0 log CFU/ml, σε όλες τις εξεταζόμενες περιπτώσεις. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην βιβλιογραφία έχει σημειωθεί ανάπτυξη της *L. monocytogenes* στους 10°C σε TSBYE σε pH 4.8 ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα ενοφθαλισμού (Koutsoumanis και Sofos, 2005).



Σχήμα 4.1.2. Τυπικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης (ordinary logistic regression model) προσαρμοσμένο στα αποτελέσματα ανάπτυξης/ μη ανάπτυξης των πλαγκτονικών (ΠΚ, α και γ) και αποκολλημένων (ΑΚ, β και δ) κυττάρων της *L. monocytogenes* στις περιπτώσεις με αρχική συγκέντρωση 10^3 CFU/ml (α και β) και 10^1 CFU/ml (γ και δ), σε συνδυασμό με τις τιμές pH και a_w στους 10°C. Οι γραμμές που εμφανίζονται χωρίζουν τα σχήματα στα εξής επιμέρους τμήματα σε σχέση με την πιθανότητα ανάπτυξης: ανώτερη διακεκομμένη $p=0.9$, μεσαία συνεχής $p=0.5$ και κατώτερη διακεκομμένη $p=0.1$. Σύμβολα δεδομένων: $p=0$ (\circ), $p=0.33$ (Δ), $p=0.66$ (\blacktriangle) και $p=1$ (\bullet), υπολογισμένα από το ποσοστό των επαναλήψεων που εμφάνισε ανάπτυξη.

Οι διαφορές μεταξύ των προηγούμενων μελετών και των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης μπορούν να αποδοθούν στην παραλλακτικότητα των ορίων ανάπτυξης των διαφορετικών στελεχών της *L. monocytogenes*. Επιπλέον, στη μελέτη τους οι Koutsoumanis και Sofos (2005), χρησιμοποίησαν HCl για την ρύθμιση του pH, το οποίο δίδεται πλήρως. Στην παρούσα μελέτη η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε με γαλακτικό οξύ και οποιαδήποτε ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε pH \geq 5.2 θεωρήθηκε ότι επηρεάστηκε μόνο από την συγκέντρωση πρωτονίων. Εντούτοις, στο χαμηλό pH 4.8, η παρεμπόδιση της *L. monocytogenes* μπορεί να αποδοθεί στην συνύπαρξη πρωτονίων με αδιάστατο γαλακτικό οξύ. Μελλοντικές έρευνες, που θα εξετάσουν λεπτομερέστερα και με περισσότερες περιπτώσεις την περιοχή pH (5.2-4.8) και a_w (0.966-0.955), θα παρέχουν περισσότερες πληροφορίες στην επίδραση της φυσιολογίας και του είδους (πλαγκτονικά, βιοϋμένα) του κάθε στελέχους *L. monocytogenes* στο όριο ανάπτυξης/μη ανάπτυξής του.

Πίνακας 4.1.3. Οι χαμηλότερες τιμές (θετικές επαναλήψεις από σύνολο 3) στις οποίες παρατηρήθηκε ανάπτυξη των διαφορετικών ειδών κυττάρων της *L. monocytogenes* στις συνθήκες που αναγράφονται στους 10°C σε περίοδο 30 ημερών.

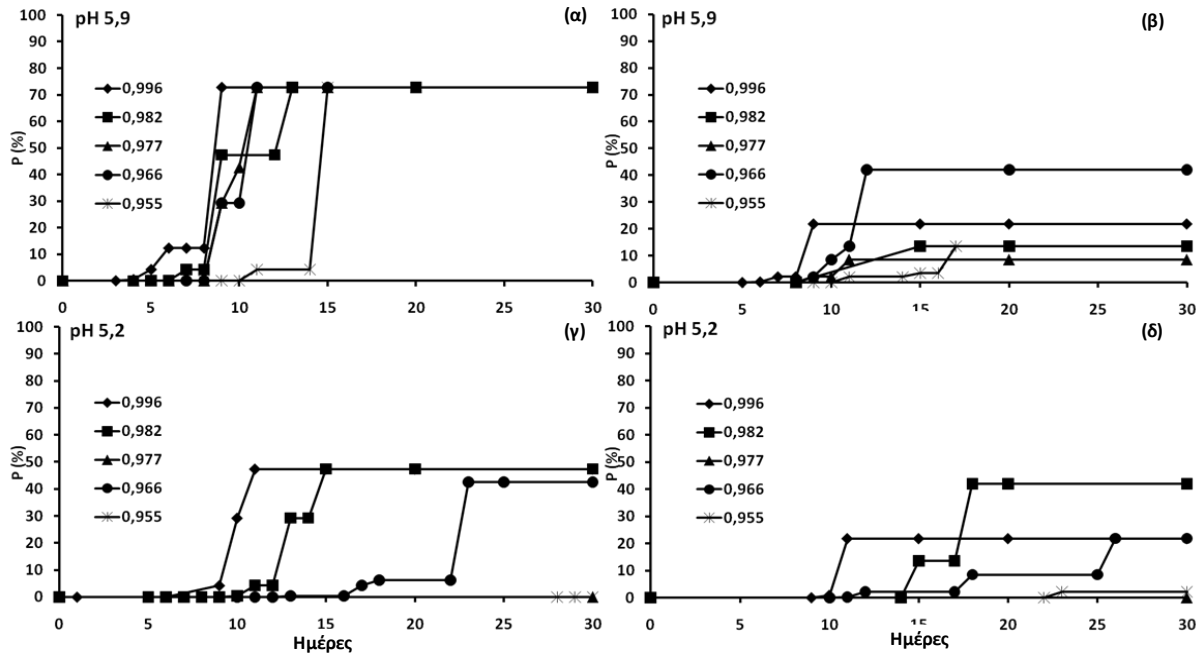
Είδος κυττάρου	Αρχικός πληθυσμός (CFU/βοθρίο)	a_w				
		0.996	0.982	0.977	0.966	0.955
Πλαγκτονικά	1.1×10^2	5.2 (3)	5.2 (3)	5.6 (3)	5.2 (3)	5.6 (3)
	2.3×10^1	5.2 (2)	5.2 (2)	5.6 (3)	5.2 (2)	5.6 (1)
	1.0×10^0	6.3 (1)	-	6.3 (1)	5.6 (1)	5.6 (1)
Αποκολλημένα	1.4×10^2	5.2 (3)	5.2 (3)	5.6 (3)	5.2 (3)	5.2 (3)
	1.8×10^1	5.2 (3)	5.2 (2)	5.6 (1)	5.2 (3)	5.6 (3)
	1.9×10^0	5.2 (1)	5.2 (1)	-	5.9 (1)	5.9 (1)

Σημαντική επίδραση στην έναρξη ανάπτυξης των ΠΚ και ΑΚ είχε η αρχική συγκέντρωση του εμβολίου ανά περίπτωση, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Koutsoumanis και Sofos, 2005, Skandamis et al., 2007). Συγκεκριμένα, όσο πιο χαμηλός ήταν ο αρχικός πληθυσμός, τόσο πιο υψηλά βρέθηκαν τα όρια pH και a_w που επέτρεψαν την αύξησή του (Σχ. 4.1.2., Πίνακας 4.1.3.). Η παραλλακτικότητα στην πιθανότητα ανάπτυξης της *L. monocytogenes* που παρατηρήθηκε (Πίνακας 4.1.3.) κοντά στα όρια ανάπτυξης, μπορεί να συσχετιστεί με τις παραλλαγές στο πλάτος της μεσεπιφάνειας (απότομη αλλαγή ή μη) ανάμεσα στα στελέχη, στα διαφορετικά επίπεδα ενοφθαλισμού (Skandamis et al., 2007, Van der Veen et al., 2008). Η μεσεπιφάνεια A/MA των ΠΚ και των ΑΚ στους συνδυασμούς των pH και a_w που εξετάστηκαν, έφερε ομοιότητες για πληθυσμούς μεγαλύτερους των 100 κυττάρων ανά βοθρίο. Εντούτοις, η ανάπτυξη των ΑΚ, ενοφθαλισμένων σε 1-10 κύτταρα, εμποδίστηκε σε υψηλότερες τιμές σε σχέση με τα ΠΚ

(Σχ. 4.1.2., Πίνακας 4.1.3.). Το πολυωνυμικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης που χρησιμοποιήθηκε για να απεικονίσει τις παραπάνω παρατηρήσεις παρουσίασε καλή προσαρμογή με τα πειραματικά δεδομένα (Σχ. 4.1.2.). Σε χαμηλά αρχικά επίπεδα ενοφθαλμισμού (10 CFU/ml) οι καμπύλες μεσεπιφάνειας και τον δύο ειδών κυττάρων (ΠΚ και ΑΚ) εμφανίστηκαν διφασικές και σχετικά πλατιές, γεγονός που υποδεικνύει αβεβαιότητα στην πρόβλεψη της απόκρισης του βακτηρίου (Σχ. 4.1.2. γ και δ). Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στο μίγμα στελεχών που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα. Σύμφωνα με τους Gysemans et al. (2007) όταν μια καλλιέργεια μίγματος στελεχών χρησιμοποιείται αντί μιας μονοκαλλιέργειας, η καμπύλη της μεσεπιφάνειας που προκύπτει είναι πιθανόν μια σύνθετη γραμμή που αποτελείται από τα όρια ανάπτυξης των μεμονωμένων στελεχών στις πιο περιοριστικές συνθήκες. Αντιθέτως, η μεσεπιφάνεια των περιπτώσεων που εμβολιάστηκαν με 100 κύτταρα και άνω, εμφανίστηκε στενή (Σχ. 4.1.2. α και β). Η απότομη μεταφορά από συνθήκες ανάπτυξης σε συνθήκες μη ανάπτυξης της *L. monocytogenes* σε επίπεδα ενοφθαλμισμού άνω των 10^2 CFU/ml έχει αναφερθεί και στο παρελθόν (Tienungsoon et al., 2000, Koutsoumanis et al., 2004) και αντανάκλα την μικρή παραλλακτικότητα των ορίων ανάπτυξης στους υψηλούς πληθυσμούς. Όσο οι συνθήκες γίνονται περισσότερο περιοριστικές για την ανάπτυξη ενός βακτηρίου (χαμηλό pH, υψηλή αλατότητα), μειώνεται η πιθανότητα ενός μεμονωμένου κυττάρου σε ένα μικρό βακτηριακό πληθυσμό να ξεκινήσει την αύξησή του και επαγωγικά αυξάνεται η διακύμανση της δυναμικής όλου του πληθυσμού να εμφανίσει ανάπτυξη, ιδιαίτερα στην περίπτωση που αποτελείται από μίγμα στελεχών (Koutsoumanis και Sofos, 2005). Σε υψηλότερους όμως πληθυσμούς αυτή η διακύμανση μειώνεται αισθητά ακόμα και στις δυσμενείς συνθήκες (Koutsoumanis, 2008), γεγονός που μπορεί να εξηγήσει γιατί τα αποκολλημένα κύτταρα σε πληθυσμούς άνω των 100 CFU/ml συμπεριφέρονται παρόμοια με τα πλαγκτονικά, όσον αφορά την πιθανότητα αύξησής τους (Storforth et al., 2002). Επιπλέον, τα προσκολλημένα κύτταρα μπορεί να υπόκεινται σε μεταβολική καταστολή και να συμπεριφέρονται περισσότερο σαν τα κύτταρα της στατικής φάσης, όταν απομακρύνονται από τις επιφάνειες, σε σχέση με εκείνα που δεν έχουν προσκολληθεί ποτέ. Μέσα σε ένα βακτηριακό πληθυσμό αυτό το φαινόμενο ενδέχεται να ποικίλει λόγω διαφορών είτε στην φυσιολογική κατάσταση των μεμονωμένων κυττάρων ή στα όρια ανάπτυξης των διαφορετικών στελεχών (Van der Veen et al., 2008). Τέτοιου είδους ζητήματα ενδέχεται να απαντηθούν με μελλοντικές εργασίες, οι οποίες θα μελετήσουν τις διαφορές των ορίων ανάπτυξης μεταξύ των ΠΚ και των ΑΚ από καλλιέργειες ενός στελέχους της *L. monocytogenes*.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις αξιολογήθηκαν περαιτέρω και στο επίπεδο του ενός κυττάρου. Σε γενικές γραμμές τα ΠΚ είχαν υψηλότερη πιθανότητα έναρξης ανάπτυξης (%) (Σχ. 4.1.3.) και έφτασαν σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα μέγιστης πιθανότητας ανάπτυξης (P_{max}) σε σύγκριση με τα ΑΚ (Σχ. 4.1.4.). Επιπλέον, ο χρόνος σε ημέρες (t_{au}) που χρειάζεται ένα μεμονωμένο αποκολλημένο

(Σχ. 4.1.5 β) κύτταρο της *L. monocytogenes* να φτάσει το μισό του μέγιστου επίπεδου πιθανότητας ανάπτυξης $P_{max}/2$ ήταν κατά 3-10 ημέρες περισσότερος από τον αντίστοιχο των ΠΚ, γεγονός που υποδηλώνει μειωμένη έναρξη ανάπτυξης, ιδιαίτερα στην περιοχή $pH < 5.6$ και/ή $a_w < 0.997$ (Σχ. 4.1.5.).

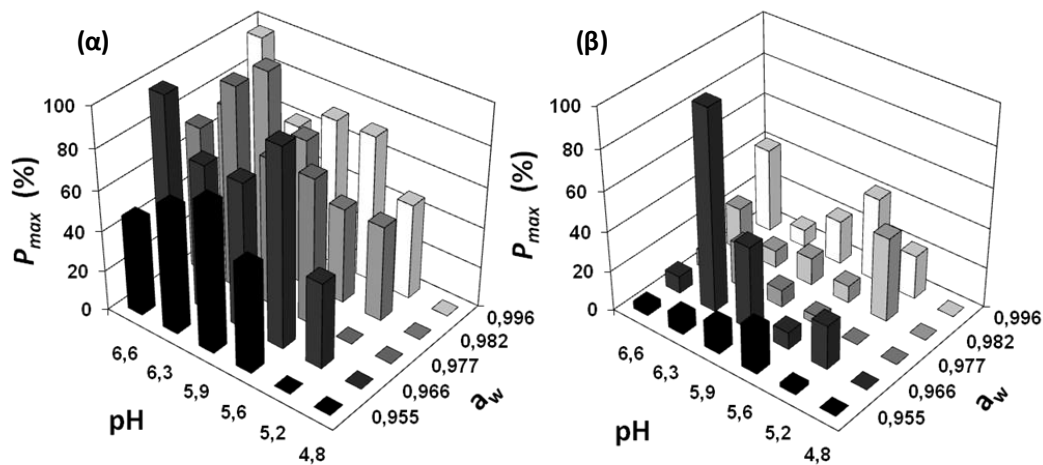


Σχήμα 4.1.3. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες της πιθανότητας οποιουδήποτε κυττάρου της *L. monocytogenes* να ξεκινήσει να αυξάνεται σε όλους τους συνδυασμούς ενεργότητας ύδατος με pH 5.9 (α, β) και 5.2 (γ, δ) για τα πλαγκτονικά (ΠΚ, α και γ) και τα αποκολλημένα (ΑΚ, β και δ) κύτταρα στους $10^{\circ}C$ σε 30 ημέρες.

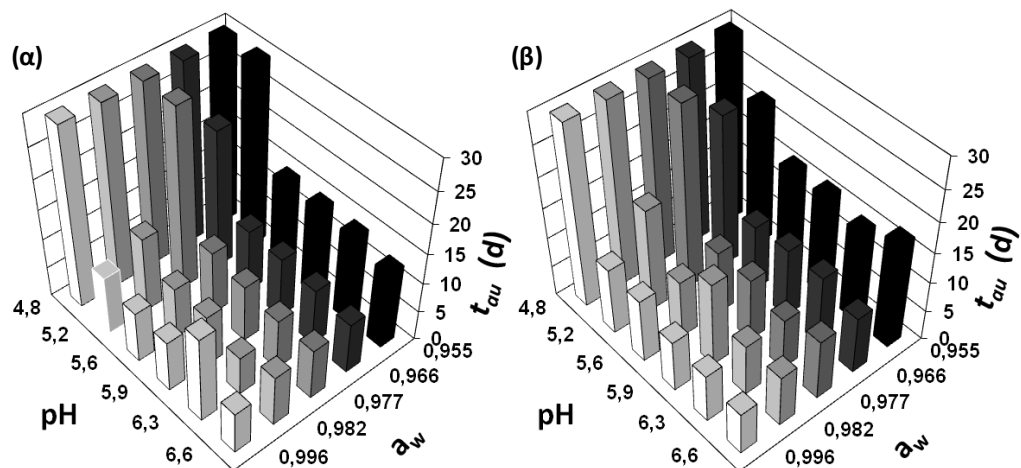
Πίνακας 4.1 4. Πλαγκτονικά (ΠΚ) και αποκολλημένα (ΑΚ) κύτταρα της *L. monocytogenes* που απαιτούνται (CN) για να εκκινήσει η αύξησή του σε διάφορες τιμές pH , a_w και χρόνου επώασης στους $10^{\circ}C$.

pH	a_w	Χρόνος (ώρες)	ΠΚ	ΑΚ
6.6	0.996	4	226	$>10^{4*}$
		10	1	2
6.6	0.977	6	2264	$>10^4$
		9	1	25
6.6	0.955	6	226446	$>10^4$
		11	2	476
5.6	0.996	5	226	$>10^4$
		9	1	7
5.6	0.977	5	22644	$>10^4$
		12	1	25
5.6	0.955	13	226	$>10^4$
		19	2	4

*: Ο συνολικός αριθμός κυττάρων που απαιτούνταν ώστε ένα να εκκινήσει την ανάπτυξη του παθογόνου υπερέιχε το υψηλότερο αρχικό επίπεδο ενοφθαλμισμού των αποκολλημένων κυττάρων (10^4 CFU/ml)



Σχήμα 4.1.4. Επίπεδα μέγιστης πιθανότητας ανάπτυξης (P_{max} ; %) που έφτασε ένα μεμονωμένο πλαγκτονικό (α , ΠΚ) ή αποκολλημένο (β , ΑΚ) κύτταρο της *L. monocytogenes* στους 10°C σε κάθε μία από τις εξεταζόμενες συνθήκες pH και a_w .



Σχήμα 4.1.5. Χρόνος σε ημέρες (t_{au}) που χρειάζεται ένα μεμονωμένο πλαγκτονικό (α , ΠΚ) ή αποκολλημένο (β , ΑΚ) κύτταρο της *L. monocytogenes* να φτάσει το μισό του μέγιστου επίπεδου πιθανότητας ανάπτυξης ($P_{max}/2$) στους 10°C σε κάθε μία από τις εξεταζόμενες συνθήκες pH και a_w .

Σε συμφωνία με τις ενδείξεις του μοντέλου που αναφέρθηκαν ανωτέρω οι διαφορές αυτές ελαχιστοποιήθηκαν σε λιγότερο περιοριστικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον, οι μειωμένες τιμές του P_{in} των ΑΚ σε απόκριση του pH υποδεικνύουν ότι χρειάζονται περισσότερα ΑΚ από ότι ΠΚ, έτσι ώστε ένα από αυτά να εκκινήσει ανάπτυξη του πληθυσμού (Πίνακας 4.1.4.). Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα αποκολλημένα κύτταρα από τα κουπόνια ΑΚ μπορεί να έχουν υποστεί μεγαλύτερη μεταβολική καταστολή από τα σε αιώρηση (ΠΚ), λόγω της προηγούμενης

προσκόλλησής τους και εν συνεχεία να αντιμετωπίσανε με περισσότερη δυσκολία την καταπόνηση της μεταφοράς τους σε χαμηλές τιμές pH και ενεργότητας ύδατος.

4.1.4. Συμπεράσματα

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα πάνω στην πιθανότητα ανάπτυξης των διαφορετικών ειδών κυττάρων της *L. monocytogenes*, που μελετήθηκαν, υποδηλώνουν ότι εφόσον υψηλοί πληθυσμού βιοϋμενικών κυττάρων αποκολληθούν από επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων και επιμολύνουν ένα προϊόν, συμπεριφέρονται παρόμοια με τα αντίστοιχα κύτταρα που προέρχονται είτε από υγρά τρόφιμα είτε από σημεία της γραμμής παραγωγής που υπάρχουν υπολείμματα σε υγρή μορφή. Σε περίπτωση όμως επιμόλυνσης με μικρούς πληθυσμούς του παθογόνου η επικινδυνότητα των κυττάρων που προέρχονται από τις επιφάνειες είναι σημαντικά μικρότερη από αυτή των κυττάρων που προέρχονται από υγρά τρόφιμα. Η γνώση αυτή βοηθά στον συσχετισμό της ύπαρξης του παθογόνου, ανάλογα με τον πληθυσμό και την συμπεριφορά του, με ένα συγκεκριμένο σημείο επεξεργασίας στο οποίο ενδέχεται να διαμένει και να επιμολύνει τα διερχόμενα προϊόντα (π.χ., λερωμένες κοιλότητες έναντι υπολείμματα υγρών τροφίμων). Επιπλέον, διαφαίνεται ότι με τον σχηματισμό βιοϋμενίου σε διαφορετικά περιβάλλοντα τείνει να εξασθενεί η παραλλακτικότητα των κυττάρων, και να επικρατούν ορισμένα στελέχη, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να κυριαρχούν έναντι άλλων στον αποικισμό των επιφανειών. Τα πλαγκτονικά κύτταρα τείνουν να πολλαπλασιάζονται ταχύτερα τόσο από τα αποκολλημένα, όσο και πολύ περισσότερο από τα προσκολλημένα, ειδικότερα σε δυσμενείς συνθήκες και χαμηλά επίπεδα επιμόλυνσης. Οι διαφορές μεταξύ των τύπων κυττάρων αμβλύνονται σε υψηλά επίπεδα επιμόλυνσης και σε συνθήκες που πλησιάζουν τις άριστες. Τα αποτελέσματα και τα μοντέλα που προέκυψαν από την μελέτη έρχονται να προσθέσουν σε γνώση όσον αφορά την συμπεριφορά των πλαγκτονικών, αποκολλημένων και προσκολλημένων κυττάρων *L. monocytogenes* σε συνάρτηση με τις μεταβολές των συνθηκών του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται. Άμεση εφαρμογή αυτής της γνώσης μπορεί να εντοπιστεί στη βιομηχανία τροφίμων στα σενάρια διασταυρούμενης επιμόλυνσης των προϊόντων από τις επιφάνειες και το αντίστροφο, ή μεταξύ προϊόντων με διαφορετικές φυσικοχημικές παραμέτρους, και με αυτό τον τρόπο να συνεισφέρει στην ανάπτυξη ρεαλιστικών μοντέλων βιοϊχνηλασιμότητας. Περαιτέρω γνώση σε αντίστοιχες φυσικοχημικές μεταβολές μπορεί να βοηθήσει σε αποτελεσματικότερη εκτίμηση του κινδύνου της *L. monocytogenes* και την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού συστήματος HACCP.

4.2. Επίδραση του pH, της ενεργότητας ύδατος και του επιπέδου επιμόλυνσης στα όρια ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* σε πρότυπο τυρί, γάλα και υγρό θρεπτικό μέσο

Journal of Food Protection, 74 (11), 1805–1813

Journal of Applied Microbiology, 109, 1790–1799

4.2.1. Εισαγωγή

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* έχει εμπλακεί σε πολλές περιπτώσεις λιστερίωσης ανά τον κόσμο, ενώ έχει απομονωθεί από τρόφιμα όπως το γάλα και τα παράγωγά του (Harvey και Gilmour, 1992, Gaya et al., 1996), το κοτόπουλο (Soultos et al., 2003), το κρέας και τα παράγωγά του (Samelis και Metaxopoulos, 1999, Thévenot et al., 2005), τα ψάρια και τα θαλασσινά (Dillon et al., 1994, Medrala et al., 2003, Miettinen και Wirtanen, 2005), τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα (Lianou και Sofos, 2007) και τα φρούτα (Guerra et al., 2001, Little et al., 2007). Ιδιαίτερα τα τυροκομικά προϊόντα, στα οποία συνήθως δεν αναμένεται κάποια περεταίρω επεξεργασία από τον καταναλωτή, θεωρούνται υψηλής επικινδυνότητας προϊόντα, κυρίως αν η τεχνολογία τους περιλαμβάνει την χρήση μη παστεριωμένου γάλακτος (Loncarevic et al., 1995, Millet et al., 2006, Little et al., 2008, De Buyser et al., 2011). Η απομόνωση στελεχών του μικροοργανισμού από τυριά παστεριωμένου γάλακτος υποδεικνύει την επιμόλυνση του προϊόντος κατά την παραγωγή ή την ωρίμανσή του. Πιθανές ελλείψεις στην διαδικασία εξυγίανσης των μονάδων παραγωγής, διευκολύνει την διάχυση μικροοργανισμών, οι οποίοι μέσω μηχανισμών όπως ο σχηματισμός βιοϋμενίων (Holah et al., 2002) αυξάνουν την ανθεκτικότητά τους έναντι των απολυμάνσεων και κατά συνέπεια την επιβίωσή τους στις επιφάνειες επεξεργασίας.

Ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός 2073/2005 (European Commission, 2005) με την τροποποίησή του 1441/2007 (European Commission, 2007), που αναφέρεται στα μικροβιολογικά κριτήρια των τροφίμων, έχει θέσει αυστηρά κριτήρια για τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, όπως πολλά από τα τυροκομικά προϊόντα. Απαιτεί την απουσία του παθογόνου σε 25 γ (n=5, c=0) τροφίμου πριν αυτό φύγει από τον έλεγχο του παραγωγού και <100 CFU/g σε προϊόντα κατά την διάθεσή τους στην αγορά. Στα τρόφιμα που αποδεδειγμένα δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* ο κανονισμός είναι λιγότερο αυστηρός. Επομένως, είναι σημαντικός ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των συνθηκών που έχουν την δυνατότητα να περιορίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* στα τυριά κατά την διάρκεια της τυροκόμησης.

Τα μοντέλα πιθανοτήτων στην μικροβιολογία πρόβλεψης εξετάζουν κατά πόσο μια αναμενόμενη συμπεριφορά (στην περίπτωση αυτή η έναρξη της ανάπτυξης) παρατηρείται ή όχι στις συνθήκες του πειράματος στην διάρκεια ενός ορισμένου χρονικού διαστήματος, το οποίο μπορεί να ποικίλει από μερικές ώρες μέχρι 60 ημέρες, ανάλογα με τις ιδιότητες και την τεχνολογία του τροφίμου στο οποίο (το μοντέλο) αναφέρεται (Ross και Dalgaard, 2004). Για την *L. monocytogenes* τα περισσότερα μοντέλα πιθανοτήτων έχουν αναπτυχθεί σε εργαστηριακά υποστρώματα (Koutsoumanis και Sofos, 2005, Tienungoon et al., 2005, Vermeulen et al., 2007), ενώ λίγα έχουν γίνει απευθείας σε τρόφιμα (Bolton και Frank, 1999, Hwang, 2009, Zuliani et al., 2007). Οι Augustin et al. (2005) συνόψισαν τα διαθέσιμα δεδομένα στην ανάπτυξη/μη ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, με σκοπό την αξιολόγηση της επίδοσης των μοντέλων. Ανάμεσα σε μερικές χιλιάδες δεδομένα από εργαστηριακά υποστρώματα, υπάρχουν μόνο περί τα 140 σετ δεδομένων στα τυριά. Εντούτοις, οι προβλέψεις από μοντέλα βασισμένα σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα ενδέχεται να παρεκκλίνουν σημαντικά, από τις προβλέψεις μοντέλων που αναπτύσσονται από δεδομένα τροφίμων (Hwang, 2009). Ακόμα και μαθηματικά μοντέλα από υγρά τρόφιμα ενδέχεται να παρέχουν ανακριβείς πληροφορίες όταν εφαρμοστούν σε στερεά τρόφιμα (Pin και Baranyi, 1998, Meldrum et al., 2003).

Στην τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του πρότυπου τυριού υιοθετήθηκαν διαφορετικά σενάρια περιβαλλοντικών συνθηκών (pH και a_w). Η πιθανότητα έναρξης ανάπτυξης της *L. monocytogenes* στα πρώτα στάδια της τυροκόμησης δεν έχει μελετηθεί στο παρελθόν και οι περιοριστικές συνθήκες που ενδεχομένως να επιτρέψουν ή όχι την ανάπτυξη του πληθυσμού του είναι άγνωστες μέχρι στιγμής. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των συνδυασμών pH, ενεργότητας ύδατος και επιπέδου επιμόλυνσης που εμποδίζουν την *L. monocytogenes* να αυξηθεί κατά την διάρκεια των πρώτων βημάτων μιας τυροκόμησης (δεδομένου ότι κάτι τέτοιο θα μπορούσε να θέσει τα όρια ασφαλείας ολόκληρης της τυροκόμησης). Τα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για την μοντελοποίηση της πιθανότητας έναρξης της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* σε συνθήκες προσομοιωμένης τυροκόμησης και ως εκ τούτου στον προσδιορισμό των ορίων ανάπτυξης του παθογόνου στις συνθήκες αυτές και τη σύγκρισή τους με τα όρια έναρξης ανάπτυξης σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα.

4.2.2. Υλικά και μέθοδοι

4.2.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός.

Τα πειράματα τυροκόμησης πραγματοποιήθηκαν με ένα πολυπαραγοντικό σχεδιασμό, ο οποίος βασίστηκε στις εξής παραδοχές: αν παρατηρούνταν έναρξη της ανάπτυξης σε οποιοσδήποτε από τις εξεταζόμενες συνθήκες με το χαμηλό εμβόλιο, τότε θα αναμένονταν ανάπτυξη και με το υψηλό εμβόλιο, ενώ αν δεν παρατηρούνταν έναρξη της ανάπτυξης σε οποιαδήποτε συνδυασμό με το υψηλό εμβόλιο, τότε δεν θα αναμένονταν ανάπτυξη ούτε και με το χαμηλό εμβόλιο. Το πολύπαραγοντικό σχέδιο του πειράματος περιελάμβανε τέσσερις τιμές pH (6.5, 6.1, 5.9 και 5.6), πέντε τιμές αλατότητας (0, 3, 4.5, 6 και 8% NaCl) και δύο επίπεδα ενοφθαλισμού (χαμηλό: 10^1 CFU/ml και υψηλό: 10^{2-3} CFU/ml) και φαίνεται στον Πίν. 4.2.1. Παράλληλα και στις ίδιες συνθήκες μελετήθηκε η πιθανότητα ανάπτυξης του παθογόνου σε παστεριωμένο γάλα και υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Κάθε συνδυασμός του πειράματος εξετάστηκε με 6 ανεξάρτητες τυροκομήσεις (6 επαναλήψεις).

4.2.2.2. Προετοιμασία εμβολίου.

Τα στελέχη 6179 (ορότυπος 1/2a) και C5 (ορότυπος 4b) που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν, όπως έχει αναφερθεί, απομονώσεις από τυρί και επιφάνεια επεξεργασίας, αντίστοιχα. Για κάθε πείραμα, οι καλλιέργειες προετοιμάστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.1.2.2. Μετά την ανάμιξη των στελεχών ακολούθησαν οι κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις για να προκύψουν τα δύο επίπεδα ενοφθαλισμού των 1-10 CFU/ml (χαμηλό εμβόλιο) και των 500-1000 CFU/ml (υψηλό εμβόλιο).

4.2.2.3. Τυροκόμηση.

Το πρότυπο τυρί παρασκευάστηκε από παστεριωμένο γάλα (pH 6.8, πρωτεΐνη 3.4%, λιποπεριεκτικότητα 3.7%, και λακτόζη 4.7%) με την προσθήκη γαλακτικού οξέως για την ρύθμιση του pH, αντί της εναρκτήριας καλλιέργειας. Αναλυτικά, ποσότητα (800 ml) παστεριωμένου γάλατος με προσθήκη 8% σκόνης γάλακτος χαμηλής επεξεργασίας (milk powder low heat, Tipperary Co-Operative, Tipperary, Ιρλανδία) ρυθμίζονταν στην επιθυμητή τιμή pH (6.5, 6.1, 5.9 και 5.6) με την προσθήκη στείρου γαλακτικού οξέως 10% (Sigma Aldrich Ireland Ltd, Wicklow, Ιρλανδία) ή καυστικού νατρίου 10% (BDH Chemicals, Poole, HB). Η προσθήκη καυστικού καλίου γινόταν όταν η προσθήκη αλατιού μείωνε την τιμή του pH κάτω από 6.5. Οι επιθυμητές τιμές ενεργότητας ύδατος 0.99, 0.98, 0.97, 0.96 και 0.95, επετεύχθησαν με την προσθήκη 0, 3, 4.5, 6 και 8% αλατιού αντίστοιχα, στο γάλα. Η προσθήκη στο γάλα της σκόνης γάλακτος ήταν απαραίτητη για την

ανάπτυξη του πρωτεϊνικού περιεχομένου του γάλακτος και τη βελτίωση της πήξης σε χαμηλές τιμές pH ή/και a_w και για λόγους τυποποίησης της διαδικασίας προστέθηκε σε όλες τις εξεταζόμενες περιπτώσεις. Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι δεν υπήρξε σημαντική διαφορά ($p>0.05$) στην ανάπτυξη του *L. monocytogenes* με ή χωρίς την προσθήκη σκόνης γάλακτος. Στη συνέχεια το γάλα θερμαίνονταν στους 30°C. Ακολουθούσε ο ενοφθαλμισμός του με κύτταρα της *L. monocytogenes* (συγκεντρώσεις στα 800ml γάλα: 1-10 CFU/ml ή 500-1000 CFU/ml) και η προσθήκη πυτιάς, περίπου 3.18 ml/l διαλυμένης σε 10πλάσια ποσότητα στείρου αποσταγμένου ύδατος. Μετά τον έλεγχο της πρόπυξης τα δείγματα αφήνονταν σε ηρεμία για την ολοκλήρωση της πήξης. Ακολουθούσε ο τεμαχισμός του πήγματος σε κύβους 1-2 εκατοστών με στείρο μαχαίρι, αφήνονταν για 30 λεπτά σε ηρεμία για να γίνει ο πρώτος διαχωρισμός και στη συνέχεια λάμβανε χώρα η αναθέρμανση του πήγματος μέχρι τους 36°C με ταχύτητα 1°C κάθε 10 min., με ανάδευση. Με το τέλος της αναθέρμανσης το πήγμα μεταφέρονταν σε πλαστικά καλούπια (διαμέτρου 89-82 mm και ύψους 83mm, Moorlands Cheeemakers Limited, HB) και αναστρέφονταν κάθε 30 λεπτά μέχρι την δειγματοληψία. Ο χρόνος των 8 ωρών από τον ενοφθαλμισμό του γάλακτος μέχρι την δειγματοληψία στο τυρί επιλέχτηκε σαν μια μέση τυπική διάρκεια μιας τυροκόμησης.

4.2.2.4. Γάλα και εργαστηριακό υπόστρωμα (TSB).

Για την σύγκριση της συμπεριφοράς του παθογόνου στα τρία υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν γάλα και εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα, στις ίδιες συνθήκες με αυτές της τυροκόμησης. Συγκεκριμένα, παστεριωμένο και ομογενοποιημένο γάλα ή TSB ρυθμίστηκαν σε τέσσερις τιμές pH (6.5, 6.1, 5.9 or 5.6) και πέντε αλατότητες (0, 3, 4.5, 6 or 8% NaCl), όπως και στα πειράματα τυροκόμησης, μεταφέρθηκαν σε βοθρία ειδικά διαμορφωμένης μικροπλάκας (96 multi-well microplates), ενοφθαλμίστηκαν με δύο επίπεδα πληθυσμού της *L. monocytogenes* (χαμηλό: 10^1 CFU/ml και υψηλό: 10^2 CFU/ml) και επώστηκαν για 8 ώρες στους 30°C. Ακολουθούσε επιφανειακή εξάπλωση 30 μl από κάθε βοθρίο σε ALOA (Agosti & Ottaviani Listeria Agar, LAB M Lancashire, HB). Όλες οι περιπτώσεις εξετάστηκαν σε τουλάχιστον έξι επαναλήψεις ($n=6$).

4.2.2.5. Μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις.

Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις για τον *L. monocytogenes*, την ενεργότητα ύδατος (a_w), το pH, το γαλακτικό οξύ και την υγρασία, κατά την ώρα του ενοφθαλμισμού (0 ώρες, t_0) και στο τέλος της τυροκόμησης, στα φρέσκα τυριά (8 ώρες, t_8). Η *L. monocytogenes* μετρήθηκε στο γάλα με επιφανειακή επίστρωση 1ml σε ALOA ενσωματωμένο σε τρυβλίο Petri διαμέτρου 20 εκ. και επώση στους 37°C για 48 ώρες. Η δειγματοληψία στα τυριά πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα πρότυπα 50B (IDF, 1985) και 122B (IDF, 1992) του IDF, για την δειγματοληψία και τις μικροβιολογικές

αναλύσεις, αντίστοιχα. Η *L. monocytogenes* μετρήθηκε με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης σε τρυβλία ALOA. Για να γίνει εφικτή η σύγκριση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* στο γάλα (log CFU/ml) και το τυρί (log CFU/g), όλες οι μετρήσεις εκφράστηκαν σαν γραμμάρια επί ξηρό (gram of dry weight, gdw). Οι αποικίες ανά gdw υπολογίστηκαν μετά από τον προσδιορισμό του περιεχομένου στερεών κάθε δείγματος. Το συνολικό περιεχόμενο στερεών προσδιορίστηκε σύμφωνα με το πρότυπο 4A (IDF, 1982) για το τυρί και 21B (IDF, 1987) για το γάλα. Ο αριθμός των αποικιών που μετρήθηκε σε 'x' γ ξηρού δείγματος (γάλατος ή τυριού) μετατράπηκε σε αποικίες ανά γραμμάρια επί ξηρό με την απλή μέθοδο των τριών. Η μέτρηση της ενεργότητας ύδατος πραγματοποιήθηκε σε ενεργόμετρο (AquaLab Monitor Series 3T equipment, Labcell, Hampshire, HB) με δοχεία στα οποία τοποθετούνταν κατά τη δειγματοληψία 5 ml γάλακτος ή κατάλληλη ποσότητα τυριού για την πλήρωσή τους. Για την μέτρηση του pH του γάλακτος χρησιμοποιήθηκε pHμετρο (Orion pH meter μοντέλο 420A), ενώ τα δείγματα τυριού προετοιμάστηκαν σύμφωνα με το πρότυπο BS770:5:1976 (Standard, BS 770 (Part 2), 1976) και μετρήθηκαν με το ίδιο pHμετρο. Το L-Γαλακτικό οξύ μετρήθηκε με ειδικό kit (L-Lactic acid kit, Boehringer Mannheim, Darmstadt, Γερμανία).

4.2.2.6. Προσδιορισμός κυρίαρχου στελέχους.

Για τον ενοφθαλμισμό του γάλακτος χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη της *L. monocytogenes*. Για να προσδιοριστεί αν κάποιο από τα στελέχη επικράτησε κατά την τυροκόμηση, από τα αποτελέσματα της δειγματοληψίας στο τυρί 8 ωρών επιλέχτηκαν τυχαία αποικίες από κάθε επανάληψη όλων των εξεταζόμενων πειραματικών συνδυασμών, οι οποίες αποθηκεύτηκαν σε TSB με γλυκερόλη στους -20°C. Ακολούθησε ανάλυση μέρους αυτών (191 απομονώσεις) με την βοήθεια της ηλεκτροφόρησης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Graves και Swaminathan, 2001, Κεφ. 4.1.2.6.).

4.2.2.7. Εκτίμηση των δεδομένων στην πιθανότητα έναρξης της ανάπτυξης κατά την διάρκεια της τυροκόμησης.

Από τις μικροβιολογικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο γάλα (0 ώρες) και το τυρί (8 ώρες) προσδιορίστηκε το αρχικό επίπεδο ενοφθαλμισμού κάθε επανάληψης και ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* στο τέλος της διαδικασίας και από την διαφορά τους υπολογίστηκε η ανάπτυξη ή μείωση του παθογόνου σε log CFU/gdw. Για την μετατροπή των αποτελεσμάτων σε δυαδικά σύστημα π.χ. έναρξη της ανάπτυξης (1) ή μη έναρξη της ανάπτυξης (0) σαν ανάπτυξη θεωρήθηκε η στατιστικώς σημαντική διαφορά (υπολογισμένη με το *t*-test, *p*-value<0.05) των 0.5 log CFU/gdw. Οι υπόλοιπες περιπτώσεις θεωρήθηκαν σαν "μη ανάπτυξη". Το κριτήριο που χρησιμοποιήθηκε των 0.5

log βασίστηκε στις μελέτες των Skandamis et al (2007), Koustoumanis και Sofos (2005) και Bolton και Frank (1999).

4.2.2.8. Μοντελοποίηση της πιθανότητας έναρξης ανάπτυξης της *L. monocytogenes*

Η λογιστική παλινδρόμηση είναι μια διαδικασία μαθηματικής μοντελοποίησης που χρησιμοποιείται στην ανάλυση δυαδικών δεδομένων (για παράδειγμα, έναρξη ανάπτυξης ή μη). Η διαδικασία που χρησιμοποιείται από το πρόγραμμα SAS υπολογίζει τις άγνωστες παραμέτρους με την μέθοδο της μέγιστης πιθανότητας. Τα δεδομένα ανάπτυξης και μη ανάπτυξης μετατράπηκαν σε 1 ή 0 σύμφωνα με τα παραπάνω, και προσαρμόστηκαν σε δύο μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης: το πολυωνυμικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης (ordinary logistic regression model) και το μη γραμμικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης (nonlinear logistic regression model), με την χρήση της διαδικασίας PROC LOGISTIC του προγράμματος SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, ΗΠΑ). Στο πρώτο μοντέλο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της συμπεριφοράς του παθογόνου κατά την τυροκόμηση, δεδομένου ότι ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* μετρήθηκε σε κάθε επανάληψη, όλα τα δεδομένα για το χαμηλό και υψηλό εμβόλιο αναλύθηκαν συνολικά, συμπεριλαμβανόμενου και του επιπέδου ενοφθαλμισμού σαν μεταβλητή στο μοντέλο. Επομένως, η πιθανότητα ανάπτυξης της κάθε επανάληψης μοντελοποιήθηκε σαν συνάρτηση των a_w , pH, και του επιπέδου ενοφθαλμισμού, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση (Εξίσωση 1):

$$\text{Logit}(P) = \text{LN}\left(\frac{P}{1-P}\right) = a_0 + a_1 b_w + a_2 \text{pH} + a_3 \text{cont} + a_4 b_w \text{pH} + a_5 b_w \text{cont} + a_6 \text{pHcont} + a_7 b_w^2 + a_8 \text{pH}^2 + a_9 \text{cont}^2$$

όπου το P είναι η πιθανότητα ανάπτυξης της κάθε επανάληψης, που λαμβάνει τις τιμές 1 ή 0 για έναρξη ανάπτυξης ή μη έναρξη ανάπτυξης αντίστοιχα, το b_w είναι η μετατροπή του a_w , όπως προτάθηκε από τους Gibson et al. (1994), για την μείωση της μεταβλητής του a_w και την καλύτερη προσαρμογή του μοντέλου ($b_w = \sqrt{1 - a_w}$), το *cont* είναι ο αρχικός πληθυσμός της *L. monocytogenes* στο γάλα (CFU/gdw), και οι a_i είναι οι μεταβλητές που αναμένονται να υπολογιστούν από το μοντέλο.

Στο δεύτερο μοντέλο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση του φαινομένου συγκριτικά στα τρία υποστρώματα, μοντελοποιήθηκε η πιθανότητα ανάπτυξης του παθογόνου σαν συνάρτηση των a_w , pH σε δύο σταθερά επίπεδα ενοφθαλμισμού, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση (Εξίσωση 2):

$$\text{Logit}(P) = \text{Ln}\left(\frac{P}{1-P}\right) = \beta_0 + \beta_1 \text{Ln}(a_w - a_{w_{\min}}) + \beta_2 \text{Ln}(1 - 10^{(pH_{\min} - pH)})$$

όπου το P είναι η πιθανότητα ανάπτυξης, που λαμβάνει τις τιμές 1 ή 0 για έναρξη ανάπτυξης ή μη έναρξης ανάπτυξης αντίστοιχα, τα $a_{w_{\min}}$ και pH_{\min} είναι οι ελάχιστες θεωρητικές τιμές των a_w και pH_{\min} , με τιμές 0.913 και 4.7 (Augustin et al., 2005), αντίστοιχα και οι β είναι μεταβλητές που αναμένονται να υπολογιστούν από το μοντέλο. Η μεσεπιφάνεια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης υπολογίστηκε για $P = 0.5$ με τη χρήση του Excel (Microsoft® Office 2003 Excel). Ο στατιστικός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για να μετρήσει την προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα ήταν το ποσοστό συμφωνίας (PC, Bolton και Frank, 1999, Tienungoon et al., 2000, Hwang, 2009).

4.2.2.9. Επικύρωση του πολυωνυμικού μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης.

Για την επικύρωση του μοντέλου επαναλήφθηκε η διαδικασία της τυροκόμησης με διαφορετικές συνθήκες από αυτές που συμπεριλήφθηκαν στην εξαγωγή του μοντέλου και συγκεκριμένα συνδυασμούς a_w -pH (0.959-6.38, 0.963-6.43, 0.967-5.84, 0.969-6.44 και 0.982-6.34) με υψηλό ή χαμηλό εμβόλιο. Ποσότητα παστεριωμένου γάλακτος προετοιμάζονταν και ενοφθαλμίζονταν με την κατάλληλη συγκέντρωση της *L. monocytogenes* για κάθε συνδυασμό και γινόταν η δειγματοληψία της μηδενικής ώρας. Το γάλα στην συνέχεια διανέμονταν σε 10 δοχεία (200 ml/δοχείο), ακολουθούσε η διαδικασία τυροκόμησης που περιγράφηκε ανωτέρω και στο τέλος αυτής (8 ώρες) η δειγματοληψία από το φρέσκο τυρί. Τα αποτελέσματα με ανάπτυξη ≥ 0.5 λογαρίθμων θεωρήθηκαν ως έναρξη ανάπτυξης (1), ενώ κάτω από 0.5 log ανάπτυξης της *L. monocytogenes* θεωρήθηκε σαν μην έναρξη ανάπτυξης (0). Ακολουθώντας αυτό το κριτήριο υπολογίστηκαν τα ποσοστά ανάπτυξης και τα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση των προβλέψεων του μοντέλου. Η ικανότητα του μοντέλου να προβλέπει ικανοποιητικά μελλοντικά δεδομένα μετρήθηκε με τον συντελεστή R^2 (coefficient of determination).

4.2.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

Η ευρεία ποικιλία των τυριών που καταναλώνονται παγκοσμίως είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας τυροκόμησης και του είδους του γάλακτος που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση. Το είδος της εναρκτήριας καλλιέργειας ή η διαδικασία οξύνισης, οι χρόνοι και οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται κατά την τυροκόμηση και την ωρίμαση, η προσθήκη άλατος, ζυμών ή μυκήτων, η εφαρμογή πίεσης επηρεάζουν σημαντικά τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Adda et al., 1982, Samelis et al., 2008, Irlinger και Mounier, 2009). Εντούτοις, υπάρχουν συγκεκριμένα κοινά βήματα που ακολουθούνται από την πλειοψηφία των τυροκόμων, όπως η οξύνιση του γάλακτος, ο σχηματισμός πήγματος, το κόψιμο ή το σπάσιμο του πήγματος, η αναθέρμανση, η μεταφορά σε καλούπια για την εξαγωγή του ορού (ενίοτε με πίεση) και η ωρίμαση. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μια γενικευμένη τεχνολογία τυροκόμησης, στην οποία συμπεριλήφθηκαν τα πέντε κοινά βήματα που αναφέρθηκαν ανωτέρω. Σαν σκοπός είχε τεθεί η μοντελοποίηση της πιθανότητας έναρξης της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* κατά τη διάρκεια της πρώτης μέρας τυροκόμησης. Η επιλογή αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι κατά τα πρώτα στάδια της τεχνολογίας οι ανασταλτικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη ή την επιβίωση της *L. monocytogenes* (χαμηλό pH, συγκέντρωση γαλακτικού οξέως, αυξημένη αλατότητα) δεν βρίσκονται στην πλήρη ισχύ τους και σε συνδυασμό με την ευνοϊκή θερμοκρασία ενδέχεται, σε περίπτωση επιμόλυνσης του προϊόντος, να ακολουθήσει ανάπτυξη του παθογόνου.

Το πολυωνυμικό (τυπικό) μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης (Ordinary Logistic Regression model) έχει χρησιμοποιηθεί στην μοντελοποίηση της πιθανότητας ανάπτυξης της *L. monocytogenes* σε τρόφιμα όπως ο ψημένος σολομός (Hwang, 2009) και το Μεξικάνικου τύπου τυρί, κατά την διάρκεια της ωρίμασης (Bolton και Frank, 1999). Έχει παρατηρηθεί ότι το ποσοστό αντιστοιχίας (concordance rate) του μοντέλου μειώνεται με την χρήση τροφίμων σαν υποστρώματα, έναντι των θρεπτικών μέσων. Συγκεκριμένα, οι περισσότερες μελέτες των ορίων ανάπτυξης της *L. monocytogenes* που πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό ζυμό είχαν ποσοστά αντιστοιχίας μεγαλύτερα από 0.97 (Valero et al., 2006, Bozaris et al., 2007, Koutsoumanis και Sofos, 2005, Skandamis et al., 2007), ενώ τα αντίστοιχα στα τρόφιμα ήταν 0.7 και 0.91 (Bolton και Frank, 1999, Hwang, 2009). Παρά την αυξημένη παραλλακτικότητα που σχετίζεται με τις δυναμικές συνθήκες που ισχύουν σε ένα τρόφιμο, η χρήση του πολυωνυμικού μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης στα τρόφιμα θεωρείται επαρκής.

Μέρος των συνδυασμών που εξετάστηκαν για το χαμηλό και υψηλό εμβόλιο εισήγαγαν φάσεις που θα μπορούσαν να θεωρηθούν σαν παρατεταμένη φάση προσαρμογής, η οποία στις συνθήκες τυροκόμησης της παρούσας μελέτης θεωρήθηκε σαν σενάριο μη ανάπτυξης. Στο χαμηλό εμβόλιο, παρατηρήθηκε θανάτωση του πληθυσμού του *Listeria* σε τιμές a_w μικρότερες του 0.975.

Στις συγκεκριμένες περιπτώσεις ο όρος “παρατεταμένη φάση προσαρμογής” θα ήταν ανακριβής. Ο όρος “έναρξη ανάπτυξης” είναι κατάλληλος ακόμα και όταν η ανάπτυξη ανιχνεύεται σε μικρό ποσοστό, δεδομένου ότι αν συνεχιζόταν η τυροκόμηση ο παθογόνος θα είχε την δυνατότητα να ολοκληρώσει την αυξητική του πορεία. Οι περιπτώσεις που τα κύτταρα δεν μπορούσαν να ανακτηθούν μετά από 8 ώρες τυροκόμησης, θεωρήθηκαν περιπτώσεις μη ανάπτυξης. Στις περιπτώσεις που ευνοούν την έναρξη της ανάπτυξης του παθογόνου, η μετέπειτα συμπεριφορά του εξαρτάται από τις περιβαλλοντολογικές συνθήκες (θερμοκρασία, pH, a_w κ.α.) κατά τη διάρκεια της ωρίμασης. Τυπικές τιμές a_w στα τυριά είναι: 0.98 για τα μαλακά τυριά, 0.95-0.97 για τα ημίσκληρα και 0.86-0.97 για τα σκληρά τυριά (Lund et al., 2000). Επομένως, μαλακά και ημίσκληρα τυριά που δεν υποβάλλονται σε μεγάλες περιόδους ωρίμασης έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να υποστηρίξουν την επιβίωση ή ακόμα και την ανάπτυξη του παθογόνου, αυξάνοντας έτσι και την επικινδυνότητα του τελικού προϊόντος.

Οι τρεις μεταβλητές που μελετήθηκαν, δηλ. το pH, η a_w και επίπεδο ενοφθαλμισμού επηρέασαν, σε διαφορετικό βαθμό, την πιθανότητα έναρξης της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* κατά τα πρώτα στάδια τυροκόμησης. Συγκεκριμένα, με την ανάπτυξη της ενεργότητας ύδατος και του επιπέδου ενοφθαλμισμού αυξήθηκε αντίστοιχα και η πιθανότητα έναρξης της ανάπτυξης του παθογόνου. Οι υποθέσεις που έγιναν στον πειραματικό σχεδιασμό δικαιολογήθηκαν από τα παρακάτω αποτελέσματα: 1) Στο χαμηλό εμβόλιο παρατηρήθηκε ανάπτυξη 1.57 με 3.96 log CFU/gdw, σε a_w 0.976 – 0.996 (0 - 3% NaCl). Για τις συγκεκριμένες περιπτώσεις θεωρήθηκε ότι και το υψηλό εμβόλιο θα οδηγούσε σε ανάπτυξη του παθογόνου. 2) Αντίστροφα για τις περιπτώσεις του υψηλού εμβολίου που δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη (τιμές a_w μεταξύ 0.938 και 0.957), θεωρήθηκε ότι αντίστοιχα αποτελέσματα θα υπήρχαν και με το χαμηλό εμβόλιο.

Πίνακας 4.2.1. Αναπαράσταση του πολυπαραγοντικού σχεδιασμού του πειράματος και περιπτώσεις από το σύνολο στις οποίες παρατηρήθηκε ανάπτυξη της *L. monocytogenes*.

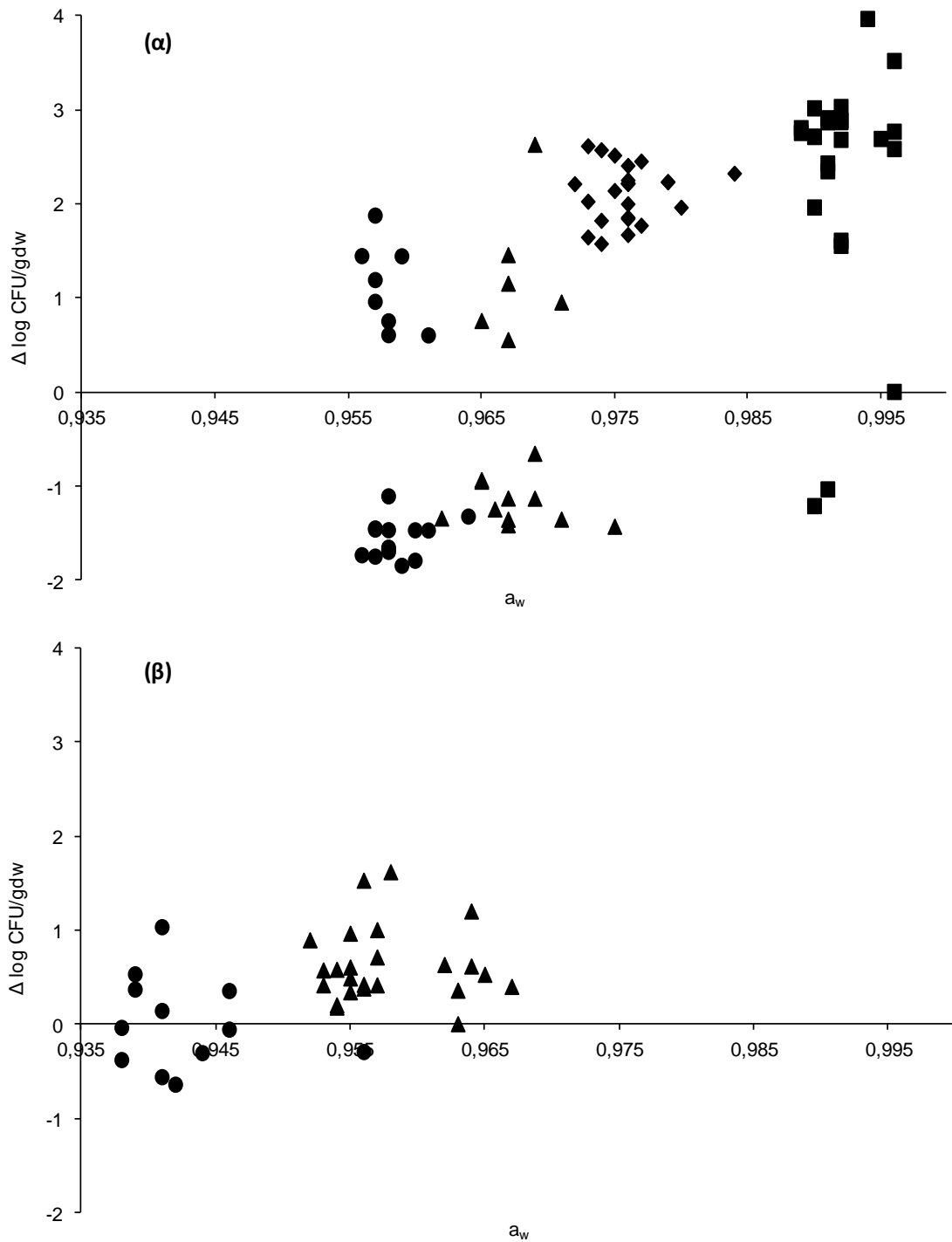
pH	NaCl (%)				
	0	3	4.5	6	8
6.5	X (6/6) ¹	X (6/6)	X (2/6)/Y (6/6) ²	X(0/6)/ Y (2/6)	Y (0/6) ³
6.1	X (6/6)	X (6/6)	X (1/6)/Y (6/6)	X(1/6)/ Y (3/6)	Y (0/6)
5.9	X (6/6)	X (6/6)	X (0/6)/Y (5/6)	X(2/6)/ Y (5/6)	Y (0/6)
5.6	X (6/6)	X (6/6)	M ⁴	X(1/6)/ Y (3/6)	M

¹ X: Παρατηρήθηκε ανάπτυξη και στις 6 επαναλήψεις με το χαμηλό επίπεδο επιμόλυνσης, για τον λόγο αυτό θεωρήθηκε 100% ανάπτυξη στο υψηλό επίπεδο

² X/Y: Πραγματοποιήθηκαν πειράματα και με τα δύο εμβόλια

³ Y: Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη και στις 6 επαναλήψεις με το υψηλό επίπεδο επιμόλυνσης, για τον λόγο αυτό θεωρήθηκε 100% μη ανάπτυξη στο χαμηλό επίπεδο

⁴ M: Μη ολοκλήρωση της τυροκόμησης λόγω αδυναμία πήξης του γάλακτος

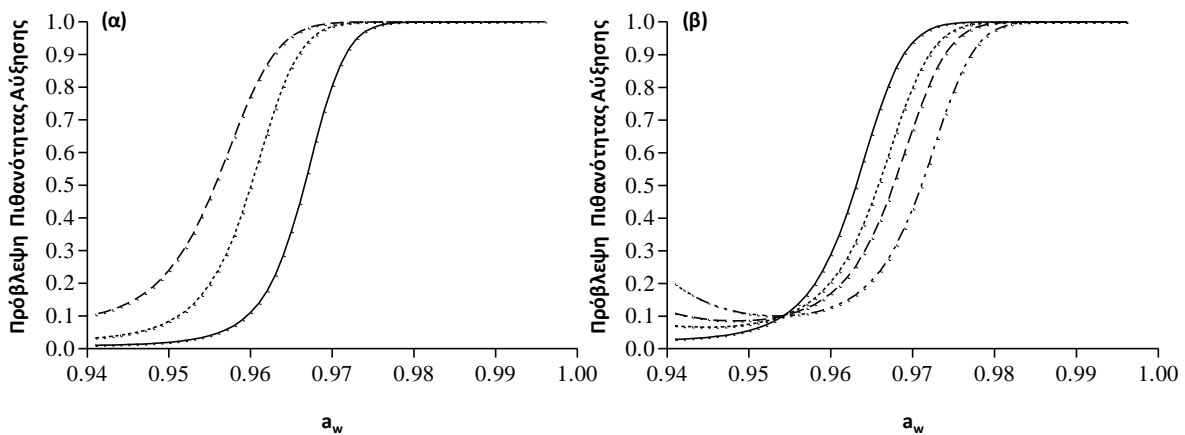


Σχήμα 4.2.1. Επίδραση της ενεργότητας ύδατος στην λογαριθμική μεταβολή του πληθυσμού της *L. monocytogenes* στο (α) χαμηλό και (β) υψηλό επίπεδο επιμόλυνσης, όπου $\Delta \log \text{CFU/gdw}$ είναι η διαφορά των λογαρίθμων του πληθυσμού της *L. monocytogenes* στην αρχή και το τέλος της τυροκόμησης ($\log t_0 - \log t_8$) και a_w οι τιμές που αντιστοιχούν στην τελική μέτρηση της ενεργότητας ύδατος των δειγμάτων (t_8).

Το επίπεδο επιμόλυνσης, μέσω του μεγέθους του εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα, φάνηκε ότι επηρεάζει την θέση της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης της *L. monocytogenes* στις συνθήκες που μελετήθηκε. Η ανάπτυξη του παθογόνου που παρατηρήθηκε ήταν σε συνάρτηση της a_w και του αρχικού επιπέδου ενοφθαλμισμού στο γάλα. Στο χαμηλό εμβόλιο ανάπτυξη παρατηρήθηκε σε τιμές ενεργότητας ύδατος μεγαλύτερες ή ίσες του 0.975. Σε τιμές μικρότερες από το 0.975 η συμπεριφορά της *L. monocytogenes* εμφάνισε παραλλακτικότητα (Σχ. 4.2.1.α). Στο υψηλό εμβόλιο, το όριο ανάπτυξης του παθογόνου εμφανίστηκε στην τιμή ενεργότητας 0.946 (Σχ. 4.2.1.β). Θανάτωση της *L. monocytogenes* παρατηρήθηκε στο χαμηλό εμβόλιο σε τιμές ενεργότητας ύδατος που στο υψηλό εμβόλιο παρατηρήθηκε ανάπτυξη (Σχ. 4.2.1.α). Ο συσχετισμός μεταξύ των τιμών a_w και της λογαριθμικής ανάπτυξης του βακτηρίου ήταν 0.74 και 0.63 για το χαμηλό και το υψηλό εμβόλιο αντίστοιχα. Καμία συσχέτιση δε βρέθηκε μεταξύ του pH και της λογαριθμικής ανάπτυξης (-0.03 και -0.08 για το χαμηλό και το υψηλό εμβόλιο αντίστοιχα). Η συσχέτιση του μεγέθους του εμβολίου με τα όρια ανάπτυξης του παθογόνου έχει γίνει και σε προηγούμενες μελέτες (McKellar και Lu, 2004, Koutsoumanis και Sofos, 2005). Στην τελευταία μελέτη συγκεκριμένα, απεικονίστηκε η μετατόπιση της μεσεπιφάνειας A/MA του παθογόνου (συναρτήσεις pH/a_w , pH/θ , a_w/θ) προς δυσμενέστερες ανά περίπτωση συνθήκες, παράλληλα με την ανάπτυξη του μεγέθους του εμβολίου (Koutsoumanis και Sofos, 2005).

Οι συνδυασμοί pH και a_w στους οποίους αναμένεται έναρξη της ανάπτυξης με πιθανότητα μικρότερη του 0.1, εξαρτώνται από το επίπεδο επιμόλυνσης του γάλακτος. Για παράδειγμα, για τιμές $a_w < 0.97$ και pH 5.6 η πιθανότητα έναρξης της ανάπτυξης ήταν 0.1 για εμβόλιο 0.6 log CFU/gdw, 0.3 για εμβόλιο 2 log CFU/gdw και 0.8 για εμβόλιο 3 log CFU/gdw, αντίστοιχα. Για διαφορετικές τιμές a_w σε συγκεκριμένο pH, για παράδειγμα 6.5, η πιθανότητα έναρξης ποικίλει ανάλογα με το επίπεδο της επιμόλυνσης (Σχ. 4.2.2.α), ενώ για συγκεκριμένο επίπεδο επιμόλυνσης, για παράδειγμα 1 log CFU/gdw, η πιθανότητα εξαρτάται από την τιμή του pH (Σχ. 4.2.2.β). Τα όρια ανάπτυξης του παθογόνου ήταν διαφορετικά στα δύο εμβόλια, με το υψηλό εμβόλιο να έχει μεγαλύτερη πιθανότητα έναρξης της ανάπτυξης. Όταν το γάλα επιμολύνθηκε με τουλάχιστον 120 CFU/ml του παθογόνου είχε πιθανότητα 0.46 να εκκινήσει ανάπτυξη στις πλέον αυστηρές συνθήκες που εξετάστηκαν (a_w 0.94) και 1 στις πιο ευνοϊκές (a_w 0.99). Οι ελάχιστες τιμές a_w που μελετήθηκαν (8% NaCl, a_w 0.94) είναι υψηλότερες από τις ελάχιστες τιμές που έχει καταγραφεί ανάπτυξη της *L. monocytogenes* (a_w 0.92, Nolan et al., 1991), ενώ η μη ανάπτυξη στις εν λόγω συνθήκες μπορεί να αποδοθεί είτε στην έλλειψη της περιόδου προσαρμογής που πιθανώς χρειαζόνταν τα κύτταρα είτε στο ότι λόγω του συνδυασμού των παραγόντων τα κύτταρα αδρανοποιήθηκαν. Η διάρκεια του πειράματος, η οποία από τον σχεδιασμό ορίστηκε στις 8 ώρες, ενδεχομένως να περιόρισε την αποδοχή ορισμένων περιπτώσεων στην ενδιάμεση περιοχή σαν περιπτώσεις "ανάπτυξης". Στην

παρούσα εργασία με τη μείωση της a_w σε τιμές μικρότερες ή ίσες του 0.97 και του 0.94 για το χαμηλό και το υψηλό εμβόλιο αντίστοιχα, μειώθηκε και η πιθανότητα ανάπτυξης του βακτηρίου στην τιμή 0.1. Η προσθήκη άλατος στο τυρί ή στο γάλα είναι μια κοινή τακτική, ενώ υπάρχουν ελληνικά και ξένα τυριά. Εντούτοις, η προσθήκη άλατος λαμβάνει χώρα συνήθως από τον τεμαχισμό του πήγματος και μετά, επομένως η πιθανότητα ανάπτυξης του *L. monocytogenes*, στα προηγούμενα βήματα που το a_w είναι υψηλό (0.99), και σε περίπτωση που δεν υπάρχει άλλος περιοριστικός παράγοντας (π.χ. το pH) είναι εξίσου υψηλή (>0.9).



Σχήμα 4.2.2. Πρόβλεψη πιθανότητας ανάπτυξης της *L. monocytogenes* σε συνάρτηση με την ενεργότητα ύδατος, σε **(α)** pH 6.5 και πληθυσμό 0.6 (— — —), 2 (-----) και 3 (— — —) log CFU/gdw ή σε **(β)** πληθυσμό 1 log CFU/gdw και pH 6.5 (— — —), 6.1 (-----), 5.9 (— — —) και 5.6 (— — —).

Η στενή περιοχή των τιμών pH που εξετάστηκαν στα πειράματα (5.6 – 6.5) μπορεί να εξηγήσει την μειωμένη επίδραση του pH στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* κατά τη διάρκεια της τυροκόμησης. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε παστεριωμένο γάλα σε σταθερές τιμές pH κι ενεργότητας ύδατος, καθώς οι μικροβιακές αλληλοεπιδράσεις (σε φρέσκο γάλα) και η δυναμική κατάσταση που θα είχε σαν αποτέλεσμα η χρήση εκκινητών θα δυσχέραιναν την ερμηνεία και την παραγωγή του μοντέλου. Για τον λόγο αυτό, οι προβλέψεις του μοντέλου αναφέρονται στις αρχικές συνθήκες pH κι ενεργότητας ύδατος. Λόγω περιορισμών στην δράση της πυτιάς, κρίθηκε αδύνατο ερευνηθεί μεγαλύτερο εύρος τιμών pH. Σε προκαταρκτικά πειράματα παρατηρήθηκε ότι σε περίπτωση που το γάλα περιείχε 8% χλωριούχο νάτριο δεν μπορούσε να επιτευχθεί η πήξη του σε τιμές pH μικρότερες από 5.5. Επομένως, σαν όριο στον σχεδιασμό pH ορίστηκε το 5.6. Η δραστηριότητα του ενζύμου χυμοσίνη (πυτιά), το οποίο δρα στις καζεΐνες του γάλακτος αρχικά αποδομώντας τα μικύλια τους και στη συνέχεια δημιουργώντας συσσωματώματα, εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία και τη φωτεινότητα. Σε όξινες συνθήκες (pH 3-4) χάνει την δραστηριότητα του πιθανώς λόγω αυτό-αποδόμησης. Η χυμοσίνη είναι περισσότερο σταθερή στους 2°C από ότι σε

θερμοκρασία δωματίου, ενώ και η διαλυτότητά της εξαρτάται άμεσα από τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Έχει βρεθεί ότι είναι αδιάλυτη σε διάλυμα με $>2\text{mol/L}$ NaCl σε pH 5.5 (Fox et al., 2004, Swaminathan και Gerner-Smidt, 2007). Κατά την πειραματική διαδικασία ήταν αδύνατη η πήξη του γάλακτος στους συνδυασμούς pH 5.6 και NaCl 4.5% ή 8%, οι οποίοι και δεν συμπεριλήφθηκαν στα δεδομένα για την ανάπτυξη του μοντέλου. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές (*6 επαναλήψεις) για να αποκλειστεί πιθανή συσχέτιση του φαινομένου με την σύσταση και την κατάσταση του γάλακτος. Η αναπάντεχη αυτή έλλειψη της ικανότητας πήξης του γάλακτος στους δύο πειραματικούς συνδυασμούς ωστόσο, δεν μπορεί να αποδοθεί στην διαλυτότητα της χυμοσίνης, καθώς αυτή διαλύονταν πριν την χρήση της σε όλες τις περιπτώσεις. Θα μπορούσε να αποδοθεί σε μειωμένη δράση του ενζύμου, αν και αυτό δεν εξηγεί πως έδρασε σε pH 5.6 και 6% αλατότητα και όχι σε αλατότητες 4.5% και 8%.

Όλοι οι συνδυασμοί pH και ενεργότητας ύδατος που μελετήθηκαν θεωρούνται ότι υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε εργαστηριακά υποστρώματα σε μεγαλύτερες περιόδους επώασης (Tienungoon et al., 2000, Koutsoumanis et al., 2004, Koutsoumanis και Sofos, 2005, Boziaris et al., 2007). Εντούτοις, μόνο το 63% των συνολικών περιπτώσεων οδήγησαν σε έναρξη ανάπτυξης του παθογόνου κατά την διάρκεια της τυροκόμησης. Συγκεκριμένα, από τις 224 περιπτώσεις που μελετήθηκαν (συμπεριλαμβανομένων των τιμών που θεωρήθηκαν σαν δεδομένες), στις 138 παρατηρήθηκε ανάπτυξη του παθογόνου και στις 86 μη ανάπτυξη. Οι μεταβλητές για το pH (a_2), το επίπεδο ενοφθαλμισμού (a_3), το $b_w \cdot \text{pH}$ (a_4) και το b_w^2 (a_7) ήταν σημαντικές. Οι εκτιμήσεις του πολυωνυμικού μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης και τα τυπικά σφάλματά τους φαίνονται στον Πίνακα 4.2.2. Η συσχέτιση μεταξύ των πιθανοτήτων που προβλέφθηκαν με τα πειραματικά δεδομένα, παρουσίασε ποσοστό συμφωνίας 94.3%. Από τις ανεξάρτητες με το αρχικό πείραμα περιπτώσεις που εξετάστηκαν με σκοπό την επικύρωση του πολυωνυμικού μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης (ΠΜΛΠ) παρατηρήθηκε ότι οι προβλέψεις του είχαν καλή προσαρμογή στα δεδομένα που προέκυψαν ($R^2=0.94$, Πίνακας 4.2.4).

Η παραλλακτικότητα στην συμπεριφορά ενός μικροοργανισμού δεν περιορίζεται στο γένος και το είδος αλλά απαντάται ακόμα και μεταξύ των στελεχών του (γενότυπος και φαινότυπος). Για τον διαχωρισμό των βακτηριακών απομονώσεων και τη σύγκρισή τους με τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν (6179 και C_5), με σκοπό τον προσδιορισμό του στελέχους που υπερίσχυσε, πραγματοποιήθηκε PFGE (Kagkli et al., 2009). Από τις 191 αποικίες που απομονώθηκαν από τα τρυβλία της δειγματοληψίας στις 8 ώρες, οι 157 (82%) είχαν το ίδιο μοτίβο PFGE με το στέλεχος C_5 . Το γεγονός ότι το στέλεχος C_5 κυριάρχησε έναντι του 6179 μπορεί να αποδοθεί σε αυξημένη ικανότητα του βακτηρίου να ανταπεξέρχεται στις δυσμενείς συνθήκες μιας τυροκόμησης, λόγω της προϊστορίας του σε επιφάνειες τυροκομείου (Ribeiro et al., 2006, Gandhi and Chikindas, 2007).

Πίνακας 4.2.2. Τιμές των μεταβλητών όπως προέκυψαν από το Πολυωνυμικό Μοντέλο Λογιστικής Παλινδρόμησης (Εξ. 1).

Παράμετρος	Εκτίμηση	Τυπικό σφάλμα	Wald Chi-Sq	Pr>Chi-Sq
a ₀	-53.2942	±17.7002	9.0658	0.0026
a ₁	ns*	ns	0.0092	0.9235
a ₂	17.4885	±5.6939	9.4339	0.0021
a ₃	1.2425	±0.2736	20.6275	<0.001
a ₄	-81.7109	±28.4933	8.2238	0.0041
a ₅	ns	ns	2.6346	0.1046
a ₆	ns	ns	0.4261	0.5139
a ₇	1061.3	±431	6.0643	0.0138
a ₈	ns	ns	0.0083	0.9722
a ₉	ns	ns	2.2209	0.1362

* μη σημαντικό

Πίνακας 4.2.3. Τιμές των παραμέτρων και δείκτες στατιστικής επίδοσης του Μη Γραμμικού Μοντέλου Λογιστικής Παλινδρόμησης (Εξ. 2) προσαρμοσμένου στα πειραματικά δεδομένα ανάπτυξης/ μη ανάπτυξης χαμηλών και υψηλών πληθυσμών της *L. monocytogenes* σε TSB, γάλα και κατά τα πρώτα στάδια τυροκόμησης.

Συντελεστής	Χαμηλό επίπεδο επιμόλυνσης		Υψηλό επίπεδο επιμόλυνσης	
	εκτίμηση	P-value	εκτίμηση	P-value
^α Int TSB (β_0^{δ})	24.6864	<0.0001	32.8726	<0.0001
Int γάλα(β_0)	29.2418	<0.0001	36.093	<0.0001
Int τυροκ.(β_0)	27.1176	<0.0001	35.0751	0.029
β_1	8.4081	<0.0001	14.6666	<0.0001
β_2	7.8409	0.05	15.9338	0.135
Loglikelihood	204		280	
^γ AIC	214		282	
^δ PC	92		91.3	

^αInt: Τέμνουσα; ^βΣυντελεστής του ΠΜΛΠ Εξ. 1; ^γAIC: Κριτήριο Πληροφορίας Akaike; ^δPC: Ποσοστό συμφωνίας.

Πίνακας 4.2.4. Επικύρωση του Πολυωνυμικού μοντέλου λογιστικής Παλινδρόμησης

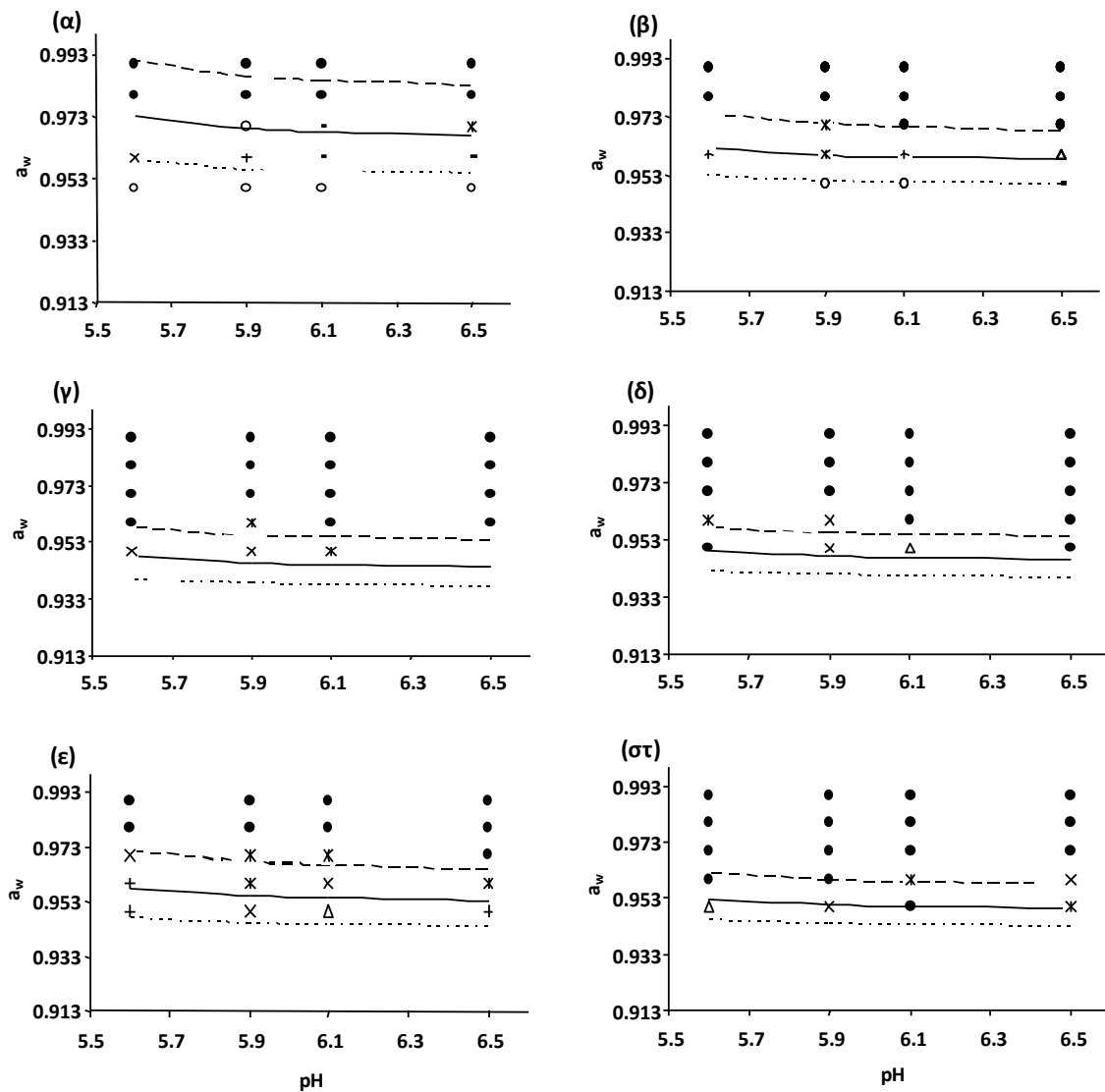
a _w	pH	Cont_ lev ^α	Observed ^β	OLRM ^γ
0.982	6.43	3.41	100%	0.99
0.969	6.44	3.71	100%	0.98
0.959	6.38	3.38	60%	0.63
0.963	6.34	2.29	40%	0.51
0.967	5.84	2.29	44%	0.5

Συνολική προσαρμογή του μοντέλου R²=0.94

^α Επίπεδο επιμόλυνσης εκφρασμένο σε log₁₀ CFU/gdw

^β Ποσοστό των περιπτώσεων που παρατηρήθηκε έναρξη ανάπτυξης

^γ Πιθανότητα έναρξης ανάπτυξης όπως προέκυψε από το ΠΜΛΠ (Εξ.1)



Σχήμα 4.2.3. Μη γραμμικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης (non linear logistic regression model) προσαρμοσμένο στα αποτελέσματα ανάπτυξης/ μη ανάπτυξης της *L. monocytogenes* σε φρέσκο τυρί (**α** και **β**), γάλα (**γ** και **δ**) και TSB (**ε** και **στ**) με αρχικούς πληθυσμούς 10^1 CFU/gdw (**α**, **γ**, **ε**) και 10^2 CFU/gdw (**β**, **δ**, **στ**), σε συνδυασμό με τις τιμές pH και a_w στους 30°C. Οι γραμμές που εμφανίζονται χωρίζουν τα επιμέρους σχήματα στα εξής τμήματα σε σχέση με την πιθανότητα ανάπτυξης: ανώτερη διακεκομμένη **p=0.9**, μεσαία συνεχής **p=0.5** και κατώτερη διακεκομμένη **p=0.1**. Σύμβολα δεδομένων: p=0 (○), p=0.33 (Δ), p=0.5 (+) p=0.66 (x), p=0,83 (*) και p=1 (●), υπολογισμένα από το ποσοστό των επαναλήψεων που εμφάνισε ανάπτυξη.

Για μια πιο ενδελεχή διερεύνηση του κατά πόσο μαθηματικά μοντέλα που βασίζονται σε δεδομένα από υγρά θρεπτικά υποστρώματα μπορούν να γενικευτούν και σε στερεά ή υγρά τρόφιμα, παστεριωμένο γάλα και TSB επιμολύνθηκαν με τους ίδιους πληθυσμούς, με αυτούς της τυροκόμησης και επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες για 8 ώρες. Όπως έχει αναφερθεί (Κεφ. 4.2.2.7.) σαν όριο ανάπτυξης θεωρήθηκαν οι 0.5 λογάριθμοι, ενώ τα δεδομένα και από τα τρία υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη ενός Μη γραμμικού μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης (ΜΜΛΠ, Εξ 2, Πιν. 4.2.3, Σχ. 4.2.3). Το ΜΜΛΠ, εκτός του ότι περιλαμβάνει περισσότερο θεμελιώδεις, βιολογικούς όρους (a_{wmin} , pH_{min}), επιλέχθηκε λόγω της καλύτερης προσαρμογής του στα δεδομένα των τριών υποστρωμάτων (υγρό εργαστηριακό, υγρό τρόφιμο, υγρό προς στερεό τρόφιμο, Schvartzman et al., 2010). Σύμφωνα με το Σχήμα 4.2.3 ανάπτυξη του πληθυσμού της *L. monocytogenes* στο 100% των περιπτώσεων παρατηρήθηκε στο χαμηλό εμβόλιο (α , γ , ϵ) σε $a_w > 0.98$, 0.95 και 0.97, για το φρέσκο τυρί, το γάλα και το TSB, αντίστοιχα, ενώ στο υψηλό εμβόλιο (β , δ , σ) σε $a_w > 0.97$, 0.95 και 0.95, για το φρέσκο τυρί, το γάλα και το TSB, αντίστοιχα. Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατά την τυροκόμηση παρατηρήθηκαν περιπτώσεις μείωσης του πληθυσμού της *L. monocytogenes*, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στις εξεταζόμενες περιπτώσεις στο γάλα και το TSB. Η διαφορά αυτές μπορούν να αποδοθούν στο ότι τα υγρά θρεπτικά μέσα λειτουργούν καλύτερα σαν υποστρώματα για την ανάπτυξη των βακτηρίων, λόγω της αυξημένης διάχυσης των πηγών ενέργειας και των κυττάρων εξίσου σε όλη την μάζα τους (Koutsoumanis et al., 2004, Hwang, 2009). Επιπλέον, στα στερεά υποστρώματα υπάρχει η πιθανότητα συνύπαρξης σε περιορισμένο χώρο (κουλότητες) μικροοργανισμών και αντιμικροβιακών παραγόντων (οξέα, αλάτι κ.α.) γεγονός που επηρεάζει όχι μόνο την πιθανότητα έναρξης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, αλλά και την μετέπειτα κινητική τους (Antwi et al., 2007, Noriega et al., 2008). Επιπλέον, πέρα από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των τυριών, σημαντική συνεισφορά στην μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε συνθήκες που προβλέπεται ανάπτυξη, έχει ο ανταγωνισμός του με μικροοργανισμούς της ενδογενούς χλωρίδας, οι οποίοι χωρίς να παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες, αυξάνονται ταχύτερα, καταναλώνοντας τα θρεπτικά συστατικά του περιβάλλοντος του παθογόνου (Guillier et al., 2008).

Εκτός από την μετακίνηση των ορίων ανάπτυξης της *L. monocytogenes* προς υψηλότερες τιμές a_w , παρατηρήθηκε επίσης ότι το εύρος της μεσεπιφάνειας A/MA στις τυροκομήσεις ήταν σημαντικά μεγαλύτερο από τα υγρά μέσα, ιδιαίτερα στο χαμηλό εμβόλιο (Σχ. 4.2.3.). Αντίθετα, το γάλα επέδειξε την χαμηλότερη και στενότερη μεσεπιφάνεια A/MA από όλα τα υποστρώματα πιθανώς λόγω της υγρής του κατάστασης, αλλά και της ρυθμιστικής του ικανότητας (Salaün et al., 2005). Το αρχικό εμβόλιο, αν και δεν συμπεριλήφθηκε σαν μεταβλητή στο μοντέλο (Εξ. 2), επηρέασε τις ελάχιστες τιμές pH και a_w , που παρατηρήθηκε ανάπτυξη του παθογόνου (Koutsoumanis και Sofos,

2005, Skandamis et al., 2007). Η συνεισφορά του pH στο μοντέλο κρίθηκε ως μη σημαντική (Πιν. 4.2.3), εντούτοις συμπεριλήφθηκε στον υπολογισμό των πιθανοτήτων 0.9, 0.5 και 0.1 των ορίων ανάπτυξης της *L. monocytogenes*. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι αν δεν ληφθεί υπόψη η σύνθεση, η πολυπλοκότητα και η μεταβλητότητα ενός στερεού τροφίμου σε ένα μαθηματικό μοντέλο βασισμένο σε υγρά υποστρώματα, τότε ενδέχεται να υπερεκτιμηθεί η ικανότητα ανάπτυξης του παθογόνου, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στον ποιοτικό υποβιβασμό του προϊόντος μέσω της υπερβολικής προσθήκης αντιμικροβιακών παραγόντων (Mejlholm et al., 2010). Η ραγδαία εξέλιξη της μικροβιολογίας πρόβλεψης σε σύντομο χρονικό διάστημα, με όλα τα οφέλη της στην υγιεινή και την ασφάλεια των τροφίμων, οφείλεται κατά ένα μεγάλο βαθμό στην χρήση υγρών εργαστηριακών μέσων για την ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων πιθανοτήτων ή κινητικής των παθογόνων. Εντούτοις, μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να εστιάσουν στην ανάπτυξη μοντέλων με την χρήση τροφίμων, έτσι ώστε να οδηγούνται σε περισσότερο ασφαλείς προβλέψεις της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών κατά την παραγωγή και διάθεση των προϊόντων.

4.2.4. Συμπεράσματα

Οι περιπτώσεις λιστερίωσης που κοινοποιούνται είναι σχετικά λίγες, η σοβαρότητα, όμως της νόσου και η υψηλή θνησιμότητά της είχε σαν αποτέλεσμα την θέσπιση πιο αυστηρών κριτηρίων για την παρουσία της *L. monocytogenes*, ιδιαίτερα σε τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση. Τα όρια ανάπτυξης του βακτηρίου στα τρόφιμα είναι μια σημαντική πληροφορία για την βιομηχανία τροφίμων καθώς οι Ευρωπαϊκοί κανονισμοί που ισχύουν διαφοροποιούνται ανάλογα με το αν το τελικό προϊόν είναι ικανό ή όχι να υποστηρίξει την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*. Τα δεδομένα της μελέτης καταδεικνύουν ότι για να καλυφθούν τα μικροβιολογικά κριτήρια, οι συνθήκες που εξασφαλίζουν μη ανάπτυξη του μικροοργανισμού, περιλαμβάνουν την προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων άλατος, γεγονός που αντιτίθεται με τις νέες τάσεις για χαμηλά σε αλάτι τρόφιμα. Τρόφιμα με χαμηλή αλατότητα, χωρίς άλλους περιοριστικούς παράγοντες, θα έχουν πάντα υψηλή πιθανότητα έναρξης της ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, επομένως, ακόμα και αν επιμολυνθούν με μερικά κύτταρα του παθογόνου ενδέχεται να παρουσιάσουν αύξηση ακόμα και τεσσάρων λογαρίθμων, πληθυσμός που ξεπερνάει κατά πολύ τα 100 CFU/g του τελικού προϊόντος που ορίζει ο Κανονισμός. Η καινοτομία της μελέτης έγκειται στο γεγονός ότι τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τρόφιμο και στις πραγματικές συνθήκες των πρώτων σταδίων μιας τυροκόμησης. Επιπλέον, η παραγωγή πολύτιμων ποσοτικών δεδομένων διαθέσιμων για τα τις μελέτες HACCP και QMRA, με τα οποία μπορεί να εκτιμηθεί και να προαχθεί η ασφάλεια των τροφίμων. Συμπερασματικά, οι προβλέψεις μαθηματικών μοντέλων βασισμένων σε δεδομένα από εργαστηριακά υποστρώματα, θα πρέπει να λαμβάνονται με προσοχή όταν χρησιμοποιούνται σε συστήματα τροφίμων, καθώς δεν αντικατοπτρίζουν πλήρως τις εσωτερικές συνθήκες ενός τροφίμου, οι οποίες αυξάνουν την μεταβλητότητα της συμπεριφοράς ενός μικροοργανισμού. Το γεγονός αυτό αντανακλά την ανάγκη παραγωγής περισσότερων δεδομένων σε τρόφιμα ή συστήματα τροφίμων και την επικύρωση των υπάρχοντων μοντέλων με τα αποτελέσματα που θα προκύψουν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΟΞΙΝΗΣ ΚΑΙ ΩΣΜΩΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΕΚΑΤΕΡΩΘΕΝ ΤΗΣ ΔΙΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΗΣ *Listeria monocytogenes* ΣΤΗΝ ΜΕΤΕΠΕΙΤΑ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΟΥ

Journal of Food Protection, 74 (1), 78–85

Applied and Environmental Microbiology 76, 6555-6563

5.1. Εισαγωγή

Η φάση προσαρμογής ενός μικροοργανισμού σε ένα νέο περιβάλλον επηρεάζεται τόσο από τις εσωτερικές (π.χ. pH και ενεργότητα ύδατος), όσο και από τις εξωτερικές (π.χ. θερμοκρασία) του ιδιότητες, καθώς και από τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων, όπως αυτή διαμορφώνεται από την προϊστορία του (τα περιβάλλοντα στα οποία έχει υπάρξει). Απότομες αλλαγές των περιβαλλοντικών παραμέτρων ενδέχεται να επάγουν τη λεγόμενη ενδιάμεση φάση προσαρμογής (Swinnen et al., 2005), η διάρκεια της οποίας εξαρτάται από το μέγεθος και την κατεύθυνση των μεταβολών. Κατά τη μοντελοποίηση της ανάπτυξης υπό δυναμικές συνθήκες, γίνεται συνήθως η υπόθεση ότι η ταχύτητα ανάπτυξης των κυττάρων προσαρμόζεται στιγμιαία στις απότομες αλλαγές θερμοκρασίας, τη στιγμή που υπάρχουν ενδείξεις για την επαγωγή μιας σύντομης φάσης προσαρμογής πριν την συνέχιση της ανάπτυξης (Alavi et al., 1999, Baranyi και Roberts, 1994, Mitchell et al., 1994, Mitchell et al., 1995). Η ποσοτικοποίηση της επίδρασης των θερμοκρασιακών μεταβολών στην φάση προσαρμογής των βακτηρίων έχει μελετηθεί εκτενέστερα (Zwietering et al., 1994, Augustin et al., 2002, Whiting και Bagi, 2002, Mellefont και Ross, 2003, Swinnen et al., 2005, 2006), σε σχέση με την αντίστοιχη επίδραση των οσμωτικών μεταβολών (Mellefont et al., 2003, 2004, 2005), ενώ υπάρχει έλλειψη πληροφοριών σχετικά με τις μεταβολές του pH. Μελέτες υποδεικνύουν ότι προηγούμενη επώαση της *L. monocytogenes* στους 4°C έχει σαν αποτέλεσμα ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης στους 7°C, από αυτό που θα είχε με προηγούμενη επώαση στους 7°C (Membré et al., 1998). Επομένως, παρατηρείται αβεβαιότητα σχετικά με τον ρόλο των προηγούμενων περιβαλλοντικών συνθηκών, δηλαδή της επίδρασης της προϊστορίας ενός εμβολίου στην μετέπειτα ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Η πλέον χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για την ποσοτικοποίηση της επίδρασης των ξαφνικών μεταβολών του περιβάλλοντος στη φάση προσαρμογής των βακτηρίων βασίζεται στο ποσό της προσπάθειας ή "δουλειάς", την οποία πρέπει να καταβάλουν τα κύτταρα για να εισέλθουν σε φάση πολλαπλασιασμού (Q_0) και τον ρυθμό που αυτή η "δουλειά" πραγματοποιείται (work to be done, h_0 ,

Robinson et al., 1998, Mellefont et al., 2003). Σύμφωνα με την συγκεκριμένη προσέγγιση, αν οι μεταβολές στο περιβάλλον δεν θέτουν επιπλέον προσπάθεια για προσαρμογή, τότε το αντίστροφο του χρόνου προσαρμογής (ο λεγόμενος ρυθμός προσαρμογής ν , Mellefont και Ross, 2003) και ο ρυθμός ανάπτυξης θα πρέπει να ακολουθούν την ίδια κλίση, σε συνάρτηση με τη μεταβολή και ως εκ τούτου να σχετίζονται γραμμικά. Αυτό μπορεί αληθεύει για ορισμένες θερμοκρασιακές μεταβολές μικρού μεγέθους (της τάξης των 3-5°C), οι οποίες πραγματοποιούνται μακριά από τα όρια ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Εντούτοις, η γραμμικότητα χάνεται όταν η καταπόνηση που επιβάλλεται από την μεταβολή είναι τόσο μεγάλη που τα βακτήρια αδυνατούν να προσαρμοστούν στις νέες συνθήκες μόνο με τους μηχανισμούς ομοιόστασης και επομένως απαιτείται πρόσθετη προσπάθεια. Ανάγκη για επιπλέον έργο εκ μέρους των κυττάρων συναντάται συνήθως στις όξινες και ωσμωτικές μεταβολές, οι οποίες θεωρούνται δριμύτερες καταπονήσεις από τις θερμοκρασιακές (Robinson et al., 1998, Shabala et al., 2008), ή σε μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κοντά στα όρια ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Όσον αφορά το τελευταίο, σε πειράματα με τον *Lactobacillus plantarum*, ο χρόνος προσαρμογής (lag ή λ) υπολογίστηκε με ακρίβεια μετά από θερμοκρασιακές αυξήσεις (upshifts), ενώ σε αντίστοιχες μειώσεις (downshifts) της θερμοκρασίας που πραγματοποιούνταν κοντά στα όρια ανάπτυξης παρουσιάστηκαν σημαντικές παρεκκλίσεις, γεγονός που δυσκόλευσε την πρόβλεψη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Zwietering et al., 1994).

Η συμπεριφορά των βακτηρίων στις δυναμικές περιβαλλοντικές συνθήκες ποικίλει ανάλογα με το γένος, την κυτταρική δομή κ.α. Για παράδειγμα, ο χρόνος προσαρμογής των αρνητικών κατά Gram *Escherichia coli* και *Salmonella* αυξάνονταν μη-γραμμικά, καθώς οι ωσμωτικές συνθήκες γινότουσαν λιγότερο ευνοϊκές για την ανάπτυξη των βακτηρίων, γεγονός που υποδηλώνει την ανάγκη για επιπλέον προσπάθεια προσαρμογής τους μετά τις μεταβολές. Αντιθέτως, τα θετικά κατά Gram βακτήρια θεωρούνται περισσότερο ανθεκτικά στην ωσμωτική καταπόνηση, σε σχέση με τα Gram αρνητικά, εξαιτίας των έμφυτων μηχανισμών της ενδοκυτταρικής πίεσης (Mellefont et al., 2003). Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα των προαναφερθέντων ερευνών περιορίζονται σε παρατηρήσεις περιβαλλοντικών μεταβολών εντός των ορίων ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Άλλη μία σημαντική υπόθεση στην μοντελοποίηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι το κατά πόσο περιβαλλοντικές μεταβολές εκατέρωθεν των ορίων αύξησής τους, επάγουν επιπλέον προσπάθεια προσαρμογής των κυττάρων, σε σύγκριση με μεταβολές εντός των ορίων ανάπτυξης, ή αντιθέτως δρουν βοηθητικά στα κύτταρα επιτρέποντάς τους να προσαρμοστούν στις δυσμενείς συνθήκες, διευκολύνοντας έτσι την μετέπειτα αύξησή τους. Οι Mitchell et al. (1995) υποστήριξαν ότι παρατεταμένη έκθεση σε θερμοκρασίες μη ευνοϊκές για την ανάπτυξη του *Salmonella*, μπορεί να επηρεάσει την επακόλουθη ανάπτυξη του βακτηρίου στις θερμοκρασίες. Εντούτοις, αν και είναι γνωστό ότι μεταβολές της ενεργότητας ύδατος προς πιο δυσμενείς συνθήκες επάγουν επιπλέον

έργο προσαρμογής (Mellefont et al., 2003, 2004, 2005, Mellefont και Ross, 2003) στα κύτταρα, δεν υπάρχουν πληροφορίες για την ανάπτυξη υπό δυναμικές συνθήκες pH ή για ωσμωτικές και όξινες μεταβολές διαμέσου των ορίων ανάπτυξης. Τέτοιου είδους γνώση είναι σημαντική για την ανάπτυξη και την βελτιστοποίηση των μαθηματικών μοντέλων ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, λόγω της ευρείας παρουσίας του στη φύση, και της πιθανής έκθεσής του σε συνθήκες που είτε ευνοούν ή περιορίζουν την αύξησή του, όπως σε προϊόντα με χαμηλό pH ή/και χαμηλή ενεργότητα ύδατος (a_w), ή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και της ωρίμασης αλλαντικών ή τυροκομικών προϊόντων.

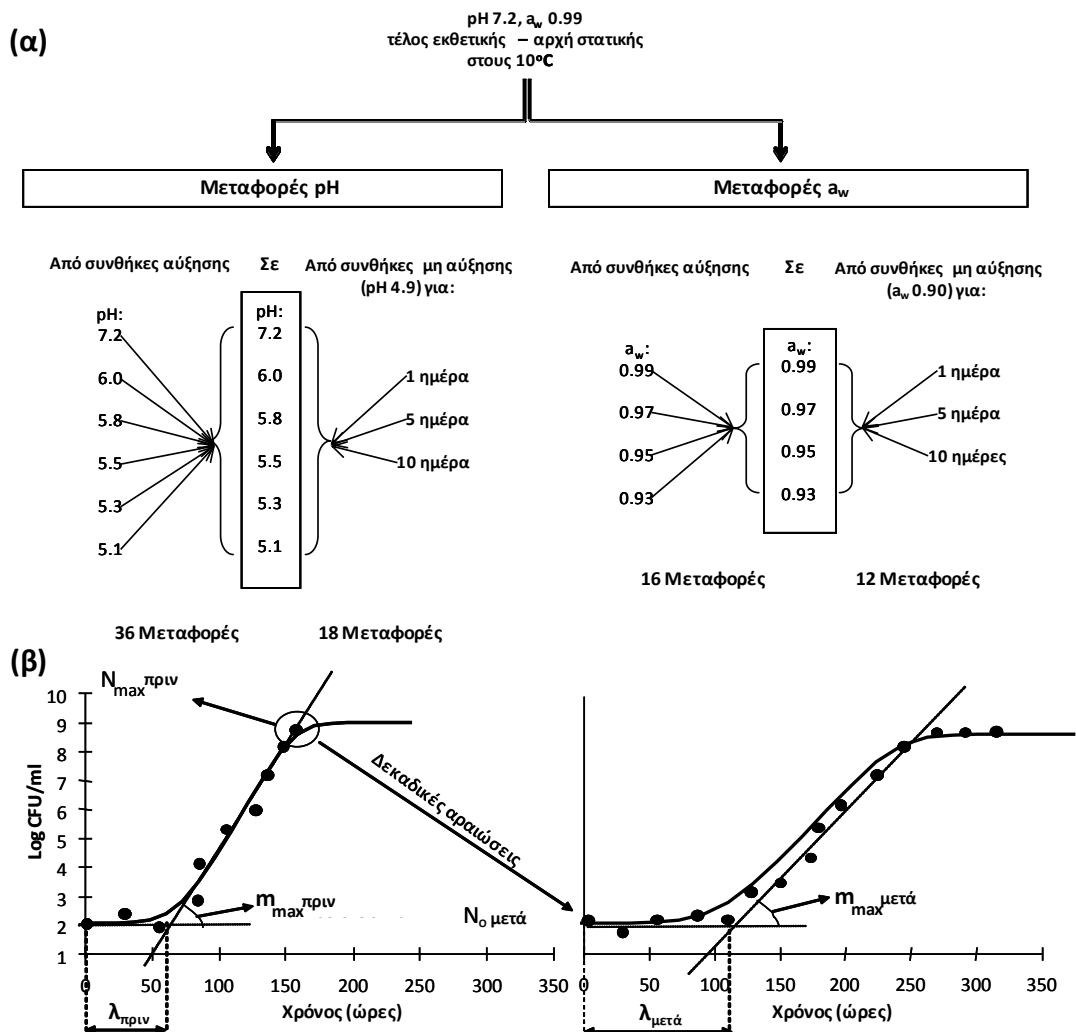
Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* κάτω από: (i) περιβαλλοντικές μεταβολές μέσα στο εύρος του pH και της a_w που επιτρέπουν την ανάπτυξη του βακτηρίου, (ii) μεταβολές από βέλτιστες συνθήκες a_w (0.995) ή pH (7.2) σε συνθήκες μη ανάπτυξης (12.5% NaCl ή pH 4.9), παρατεταμένη έκθεση σε αυτές για 1, 5 ή 10 ημέρες και στη συνέχεια μεταφορά σε συνθήκες ανάπτυξης και τέλος, η ανάπτυξη ενός μαθηματικού μοντέλου, το οποίο να περιλαμβάνει την επίδραση των παραπάνω μεταβολών.

5.2. Υλικά και μέθοδοι

5.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Για τους σκοπούς της μελέτης πραγματοποιήθηκε ένα σύνολο πειραμάτων από 82 περιπτώσεις ανάπτυξης της *L. monocytogenes* σε TSBYE με διαφορετικές συστάσεις οξύτητας και αλατότητας. Εξετάστηκαν 6 τιμές pH: 7.2, 6.0, 5.8, 5.5, 5.3 και 5.1 (σε a_w : 0,995), και 4 τιμές a_w : 0.995, 0.97, 0.95 και 0.93 (σε pH: 7,2). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν μεταφορές από περιβάλλοντα με τις 6 αρχικές τιμές pH σε όλες τις 6 ίδιες τιμές (σύνολο 36 αλλαγές pH), όπως επίσης μεταφορές από τις 4 αρχικές τιμές a_w σε όλες στις 4 ίδιες τιμές (σύνολο 16 αλλαγές a_w). Με αυτόν τον τρόπο μελετήθηκε η συμπεριφορά του παθογόνου κατά την μεταφορά του σε περισσότερο δυσμενείς συνθήκες (χαμηλότερα pH ή a_w , downshifts), σε πιο ευνοϊκές συνθήκες (pH και a_w , upshifts), και τέλος σε συνθήκες ίδιες με αυτές που προϋπήρχαν (Σχ. 5.1.α). Οι μεταφορές πραγματοποιήθηκαν όταν τα κύτταρα βρισκότουσαν σε μία κατάσταση μεταξύ του τέλους της εκθετικής φάση και της αρχής της στατικής φάσης (έπειτα από προκαταρκτική τυποποίησης της διαδικασίας ανάπτυξης του παθογόνου στις συνθήκες που μελετήθηκαν), με δεδομένη την επίδραση που έχουν οι δύο διαφορετικές φάσεις στην μετέπειτα φάση προσαρμογής του παθογόνου σε νέο περιβάλλον (Whiting και Bagi, 2002). Σε πολλές περιπτώσεις στην φύση, σε ένα τρόφιμο ή στο περιβάλλον μιας βιομηχανίας η *L. monocytogenes* καλείται να επιβιώσει σε συνθήκες υποθανάτιας καταπόνησης επί μακρόν, προτού βρεθεί ξανά σε ένα ευνοϊκό για την αύξησή του περιβάλλον. Σε μία προσπάθεια μελέτης της συμπεριφοράς του μικροοργανισμού μετά από μια τέτοια πορεία, πραγματοποιήθηκαν πειράματα εξοικείωσής (habituation) του σε συνθήκες μη ανάπτυξης, για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και στη συνέχεια μεταφορά των κυττάρων σε όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, έγινε μεταφορά κυττάρων από τις άριστες συνθήκες του μέσου καλλιέργειας a_w (0.995) και pH (7.2) σε συνθήκες μη ανάπτυξης (παρατεταμένη επιβίωση, pH 4.9 ή a_w 0.90), στις οποίες παρέμειναν για περίοδο 1, 5 ή 10 ημερών στους 10°C και μεταφέρθηκαν οι μεν περιπτώσεις pH στις 6 εξεταζόμενες τιμές pH ανάπτυξης, οι δε περιπτώσεις a_w στις 4 εξεταζόμενες τιμές a_w ανάπτυξης (Σχ. 5.1.α). Οι διαφορετικές ημέρες της παραμονής σε συνθήκες μη ανάπτυξης επιλέχθηκαν με σκοπό την μελέτη της επίδρασης το χρόνου παραμονής της *L. monocytogenes* σε δυσμενείς συνθήκες στην προσαρμοστικότητά του και την κινητική του σε επόμενα περιβάλλοντα. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η επιλογή των μεταβολών έγινε με σκοπό την προσομοίωση μιας πιθανής διασταυρούμενης επιμόλυνσης μεταξύ προϊόντων με φυσικοχημικές ιδιότητες που δεν επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου (π.χ. τυριά) σε προϊόντα με άριστες ή ευνοϊκές συνθήκες (π.χ. γάλα, ενδιάμεσα προϊόντα). Η συντήρηση των θρεπτικών υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση στους 10°C, σε υψηλής ακρίβειας ($\pm 0.5^\circ\text{C}$)

επωαστικούς θαλάμους. Η επιλογή των 10°C σαν θερμοκρασία επώασης έγινε για να διασφαλιστεί η ανάπτυξη του παθογόνου σε μεγαλύτερο εύρος συνθηκών pH και a_w (σε σχέση με τους 4°C) και με αυτόν τον τρόπο να εξαχθούν περισσότερο λεπτομερή στοιχεία για την επίδραση των μεταβολών οξύτητας και αλατότητας στην ανάπτυξη του βακτηρίου. Επιπλέον, οι 10°C αποτελούν μια μέση θερμοκρασία στους χώρους παραγωγής και ωρίμασης των τυροκομικών προϊόντων.



Σχήμα 5.1. Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού σχεδιασμού (α) και της πειραματικής διαδικασίας (β). Τα βέλη στο σχήμα α δείχνουν τις μεταβολές σε όλες τις 6 τιμές pH ή τις 4 τιμές a_w , που αναφέρονται κάθετα, η διαδικασία των οποίων περιγράφεται στο σχήμα β και ακολουθεί επώαση στους 10°C. Οι περιπτώσεις αριστερά των τιμών στο κάθετο παραλληλόγραμμο αντιπροσωπεύουν μεταβολές μεταξύ των συνθηκών ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, ενώ οι περιπτώσεις στα δεξιά αντιπροσωπεύουν την παρατεταμένη έκθεση του παθογόνου σε συνθήκες μη ανάπτυξης (pH 4.9 ή a_w 0.90) για 1, 5 και 10 ημέρες και την μεταφορά του σε συνθήκες ανάπτυξης, όπως απεικονίζεται στο γράφημα.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αποτέλεσαν την βάση για την ανάπτυξη ενός τροποποιημένου πρωτογενούς μοντέλου Baranji κι ενός δευτερογενούς μοντέλου θεμελιωδών παραμέτρων, τα οποία συμπεριελάμβαναν την επίδραση της μεταφοράς του παθογόνου μεταξύ τιμών pH και a_w ανάπτυξης ή από τιμές μη ανάπτυξης σε τιμές ανάπτυξης, στην φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων του (Q). Η επικύρωση του δευτερογενούς μοντέλου πραγματοποιήθηκε σε φρέσκο παστεριωμένο γάλα στους 10°C κάτω από δυναμικές συνθήκες οξύτητας και αλατότητας.

5.2.2. Επιλογή στελεχών και προετοιμασία του εμβολίου

Το σύνολο της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στελέχους *L. monocytogenes* C₅ (ορότυπος 4b) απομονωμένο από περιβάλλον τυροκομείου, μετά από χρόνια επιβίωση (10 ετών). Το στέλεχος επιλέχθηκε μετά από προκαταρκτικά πειράματα ανάμεσα σε διάφορα στελέχη (απομονωμένα από τυροκομικά προϊόντα, εξοπλισμό τυροκομείου και επιδημικό), στις συνθήκες pH και αλατότητας της κύριας μελέτης και αφού επέδειξε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης και μικρότερη φάση προσαρμογής). Το στέλεχος παρέμενε αποθηκευμένο στους -22°C σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSBYE παρουσία 20% γλυκερόλης (Glycerine 4810, Βέλγιο). Για την ενεργοποίησή της καλλιέργειας 0.1 ml από την αποθηκευμένη καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε 10 ml TSBYE και επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. Το εμβόλιο εργασίας προετοιμάστηκε με επώαση 0.1 ml της προηγούμενης καλλιέργειας σε 10 ml TSBYE στους 37°C για 16 ώρες, διάρκεια στην οποία ολοκληρώνεται η εκθετική φάση (10^{8-9} CFU/ml). Ακολούθησε διπλή έκλυση του εμβολίου με φυγοκέντρηση (3600 x g for 15 min at 4°C; Heraeus Instruments Megafuge 1.0 R) και επανέωρηση σε 10 ml MRD. Ο βακτηριακός πληθυσμός του τελευταίου αιωρήματος, ο οποίος είχε προσδιοριστεί μετά από πολλαπλές ανεξάρτητες μετρήσεις στα 10^9 CFU/ml, αραιώθηκε διαδοχικά μέχρι τα 10^4 CFU/ml, ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν το αρχικό εμβόλιο.

5.2.3. Προετοιμασία υποστρωμάτων

Στο σύνολο των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε TSBYE στην εμπορική του σύσταση (με γλυκόζη), με την παραδοχή ότι ενδεχόμενη οξεοανθεκτικότητα εξαιτίας της μικρής ποσότητας γλυκόζης που περιείχε 0.25%, δεν θα επιδρούσε σημαντικά στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes*. Για την επίτευξη των ζητούμενων τιμών pH του υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε ο μικρότερος δυνατός όγκος συμπυκνωμένου γαλακτικού οξέος 85% w/w (Sigma-Aldrich Ltd., Greece), και εφόσον κρίνονταν απαραίτητα κλάσματα του ml από 10N NaOH (Sodium Hydroxide pellets, Panreac, Ισπανία). Ο μέγιστος όγκος συμπυκνωμένου γαλακτικού οξέος που χρειάστηκε για την επίτευξη της χαμηλότερης τιμής pH (4.9) σε 100 ml εμπορικού TSBYE (αρχικό pH 7.2) σύμφωνα με τις υποδείξεις

του κατασκευαστή, σε φιάλες Duran (Duran Group GmbH, Γερμανία) των 250 ml, ήταν 0.6 ml. Για τα υποστρώματα με τροποποιημένο a_w , πραγματοποιήθηκε προσθήκη 0, 4.5, 7.5, 10 και 12 g NaCl σε 100 ml TSBYE (περιεκτικότητα σε NaCl 0.5%), σε φιάλες Duran των 250 ml. Επομένως, η τελική συγκέντρωση του άλατος στα υποστρώματα ήταν 0.5, 5, 8, 10.5 και 12.5%. Οι τιμές pH και ενεργότητας ύδατος όλων των υποστρωμάτων μετρήθηκαν μετά την αποστείρωση με ηλεκτρόδιο pH (pH 691, Metrohm, Zofingen, Ελβετία) και ενεργόμετρο (HygroLab, Rotronic, Bassersdorf, Ελβετία), αντίστοιχα. Δύο ζεύγη από την κάθε περίπτωση παρασκευάστηκαν για τη διεξαγωγή δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

5.2.4. Ενοφθαλμισμός υποστρωμάτων

Όλα τα παρασκευασμένα υποστρώματα (TSBYE, Κεφ. 5.2.3.) ενοφθαλμίστηκαν με 10^{2-3} κύτταρα/ml της *L. monocytogenes* C₅ από το τέλος της εκθετικής της φάσης και επώαστηκαν στους 10°C. Ο προσδιορισμός του πληθυσμού των κυττάρων της *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία TSAYE, με τη βοήθεια του οργάνου επιφανειακής σπειροειδούς εξάπλωσης Spiral plater (Bio) και μετέπειτα επώαση στους 37°C για 24 ώρες. Όταν το παθογόνο βρισκόταν ανάμεσα στο τέλος της εκθετικής και την αρχή της στατικής φάσης (περίπου 8-9 log CFU/ml) σε κάθε μία από τις εξεταζόμενες περιπτώσεις, ποσότητα 1 ml, έπειτα από δεκαδική αραίωση σε MRD, μεταφερόταν σε όλες τις υπόλοιπες συνθήκες ανάπτυξης pH (5.1-7.0, 36 περιπτώσεις) και a_w (0.93-0.995, 16 περιπτώσεις), έτσι ώστε το αρχικό επίπεδο της *L. monocytogenes* στα νέα υποστρώματα να είναι περί τα 10^2 CFU/ml (Σχήμα 5.1.β). Οι δύο παράγοντες μελετήθηκαν ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο. Επιπλέον, κύτταρα της *L. monocytogenes* που είχαν παραμείνει για 1, 5 ή 10 ημέρες στους 10°C σε περιοριστικές συνθήκες ανάπτυξης- pH 4.9 (a_w 0.995) ή αλατότητα 12.5% (pH 7.2) σε επίπεδο 10^4 CFU/ml (στο σύνολο των ημερών), μεταφέρθηκαν σε όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες ανάπτυξης. Οι αναλύσεις για τον προσδιορισμό του πληθυσμού του παθογόνου πραγματοποιούνταν ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (από 6 ώρες έως και 3 ημέρες), τα οποία εξαρτιόνταν από την αναμενόμενη ταχύτητα ανάπτυξης και διάρκεια προσαρμογής του βακτηρίου σε κάθε συνθήκη.

5.2.5. Προσαρμογή των καμπυλών ανάπτυξης

Τα πειραματικά δεδομένα από τις μετρήσεις των αποικιών του μικροοργανισμού μετατράπηκαν σε τιμές \log_{10} . Τα λογαριθμικά δεδομένα προσαρμόστηκαν στο μοντέλο Baranyi με τη βοήθεια του προγράμματος DMFit 2.1 (Baranyi και Roberts, 1994), για τον υπολογισμό του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης μ_{\max} (ώρες⁻¹), και της αδιάστατης παραμέτρου h_0 που αντιπροσωπεύει το έργο προσαρμογής “work-to-be-done” των κυττάρων πριν εισέλθουν στην εκθετική φάση

ανάπτυξης (Robinson et al., 1998), το οποίο είναι επίσης ανάλογο του σχετικού χρόνου προσαρμογής (RLT: Mellefont et al., 2003, Mellefont και Ross, 2003). Οι τιμές του μ_{max} , του χρόνου προσαρμογής και του h_0 υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε ανάλυση διακύμανσης (one-way analysis of variance) και οι διαφορές των ελαχίστων τετραγώνων εκτιμήθηκαν με το τεστ Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0.05$.

5.2.6. Ανάπτυξη του τροποποιημένου πρωτογενούς μοντέλου Baranyi

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν την θεωρητική βάση για την ανάπτυξη ενός τροποποιημένου πρωτογενούς μοντέλου Baranyi, στο οποίο συμπεριλαμβάνεται η επίδραση της μεταφοράς του παθογόνου μεταξύ τιμών pH και a_w ανάπτυξης ή από τιμές μη ανάπτυξης σε τιμές ανάπτυξης, στην φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων του (Q). Το μοντέλο βασίστηκε στο κλασικό πρωτογενές μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994), στο οποίο τροποποιήθηκε η ποσοτικοποίηση της φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων (Q_0) σε Q_s (s: shifts, μεταβολές), ώστε να περιλαμβάνει το επιπλέον έργο, το οποίο ενδέχεται να επάγεται στα κύτταρα από τις περιβαλλοντικές μεταβολές, σύμφωνα με την εξίσωση **(1)**:

$$Q_s = -\ln\left(\frac{e^{h_s} - 1}{e^{h_s}}\right) \quad (1)$$

στην οποία, το Q_s εκφράζεται σαν συνάρτηση του h_s . Στην κλασική εξίσωση το Q_0 εξαρτάται από το h_0 ($h_0 = \nu \cdot \text{lag}$), με την παραδοχή ότι η ταχύτητα προσαρμογής (ν) έχει γραμμική σχέση με τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης ($\nu = \mu_{max}$). Στην Εξίσωση 1 το h_s είναι το ποσό του έργου που απαιτείται πριν την ανάπτυξη στο νέο περιβάλλον, για τις μεταφορές που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των ορίων ανάπτυξης, ενώ για τις αντίστοιχες μεταφορές εκατέρωθεν των ορίων ανάπτυξης αντιπροσωπεύει το ποσό που συνεχίζει να απαιτείται από τα κύτταρα μετά την μεταφορά τους από ένα περιβάλλον ήπιας καταπόνησης σε συνθήκες ανάπτυξης.

Η ποσοτικοποίηση του h_s έγινε ανά περίπτωση, με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι όξινες και οσμωτικές μεταβολές προς περισσότερο ευνοϊκές συνθήκες ($\Delta a_w > 0$ ή $\Delta \text{pH} > 0$) δεν εισήγαγαν ενδιάμεση φάση προσαρμογής. Επομένως, πρόσθετο έργο προσαρμογής για τις μεταβολές εντός των ορίων ανάπτυξης θεωρήθηκε ότι εμφανίζεται μόνο σε μεταβολές προς δριμύτερες συνθήκες ($\Delta a_w, \Delta \text{pH} < 0$). Ιδιαίτερα στις όξινες μεταβολές το h_s φάνηκε ότι αυξάνεται σημαντικά σε μεταφορές κοντά στην διεπιφάνεια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης (pH 5.1). Στις περιπτώσεις αυτές, το έργο δίνεται από τις παρακάτω εξισώσεις για την ενεργότητα ύδατος **(2)** και το pH **(3)**, αντίστοιχα:

$$h_s = \begin{cases} f(\Delta a_w, a_{wf}) & \text{if } \Delta a_w \leq -0.02 \\ 0 & \end{cases} \quad (2)$$

$$h_s = \begin{cases} \max[f(V_1, V_2, V_3), 0] & \Delta pH \leq -0.2 \\ 0 & \end{cases} \quad (3)$$

και

$$V_1 = \Delta pH^2, V_2 = \left(\frac{1}{pH_i - pH_{\min}} \right)^2 \text{ και } V_3 = \left(\frac{1}{pH_f - pH_{\min}} \right)^2$$

όπου

στις οποίες, το Δa_w είναι η μεταβολή της ενεργότητας ύδατος, το a_{wf} είναι η ενεργότητα ύδατος μετά την μεταβολή, το f είναι γραμμική συνάρτηση του Δa_w , η οποία εκτίνεται με όρους αλληλεπίδρασης, ενώ για το pH, το ΔpH είναι η διαφορά του τελικού pH_f μείον το αρχικό pH_i του υποστρώματος, pH_{\min} είναι ελάχιστη θεωρητική τιμή pH, στην οποία μπορεί ο μικροοργανισμός να αυξηθεί και f είναι μια δευτερογενής πολυωνυμική συνάρτηση (Le Marc et al., 2010).

Για την ποσοτικοποίηση του έργου προσαρμογής από τις μεταβολές εκατέρωθεν των ορίων ανάπτυξης, έγιναν οι παρακάτω παραδοχές: i) η μεταβολή από συνθήκες ανάπτυξης σε συνθήκες μη ανάπτυξης (pH 4.9 ή 12,5% NaCl) εκφράστηκε από τον όρο Q_1 αντί του κλασσικού όρου Q στο πρωτογενές μοντέλο Baranyi, ii) ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες εκτίθεται ο παθογόνος σε συνθήκες μη ανάπτυξης αλλάζει η ταχύτητα προσαρμογής του, η οποία εκ των πραγμάτων δεν ισούται με το μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, που στις συνθήκες αυτές είναι μηδέν. Επομένως, είτε τα κύτταρα πραγματοποιούν κάποιο από το έργο προσαρμογής στις συνθήκες μη ανάπτυξης ($v > 0$), και αυξάνονται γρηγορότερα στη συνέχεια, είτε καταπονούνται σημαντικά ($v < 0$) και καθυστερείται η αύξησή τους στο νέο περιβάλλον. Η τελευταία υπόθεση περιγράφεται από την εξίσωση (4):

$$v = \begin{cases} v_a & \text{if } \mu_{\max} = 0 \\ \mu_{\max} & \text{if } \mu_{\max} > 0 \end{cases} \quad (4)$$

iii) το έργο προσαρμογής εξαρτάται και από τις καινούριες συνθήκες ανάπτυξης, καθώς όσο πιο κοντά βρίσκονται στην διεπιφάνεια ανάπτυξης τόσο περισσότερο έργο προσαρμογής απαιτείται από τα κύτταρα. Η συγκεκριμένη παραδοχή εκφράζεται στις αντίστοιχες εξισώσεις για τα a_w (5) και pH(6):

$$h_2 = \frac{\beta_{aw}}{(a_w - a_{w\min})^2} \quad (5)$$

$$h_2 = \frac{\beta_{pH}}{(pH - pH_{\min})^2} \quad (6)$$

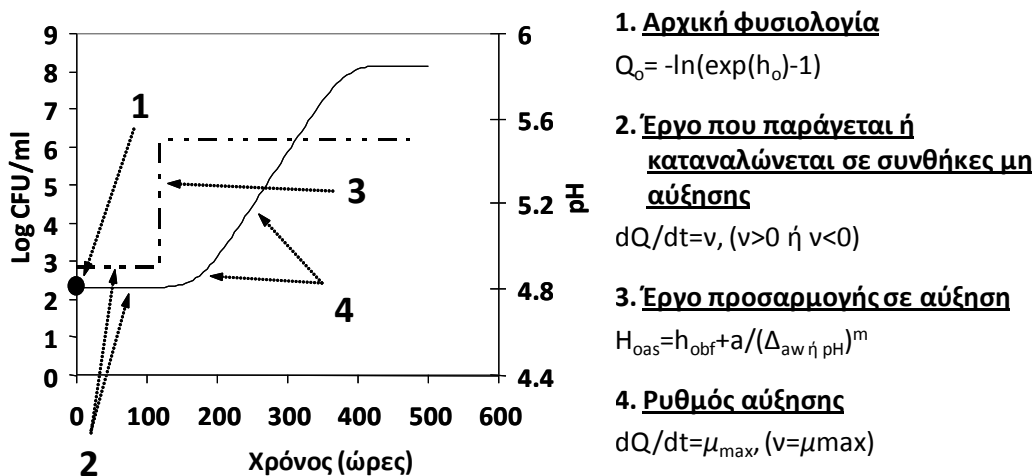
όπου β_{aw} και β_{pH} είναι παράμετροι, τα a_w και pH είναι τα επίπεδα μετά την μεταβολή και $a_{w\min}$ και pH_{\min} είναι οι ελάχιστες τιμές στις οποίες μπορεί να πραγματοποιηθεί ανάπτυξη του παθογόνου. Η

τελευταία παραδοχή είναι ότι το συνολικό έργο προσαρμογής είναι το άθροισμα του ανολοκλήρωτου έργου προσαρμογής ακριβώς πριν την μεταβολή (h_{bs} , bs: before shift) με το έργο που απαιτείται στο νέο περιβάλλον (h_2) και περιγράφεται από τις παραπάνω εξισώσεις ($h_s = h_{bs} + h_2$, Εξίσωση 7, Munoz-Cuervas et al., 2010, Le Marc et al., 2010). Στη συνέχεια, από το συνολικό έργο προσαρμογής (h_s) υπολογίζεται και το Q_s (τροποποιημένο από το Q του κλασσικού μοντέλου), με βάση την Εξ. 1. Μια περίληψη της περιγραφής της θεωρητικής βάσης για τις τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν φαίνεται στο Σχήμα 5.2.

Ο υπολογισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) της *L. monocytogenes* στο νέο περιβάλλον πραγματοποιήθηκε με την χρήση του δευτερογενούς μοντέλου θεμελιωδών παραμέτρων (Cardinal Parameters Model, CPM; Rosso et al., 1995), τροποποιημένου με προσθήκη του όρου ξ , όπως έχει προταθεί από τους Le Marc et al. (2002) και τους Mejlholm και Dalgaard (2007), με σκοπό την βελτίωση της περιγραφής των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των περιβαλλοντικών παραγόντων κοντά στα όρια ανάπτυξης. Το μοντέλο αναπαριστάται στην Εξίσωση (8):

$$\mu_{max} = \mu_{maxref} \tau(10) \gamma(pH) \rho(a_w) \xi(10, pH, a_w) \quad (8)$$

όπου το μ_{maxref} είναι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στους 25°C, όταν οι υπόλοιπες συνθήκες είναι άριστες, οι όροι $\tau(10)$ (μετασχηματισμός από το $\tau(T)$, με δεδομένο ότι στο πείραμα η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 10°C), $\gamma(pH)$ και $\rho(a_w)$ χαρακτηρίζουν την επίδραση της θερμοκρασίας, του pH και της ενεργότητας ύδατος, αντίστοιχα και υπολογίζονται από εξισώσεις που έχουν προταθεί από τους Mejlholm και Dalgaard, (2007), όπως και ο όρος αλληλεπίδρασης ξ . Όλες οι καμπύλες που προέκυψαν, προσαρμόστηκαν αρχικά ξεχωριστά και στην συνέχεια σαν σύνολο με την χρήση των εξισώσεων 2 με 8 στο πρωτογενές μοντέλο Baranyi, με την βοήθεια του προγράμματος DMFit 2.1, από το οποίο προέκυψαν τα μ_{max} , \log , γ_{max} , Q_1 , v_a , β_{aw} , β_{pH} , a_{wmin} και pH_{min} . Η καλή συμφωνία μεταξύ των προβλέψεων και των παρατηρήσεων εξετάστηκε με την μέση απόλυτη διαφορά (MAD) και την μέση τετραγωνική ρίζα (RMSE).



Σχήμα 5.2. Θεωρητική βάση της τροποποίησης του πρωτογενούς μοντέλου Baranji. Στο σχήμα περιγράφεται η διαφοροποίηση της ποσοτικοποίησης της φυσιολογικής κατάστασης του κυττάρου (Q), ανάλογα με συνθήκες του περιβάλλοντος. Με την διακεκομμένη γραμμή συμβολίζεται η μεταβολή της οξύτητας του μέσου από μία τιμή μη ανάπτυξης (2) σε τιμή ανάπτυξης (3).

5.2.7. Επικύρωση του μοντέλου σε γάλα

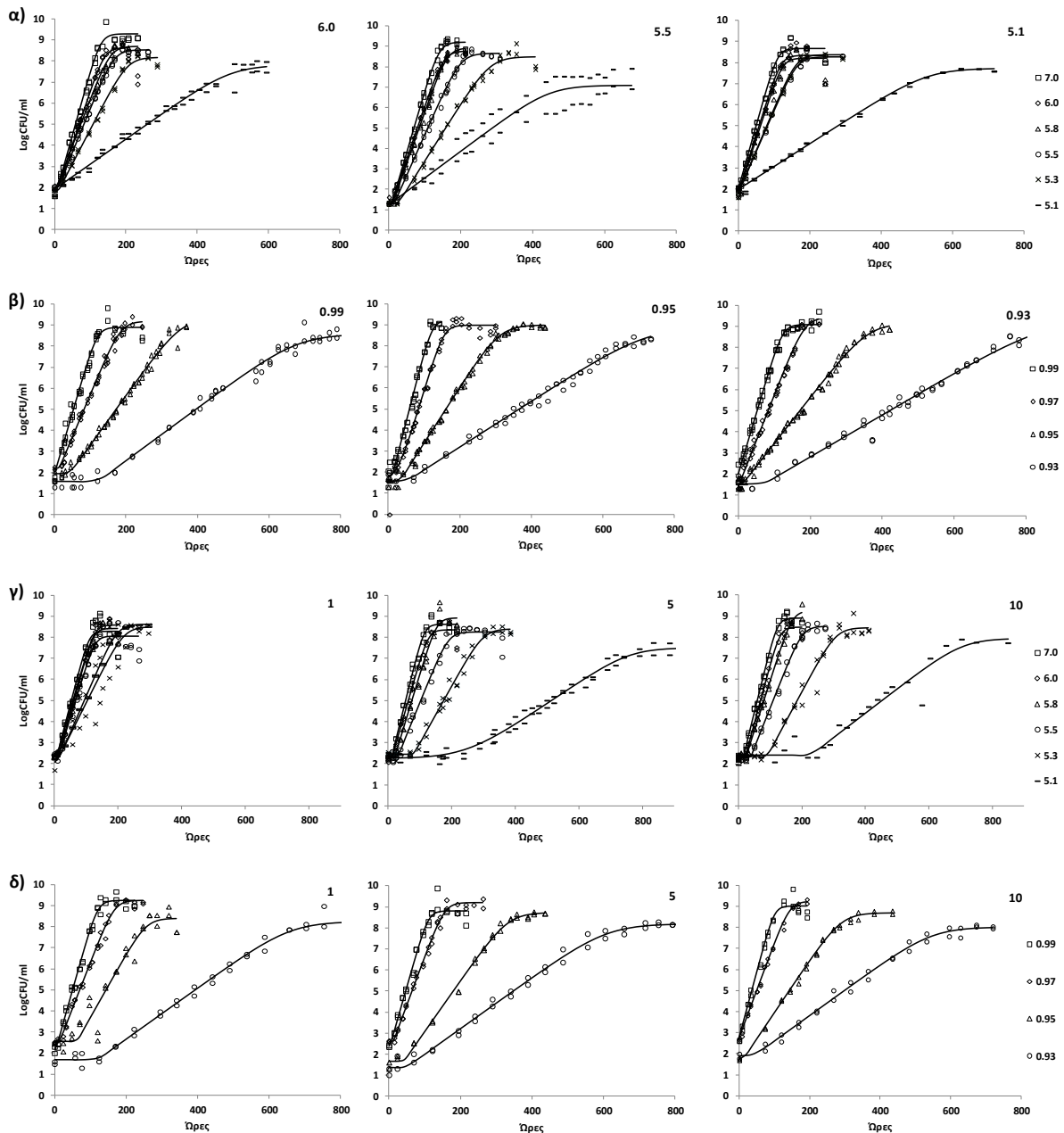
Για την επικύρωση του τροποποιημένου πρωτογενούς μοντέλου Baranji πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε γάλα στους 10°C κάτω από δυναμικές συνθήκες οξύτητας και αλατότητας. Πιο αναλυτικά, πλήρες φρέσκο παστεριωμένο γάλα του εμπορίου ενοφθαλμίστηκε με 10² κύτταρα/ml του παθογόνου και παρέμεινε σε επωαστικό θάλαμο στους 10°C. Η ρύθμιση της οξύτητας ή της αλατότητας του γάλακτος πραγματοποιήθηκε στην αρχή ή κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας με προσθήκη γαλακτικού οξέος ή NaCl, αντίστοιχα. Για την αύξηση της οξύτητας ή/και η μείωση της αλατότητας του μέσου, φρέσκο μη ενοφθαλμισμένο γάλα αναμειγνύονταν σε αναλογία 50:50 με το ήδη υπάρχον δείγμα. Η μείωση του πληθυσμού του μικροοργανισμού κατά 0.5 logCFU/ml θεωρήθηκε αμελητέα. Τα προφίλ που επιλέχτηκαν αντικατόπτριζαν τις συνθήκες του αρχικού πειράματος με το εργαστηριακό υπόστρωμα. Συγκεκριμένα, στα δύο πρώτα προφίλ (Σχ. 5.8α, β) πραγματοποιήθηκαν μεταβολές της αλατότητας μέσα στα όρια ανάπτυξης του βακτηρίου, στο προφίλ 3 (γ) έγιναν μεταφορές μεταξύ 2.5%- 12.5% (a_w 0.90, μη ανάπτυξη)- 6% NaCl, ενώ στο προφίλ 4 (δ) οι μεταφορές πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των τιμών pH 6- 4.9 (μη ανάπτυξη)- 5.8. Στο τελευταίο προφίλ (5, ε) επιχειρήθηκε η ταυτόχρονη ή η διαδοχική μεταβολή της οξύτητας και της αλατότητας του γάλακτος πάντα στα όρια ανάπτυξης της *L. monocytogenes*.

5.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο περιβάλλον ενός τυροκομείου μεσαίας κλίμακας συνυπάρχουν αρχικά, ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα, παραπροϊόντα της παραγωγικής διαδικασίας και απόβλητα, συχνά στον ίδιο χώρο (ψυγεία, παραγωγή, αποθήκευση). Για παράδειγμα, σε ένα δωμάτιο-ψυγείο ενδέχεται να συνυπάρχουν παγολεκάνες με γάλα πριν και μετά την παστερίωση, διαφορετικά τυριά (φέτα, κεφαλογραβιέρα, μυζήθρα) σε διαφορετικά στάδια ωρίμασης. Με λίγα λόγια, προϊόντα με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες που επιτρέπουν ή όχι την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, μεταξύ των οποίων δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα μιας διασταυρούμενης επιμόλυνσης (Fox et al., 2009, Kousta et al., 2010). Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η προσομοίωση μιας τέτοιας πιθανής διασταυρούμενης επιμόλυνσης και η επίδρασή της στις κινητικές παραμέτρους ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν ο χρόνος προσαρμογής (lag ή λ) των κυττάρων στο νέο περιβάλλον και η ταχύτητα (ν) με την οποία προσαρμόζονται, που ισούται με τον ρυθμό ανάπτυξης του παθογόνου. Το γινόμενο των δύο ($\lambda \cdot \nu$) αντιπροσωπεύει το έργο που χρειάζεται να καταναλωθεί, ώστε να αρχίσει ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, h_o (work to be done, Baranyi και Roberts, 1994). Η συγκεκριμένη προσπάθεια έχει γίνει στο παρελθόν κυρίως για θερμοκρασιακές και οσμωτικές μεταφορές εντός των ορίων ανάπτυξης της *L. monocytogenes* (Zwietering et al., 1994, Augustin et al., 2002, Whiting και Bagi, 2002., Mellefont και Ross, 2003, Mellefont et al., 2003, 2004, 2005, Swinnen et al., 2005, 2006). Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη γνωστή προσπάθεια μελέτης της επίδρασης της μεταφοράς του παθογόνου σε περιβάλλοντα με αλατότητες και οξύτητες εκατέρωθεν της διεπιφάνειας ανάπτυξης-μη ανάπτυξης και μοντελοποίησης της ενδιάμεσης φάσης προσαρμογής που ενδεχομένως εισάγεται.

Η επίδραση της μεταβολής της οξύτητας και της αλατότητας του περιβάλλοντος στην κινητική ανάπτυξης της *L. monocytogenes* εξετάστηκε ξεχωριστά, στους 10°C σε τιμές pH και ενεργότητας ύδατος εντός ή εκτός των ορίων ανάπτυξης (επιβίωση) του μικροοργανισμού. Στο σχήμα 5.3 φαίνονται οι 60 από τις 92 συνολικά (82 μεταφορές και 10 αρχικές) καμπύλες ανάπτυξης του παθογόνου που προέκυψαν σε κάθε μία από τις εξεταζόμενες συνθήκες, προσαρμοσμένες μέσω του προγράμματος DMFit 2.1 στο πρωτογενές μοντέλο Baranyi. Στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων το R^2 της προσαρμογής κυμάνθηκε μεταξύ 0.97 και 0.99, δείχνοντας την καλή προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στην καμπύλη του μοντέλου. Επιπλέον, λόγω τυποποίησης της διαδικασίας σε προκαταρκτικό επίπεδο, το αρχικό επίπεδο ενοφθαλισμού του παθογόνου μετρήθηκε σταθερά περί των 2 λογαριθμικών μονάδων (/ml). Η ανώτερη ασύμπτωτη (y_{End}) στις περισσότερες καμπύλες υπολογίστηκε ανάμεσα στους 8,0 με 9,0 log CFU/ml (Xanthiakos et al., 2006), ενώ μειώθηκε αισθητά σε πιο δυσμενείς συνθήκες (pH 5.1) σε 7,0-7,5 log CFU/ml. Η χαμηλότερη τιμή της σημειώθηκε σε pH 5.1 από κύτταρα που είχαν μεταφερθεί μετά από παραμονή

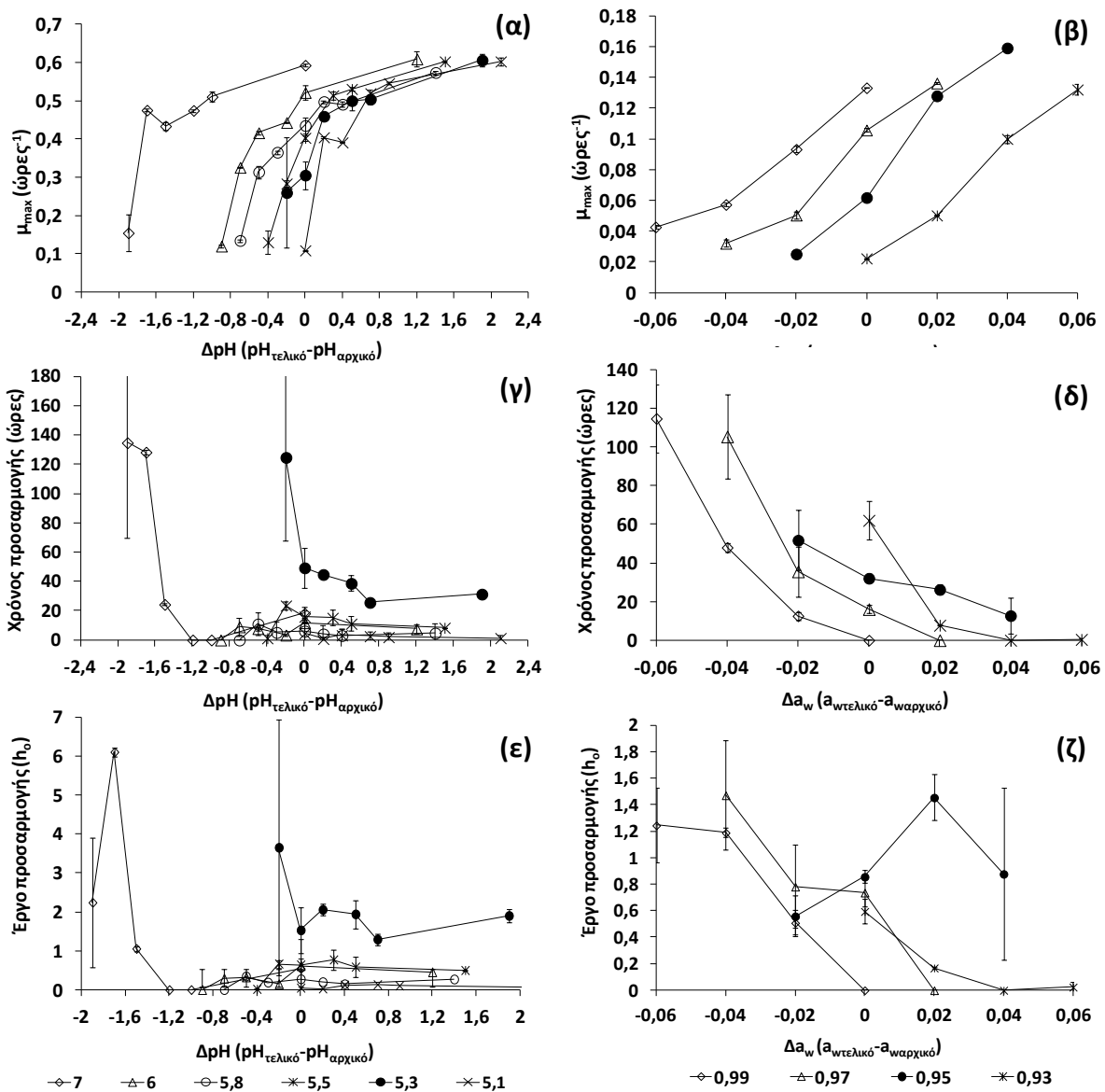
10 ημερών σε pH 4,9 και ήταν 6,7 log CFU/ml. Η προσαρμογή των δεδομένων στο πρωτογενές μοντέλο Baranyi, πραγματοποιήθηκε μεταξύ άλλων, για τον προσδιορισμό των παραμέτρων της κάθε καμπύλης, όπως περιγράφονται στη συνέχεια.



Σχήμα 5.3. Καμπύλες ανάπτυξης της *L. monocytogenes* στους 10°C σε μεταβολές από **α)** pH ανάπτυξης (6.0, 5.5 και 5.1) σε όλα τα pH ανάπτυξης, **β)** a_w ανάπτυξης (0.99, 0.95 και 0.93) σε όλα τα a_w ανάπτυξης, **γ)** μετά από παραμονή του σε pH 4.9 για 1, 5 και 10 ημέρες και μεταφορά του σε όλα τα pH ανάπτυξης και **δ)** μετά από παραμονή του σε a_w 0.90 (12.5% NaCl) για 1, 5 και 10 ημέρες και μεταφορά του σε όλα τα a_w ανάπτυξης. Στο σχήμα τα πειραματικά δεδομένα αντιπαραβάλλονται με τις καμπύλες πρόβλεψης του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi, μετά από προσαρμογή τους με την βοήθεια του προγράμματος DMFit 2.1.

Αρχικά εξετάστηκε η επίδραση των μεταφορών μεταξύ των συνθηκών pH και a_w ανάπτυξης. Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ_{max}) της *L. monocytogenes* επηρεάστηκε από την διεύθυνση, όχι όμως και από το εύρος των μεταβολών a_w (Δa_w), όπως φαίνεται από την παράλληλη θέση των καμπύλων μ_{max} σε σχέση με τις αρχικές τιμές a_w (συνθήκες πριν την αλλαγή, Σχ. 5.4.α&β). Συγκεκριμένα, στις μεταφορές προς βέλτιστες συνθήκες a_w η τιμή του μ_{max} αυξήθηκε, ενώ μειώθηκε, όταν η μεταφορά γινόταν προς μικρότερο a_w (Σχ. 5.4.β). Η αλλαγή του μ_{max} σε σχέση με τις μεταφορές σε υποστρώματα με pH ανάπτυξης έδειξε παρόμοια τάση με το a_w ανεξάρτητα από την αρχική τιμή pH (Σχ. 5.4.α). Εντούτοις, όπως αναμενόταν, σημαντική επίδραση στο μ_{max} είχαν οι τιμές pH και a_w των τελικών υποστρωμάτων μετά την μεταφορά ($p < 0.05$; Σχ. 5.4.α&β). Επομένως, τα αποτελέσματά της μελέτης δείχνουν ότι σε προσομοιάσεις ανάπτυξης, κάτω από δυναμικές συνθήκες οξύτητας και αλατότητας, ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, μ_{max} του παθογόνου, προσαρμόζεται άμεσα στο νέο περιβάλλον, αντίστοιχα με την συμπεριφορά του σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασίες.

Η φάση προσαρμογής των κυττάρων επηρεάστηκε τόσο από την διεύθυνση όσο και από το εύρος των μεταφορών (Σχ. 5.4.γ&δ). Συγκεκριμένα, οι χρόνοι προσαρμογής της *L. monocytogenes* αυξήθηκαν απότομα ($p < 0.05$) καθώς οι μεταφορές γίνονταν σε πιο δυσμενείς συνθήκες a_w (δηλ. στην περίπτωση των αρνητικών αλλαγών, Σχ. 5.4.δ). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τους Mellefont et al. (2003), οι οποίοι παρατήρησαν αύξηση του σχετικού χρόνου παραμονής (Relative Lag Times, RLT) σε χαμηλές ενεργότητες ύδατος, για τον *Salmonella*, αν και η επίδραση αυτή ήταν λιγότερο εμφανής για την *L. monocytogenes*. Οι Lebert et al. (2004) ομοίως, έδειξαν εκθετική αύξηση του χρόνου προσαρμογής του *L. innocua* μετά από αύξησή του σε άριστες συνθήκες a_w (0.995) και μεταφορά του σε διάφορες τιμές a_w σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και ζελατίνη, από 0.995 μέχρι την τιμή μη ανάπτυξης 0.91. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν επίσης ότι οι χρόνοι προσαρμογής μειώνονται σημαντικά ($p < 0.05$) όταν οι αλλαγές συμβαίνουν προς πιο ευνοϊκές συνθήκες από το αρχικό a_w (Σχ. 5.4.δ). Αυτό υποδεικνύει ότι κάθε πιθανός τραυματισμός λόγω χαμηλής ενεργότητας ύδατος, ανακάμπτει γρήγορα, όταν οι συνθήκες του μέσου γίνονται περισσότερο ευνοϊκές για την *L. monocytogenes*. Παρόμοιες παρατηρήσεις σχετικά με την επίδραση των περιβαλλοντικών αλλαγών στον ενδιάμεσο χρόνο προσαρμογής των μικροοργανισμών έχουν αναφερθεί για μεταβολές προς χαμηλότερες θερμοκρασίες σε μελέτες πρόβλεψης της ανάπτυξης των *Salmonella* και *Brochothrix thermosphacta* (Baranyi et al., 1995, Mitchell et al., 1994) και για μεταβολές προς υψηλότερες θερμοκρασίες σε μελέτες ανάπτυξης του *E. coli* (Swinnen et al., 2005, 2006). Επομένως, μεταβολές της ενεργότητας ύδατος των τροφίμων επηρεάζουν σημαντικά τον χρόνο προσαρμογής της *L. monocytogenes*, αντίστοιχα με την επίδραση των μεταβολών της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του βακτηρίου.



Σχήμα 5.4. Επίδραση των μεταφορών pH (**α**, **γ**, **ε**) και a_w (**β**, **δ**, **ζ**) ανάπτυξης στον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (μ_{max} , **α**, **β**), τον χρόνο προσαρμογής (λ , **γ**, **δ**) και το έργο προσαρμογής (h_a , **ε**, **ζ**) της *L. monocytogenes*, μετά από ανάπτυξη σε διαφορετικές συνθήκες a_w και pH, στους 10°C. Οι τιμές Δa_w στον οριζόντιο άξονα ισούνται με την διαφορά $a_{w\text{τελικό}} - a_{w\text{αρχικό}}$, όπου $a_{w\text{τελικό}}$ είναι η ενεργότητα ύδατος μετά τη μεταφορά και $a_{w\text{αρχικό}}$ είναι η ενεργότητα ύδατος των αρχικών υποστρωμάτων ανάπτυξης. Ομοίως, οι τιμές ΔpH ισούνται με την διαφορά $pH_{\text{τελικό}} - pH_{\text{αρχικό}}$, όπου $pH_{\text{τελικό}}$ είναι το pH μετά τη μεταφορά και το $pH_{\text{αρχικό}}$ είναι το pH πριν την μεταφορά. Η τιμή μηδέν αντιπροσωπεύει μεταφορές στις ίδιες τιμές a_w ή pH, οι θετικές τιμές αντιπροσωπεύουν τα μεταφορές σε μεγαλύτερες τιμές και το αρνητικό πρόσημο τις μεταφορές σε μικρότερες τιμές.

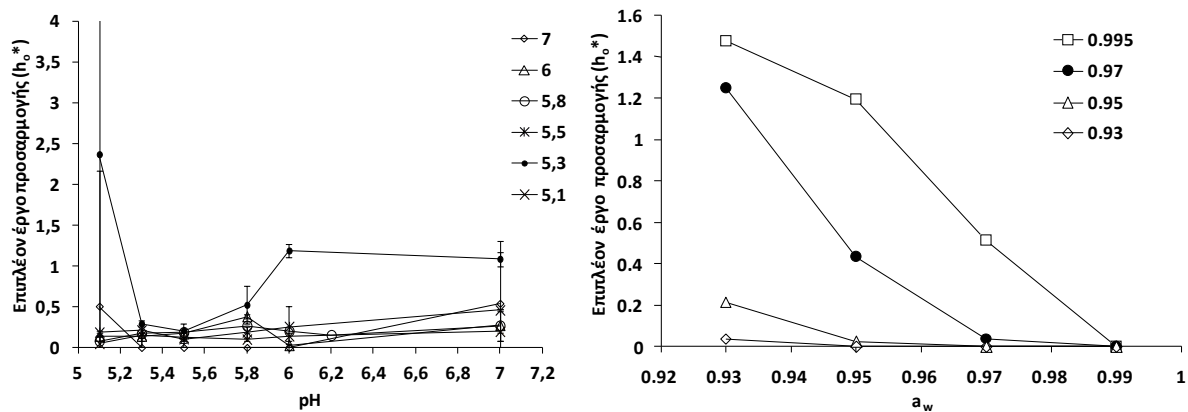
Σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις στις μεταφορές της *L. monocytogenes* μεταξύ των τιμών a_w , οι αντίστοιχες μεταφορές μεταξύ των τιμών pH 5.3 με 7.2 δεν επηρέασαν σημαντικά τους χρόνους προσαρμογής του βακτηρίου ($p \geq 0.05$; Σχ. 5.4.γ). Ομοίως η επίδραση του πρόσθετου έργου h_o ήταν σχετικά μικρότερη (0-0.4) σε σύγκριση με την αντίστοιχη (0-1.5) των μεταβολών a_w (Δa_w). Εντούτοις, μεταφορές κοντά στις τιμές pH που περιορίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου (5.1) προκάλεσαν αξιοσημείωτη αύξηση του χρόνου προσαρμογής του ($p < 0.05$; Σχ. 5.4.γ), σε συμφωνία με τους Robinson et al. (1998, 2001). Έχει προταθεί ότι τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να αποκαθιστούν γρήγορα την ομοιόστασή τους, όταν υπόκεινται σε ήπιες καταπονήσεις pH. Εντούτοις, ο συνδυασμός της χαμηλής θερμοκρασίας (10°C) με την περιοριστική τιμή pH, ενδεχομένως να έθεσε ένα υψηλό ενεργειακό όριο, για την υπερπήδηση του οποίου και την έναρξη της αύξησής τους τα κύτταρα να χρειάστηκαν επιπλέον ενέργεια. Τα παραπάνω αποτελέσματα, υποδηλώνουν ότι ο ενδιάμεσος χρόνος προσαρμογής που εισάγεται κατά την μεταφορά του παθογόνου μεταξύ διαφορετικών pH θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη μόνο όταν αυτή συμβαίνει κοντά στα όρια αύξησής του (pH 4.9-5.2). Η σημαντικότητα αυτής της παρατήρησης έγκειται στον κίνδυνο ανάπτυξης της *L. monocytogenes* κατά την διάρκεια της διάθεσης ορισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (όπως διάφορα σκληρά και ημίσκληρα τυριά), τα οποία λόγω του χαμηλού (αλλά όχι απαγορευτικού) pH (5.0-5.5), μπορεί να υποστηρίζουν οριακά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Η υπόθεση ότι το έργο προσαρμογής του βακτηρίου σε ένα νέο περιβάλλον είναι ανεξάρτητο από τον περιβαλλοντικό παράγοντα που ελέγχει την αύξησή του δεν ισχύει για το a_w . Η παρατήρηση αυτή προέκυψε από τις παρακάτω ενέργειες: αρχικά, υπολογίστηκε το h_o σαν γινόμενο του μ_{max} με τον χρόνο προσαρμογής για κάθε μεταφορά και δεν παρατηρήθηκε κάποια ιδιαίτερη τάση μεταξύ του h_o και του a_w . Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε η παρακάτω τροποποίηση:

$$h_o = \mu_{max} * (lag_{new} - lag_{same}) \quad (9)$$

όπου lag_{new} είναι ο χρόνος προσαρμογής της *L. monocytogenes* μετά την μεταφορά σε μία διαφορετική τιμή a_w από αυτήν που προϋπήρχε και lag_{same} είναι ο χρόνος προσαρμογής του παθογόνου μετά την μεταφορά του σε νέο υπόστρωμα με την ίδια όμως τιμή a_w . Η τάση που αποκαλύφθηκε μετά τους παραπάνω υπολογισμούς ήταν η εξής: η παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλή ενεργότητα ύδατος ενίσχυσε την μετέπειτα προσαρμογή του σε περιβάλλον με a_w στο εύρος από 0.93 μέχρι 0.995 (Σχ. 5.5). Η διαδικασία τροποποίησης του υπολογισμού του επιπλέον έργου προσαρμογής πραγματοποιήθηκε και για τις μεταφορές μεταξύ διαφορετικών pH, χωρίς όμως να εμφανιστεί κάποια ιδιαίτερη τάση. Κατά συνέπεια, τα μοντέλα πρόβλεψης της επίδρασης των μεταβολών αλατότητας στην ενδιάμεση φάση προσαρμογής της *L. monocytogenes* πρέπει να λαμβάνουν υπόψη όχι μόνο την τιμή του a_w μετά την αλλαγή, αλλά και την διεύθυνση και το εύρος

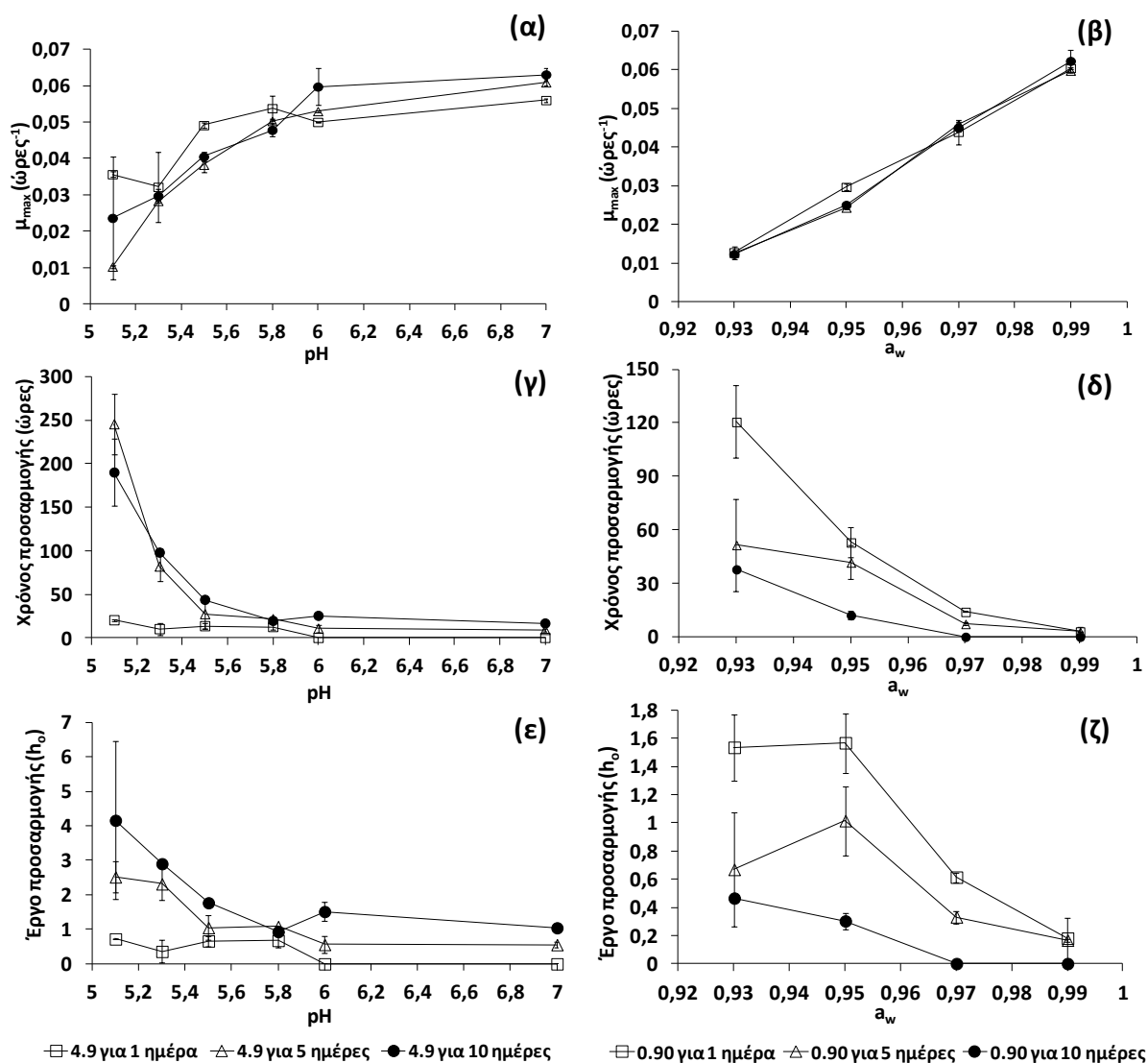
αυτής της αλλαγής. Οι Cheroutre-Vialette και Lebert (2000) παρουσίασαν ένα δυναμικό μοντέλο ανάπτυξης *L. monocytogenes* ως απόκριση των μεταβολών των NaCl και pH που βασίζονται στα περιστροφικά νευρωνικά δίκτυα (recurrent neural networks). Παρά την καλή συμφωνία μεταξύ των προβλέψεων και των πειραματικών δεδομένων, το μοντέλο χαρακτηρίζεται από την πολυπλοκότητά του και την δυσκολία να καλύψει όλες πιθανές μεταβολές από διαφορετικά αρχικά επίπεδα pH και NaCl. Τα ευρήματά μας θα βοηθήσουν στην ανάπτυξη απλούστερων μοντέλων ανάπτυξης, που θα βασίζονται σε υποθέσεις με βιολογικό υπόβαθρο σε σχέση με πιθανά φαινόμενα προσαρμογής της *L. monocytogenes*. Τέτοιου είδους φαινόμενα μπορεί να συμβούν κατά την μεταφορά της *L. monocytogenes* από περιβάλλοντα με χαμηλή a_w (π.χ. άλμη) ή pH (ζυμωμένο τρόφιμο), σε περιβάλλοντα με υψηλότερα a_w ή pH (π.χ. γάλα ή άλλα φρέσκα προϊόντα) και αντιστρόφως.



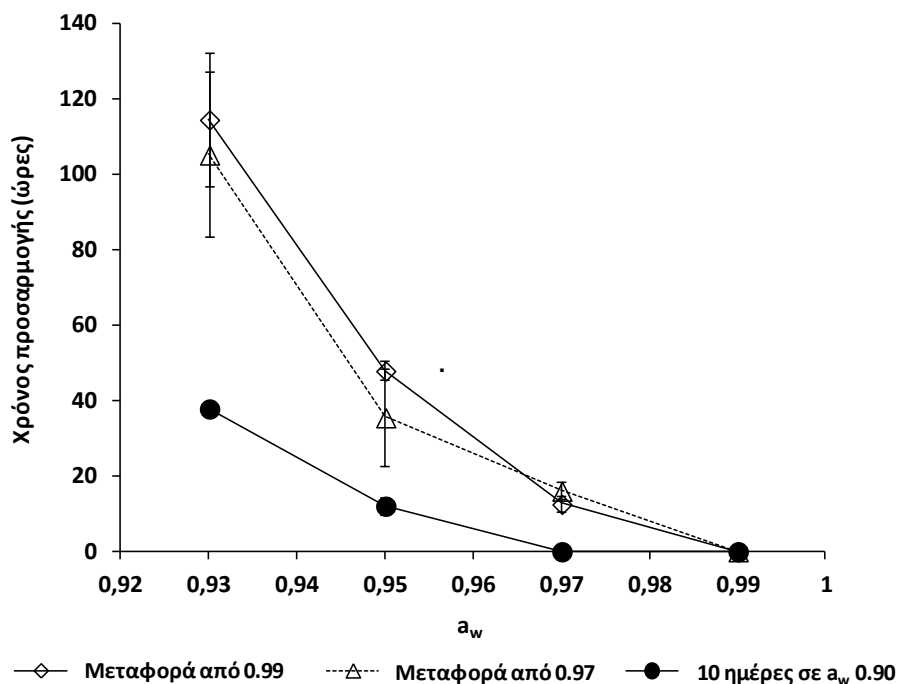
Σχήμα 5.5. Πρόσθετο έργο που χρειάζεται για την έναρξη ανάπτυξης (additional h_0^*) της *L. monocytogenes* σε συνθήκες ανάπτυξης, λόγω της μεταφοράς του από διαφορετικές αρχικές τιμές a_w : (□) 0.995, (●) 0.97, (Δ) 0.95, (◇) 0.93. Για τον υπολογισμό του πρόσθετου έργου h_0^* , οι χρόνοι προσαρμογής των συνθηκών που δεν μεταφέρθηκαν (lag_{same}) αφαιρέθηκαν από τους χρόνους προσαρμογής αυτών που μεταφέρθηκαν (lag_{new}) και πολλαπλασιάστηκαν με τον μέγιστο ειδικό αριθμό ανάπτυξης (μ_{max}), σύμφωνα με την εξίσωση 9.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των μεταβολών από ανασταλτικά επίπεδα pH και a_w για την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε επιτρεπτά. Η διάρκεια της παρατεταμένης έκθεσης σε συνθήκες μη ανάπτυξης δεν επηρέασε το μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης μ_{max} της *L. monocytogenes* κατά την μετέπειτα μεταφορά του σε συνθήκες ανάπτυξης (Σχ. 5.6.β). Εντούτοις, η επίδρασή της στον χρόνο προσαρμογής και κατά συνέπεια το h_0 ήταν εμφανής (Σχ. 5.6). Συγκεκριμένα, για το ίδιο επίπεδο ενεργότητας ύδατος, το έργο προσαρμογής (“work to be done”, h_0) μειώθηκε ανάλογα με τον χρόνο που τα κύτταρα παρέμεναν σε a_w 0.90 (Σχ. 5.6.ζ). Επιπλέον, οι χρόνοι προσαρμογής και τα h_0 που υπολογίστηκαν σε a_w 0.93 και 0.95 μετά από 10 ημέρες στους 0.90 ήταν μειωμένα ($p < 0.05$) σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές μετά από ανάπτυξη σε a_w 0.995 (Σχ.

5.6.δ&ζ). Αντιθέτως, δεν βρέθηκαν διαφορές ($p \geq 0.05$) στους χρόνους προσαρμογής σε $a_w > 0.95$, ανάμεσα σε καλλιέργειες που προηγουμένως παρέμειναν σε $a_w 0.90$ συγκριτικά με αυτές που αυξήθηκαν σε 0.995 . Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα κύτταρα είναι ικανά να διενεργήσουν μέρος από το έργο προσαρμογής που χρειάζεται για να αυξηθούν σε $a_w 0.93-0.995$, κατά την διάρκεια της εξοικείωσής τους σε $a_w 0.90$. Εντούτοις, οι χρόνοι προσαρμογής και οι τιμές h_0 της *L. monocytogenes* μετά από προσαρμογή σε $a_w 0.90$ μειώθηκαν με την αύξηση των τιμών a_w (Σχ. 5.6.δ&ζ), γεγονός που σημαίνει ότι το έργο προσαρμογής (h_0) μειώνονταν καθώς αυξάνονταν το εύρος της αλλαγής από τις συνθήκες παρατεταμένης έκθεσης. Η παρατήρηση ότι η φάση προσαρμογής είναι ανάλογη του εύρους της μεταβολής όταν γίνεται προς συνθήκες μη ανάπτυξης (π.χ. αρνητικές μεταβολές) έχει περιγραφεί για την βακτηριακή ανάπτυξη σε μεταβαλλόμενες συνθήκες και προτείνει θετική επίδραση της θερμοκρασιακής ιστορίας στον χρόνο προσαρμογής των βακτηρίων (Gay et al., 1996, Whiting και Bagi, 2002). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αυξημένος χρόνος προσαρμογής μετά από μεταφορές από υψηλές θερμοκρασίες ($25-37^\circ\text{C}$) στους $3-4^\circ\text{C}$, ο οποίος δεν ήταν τόσο εμφανής όταν προηγήθηκε επώαση στους 4°C (Delignette-Muller et al., 2005). Οι μηχανισμοί που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* στην ωσμωτική καταπόνηση συμπεριλαμβάνουν την πρόσληψη συμβατών διαλυτών ενώσεων, όπως είναι οι γλυκίνη βεταΐνη και καρνιτίνη (Ko et al., 1994). Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι κατά την διάρκεια της επώασης σε $a_w 0.90$, η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων συνεχίζεται και πιθανώς ευνοεί την συσσώρευση των απαραίτητων ουσιών που θα επιτρέψουν την ταχύτερη επούλωση και αύξηση των κυττάρων, όταν αυτά βρεθούν σε πιο ευνοϊκές συνθήκες (Σχ. 5.7). Επιπλέον, αν και ο ρυθμός ανάπτυξης των εκθετικά αυξανόμενων κυττάρων πιστεύεται ότι προσαρμόζεται στιγμιαία σε μεταβολές της ενεργότητας ύδατος, τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι ο βακτηριακός χρόνος προσαρμογής εξαρτάται από την διάρκεια της προσαρμογής σε συνθήκες μη ανάπτυξης. Μη λαμβάνοντας υπόψη αυτή την προσαρμογή, κατά την δημιουργία των μοντέλων ανάπτυξης, μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της πραγματικής ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, διακινδυνεύοντας έτσι, την ασφάλεια των τροφίμων με χαμηλή a_w ($0.90-0.94$), ιδιαίτερα κοντά στα όρια ανάπτυξης του βακτηρίου. Συνεπώς, τα δεδομένα που εξήχθησαν από την παρούσα μελέτη είναι σημαντικά για την ποσοτική μικροβιολογία κατά την εκτίμηση κινδύνου (risk assessment), γιατί προσφέρουν ποσοτικές ενδείξεις πάνω στην προσαρμογή της *L. monocytogenes*, η οποία αποτελεί μια σημαντική περιοχή αβεβαιότητας και συνήθως αγνοείται στα υφιστάμενα μοντέλα. Περαιτέρω μελέτη θα έριχνε φώς στην ποσοτικοποίηση της ταχύτητας με την οποία τα κύτταρα προσαρμόζονται, όντας σε κατάσταση μη ανάπτυξης και την παραλλακτικότητα του φαινομένου μεταξύ διαφορετικών στελεχών της *L. monocytogenes*, που σχετίζονται με επιδημίες ή παραμένουν στις επιφάνειες επεξεργασίας και διάθεσης για μεγάλα χρονικά διαστήματα.



Σχήμα 5.6. Επίδραση των μεταφορών οξύτητας (α , γ , ϵ) και αλατότητας (β , δ , ζ) στον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (μ_{max} , α , β), τον χρόνο προσαρμογής (λ , γ , δ) και το έργο προσαρμογής (h_o , ϵ , ζ) της *L. monocytogenes*, έπειτα από παρατεταμένη έκθεση των κυττάρων για (□) 1, (Δ) 5 ή (●) 10 ημέρες σε a_w 0.90 (12,5% NaCl) ή pH 4.9 και μεταφορά τους σε όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες a_w και pH ανάπτυξης, στους 10°C.



Σχήμα 5.7. Χρόνοι προσαρμογής της *L. monocytogenes* σε a_w ανάπτυξης, έπειτα από ανάπτυξη σε a_w 0.995 (◇), 0.97 (Δ), ή παρατεταμένη έκθεση (●) για 10 ημέρες σε a_w 0.90.

Σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις με την ενεργότητα ύδατος, όσο περισσότερο παρέμενε η *L. monocytogenes* σε pH μη ανάπτυξης (4.9), τόσο περισσότερο ήταν το έργο που χρειαζόταν για την έναρξη της ανάπτυξης σε πιο ευνοϊκές συνθήκες (Σχ. 5.6). Συγκεκριμένα, η τιμή του h_o με την μείωση του pH από 7.0 μέχρι και 5.1, αυξήθηκε από 0 σε 0.7, από 0.6 σε 2.5 και από 1.1 σε 4.2, μετά από 1, 5 και 10 ημέρες επώασης σε pH 4.9, αντίστοιχα (Σχ. 5.6.ε). Επιπλέον, οι χρόνοι προσαρμογής και οι εκτιμήσεις για το h_o σε pH 5.1 (κοντά στην μεσεπιφάνεια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης), μετά από 10 ημέρες σε pH 4.9 ήταν υψηλότερες ($p < 0.05$) από τις αντίστοιχες τιμές σε pH 7.2 και 5.5, ακολουθώντας το ίδιο σενάριο παρατεταμένης έκθεσης (Σχ. 5.6.γ&ε). Μια πιθανή εξήγηση του φαινομένου αυτού μπορεί να είναι το υψηλότερο ενεργειακό φορτίο που θέτει το pH στα κύτταρα, σε σχέση με το αντίστοιχο του a_w σε συνθήκες μη ανάπτυξης (Shabala et al., 2008, Tiganitas et al., 2009). Η παρούσα πειραματική προσέγγιση αποτελούταν από τρία διαδοχικά στάδια: (i) ανάπτυξη σε άριστο pH, (ii) μεταφορά σε pH μη ανάπτυξης για 1, 5 και 10 ημέρες, και (iii) μεταφορά σε 6 διαφορετικές τιμές pH ανάπτυξης. Σύμφωνα με τους Goodson και Rowbury (1989), προηγούμενη ανάπτυξη του *E. coli* σε pH 7.0 μείωσε την ικανότητα των κυττάρων να αυξηθούν στο ίδιο pH μετά από σύντομη έκθεση (26 λεπτά) σε pH 3.0 (τροποποιημένο με HCl). Είναι πιθανό ότι η παρατεταμένη έκθεση σε pH 4.9, στην παρούσα μελέτη, εισήγαγε αλλαγές στην φυσιολογία των κυττάρων, που τα κατέστησαν περισσότερο ανθεκτικά σε μετέπειτα ισχυρές όξινες καταπονήσεις

(Davis et al., 1996, Skandamis et al., 2008), ή μείωσαν το χαμηλότερο όριο pH για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Για παράδειγμα, οι Skandamis et al. (2007) βρήκαν ότι η παρατεταμένη έκθεση του *E. coli* O157:H7 σε όξινα απόβλητα απολύμανσης κρέατος (pH 4.9) επέτρεψαν την ανάπτυξη των κυττάρων σε χαμηλότερο pH από τα μη εξοικειωμένα κύτταρα. Πρέπει να αναφερθεί εντούτοις, ότι οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας του *E. coli* O157:H7 που έχουν σχέση με το pH είναι διαφορετικοί από τους μηχανισμούς της *L. monocytogenes* (Hill et al., 2002, Lin et al., 1996). Επιπλέον, οι μηχανισμοί που προαναφέρθηκαν πιθανώς διαφέρουν από αυτούς που χρειάζονται για να συνεχίσουν την ανάπτυξη σε επόμενες ευνοϊκές συνθήκες. Οι Kroll και Patchett (1992) βρήκαν ότι η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε pH 5.0 πριν την όξινη καταπόνηση σε pH 3.5 καθυστερούσε την ανάπτυξη σε pH 7, σε σχέση με την ανάπτυξη σε pH 7.0 πριν την καταπόνηση. Αντίθετα, η προσαρμογή σε pH 5.0 ενίσχυε την επιβίωση του μικροοργανισμού σε pH 3.0, σε αντίθεση με τα κύτταρα που είχαν αυξηθεί σε pH 7.0. Ενδέχεται επομένως, οι συνθήκες που αυξάνουν την οξεοανθεκτικότητα (όπως π.χ., η σταδιακή μείωση του pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης) ή μειώνουν το όριο του pH που επιτρέπει ανάπτυξη του παθογόνου, μπορεί να μην επηρεάζουν το έργο προσαρμογής που χρειάζεται για την είσοδο στην εκθετική φάση ανάπτυξης, όταν αυτός βρίσκεται σε ευνοϊκές συνθήκες. Επιπλέον έρευνα, η οποία θα περιλαμβάνει τις μεταφραστικές ή πρωτεομικές αλλαγές που εισάγονται κατά την παρατεταμένη έκθεση σε pH μη ανάπτυξης, θα προσέφερε περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τους προαναφερθέντες μηχανισμούς. Τα παραπάνω δεδομένα θα μπορούσαν επίσης να συσχετισθούν με το πέρασμα της *L. monocytogenes* από το στομάχι (χαμηλό pH) στα έντερα (υψηλό pH).

Η ταχύτητα με την οποία εκτελείται το έργο προσαρμογής ενός μικροοργανισμού σε συνθήκες ανάπτυξης, σύμφωνα με το κλασικό μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994), είναι ίση με τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης ($v=\mu_{max}$). Στις συνθήκες που δεν αναμένεται ανάπτυξη θεωρείται μηδενική, γεγονός που αντιπροσωπεύει την σταθερότητα της φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων του μικροοργανισμού στις δεδομένες συνθήκες. Εντούτοις, τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν την ύπαρξη κινητικότητας της φυσιολογικής κατάστασης της *L. monocytogenes*, ανάλογα με την συνθήκη. Συγκεκριμένα, με την παραμονή τους τα κύτταρα σε περιβάλλον με pH μη ανάπτυξης φάνηκε ότι καταπονούνται ($v<0$) και καθυστερείται η αύξησή τους στο νέο περιβάλλον, ενώ η αντίστοιχη παραμονή σε a_w μη ανάπτυξης προετοίμασε τα κύτταρα για το νέο περιβάλλον ($v>0$), με αποτέλεσμα την μείωση του χρόνου προσαρμογής τους σε αυτό (Εξ. 4, Σχ. 5.5.). Με βάση αυτή την διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε, επιχειρήθηκε η τροποποίηση του κλασικού μοντέλου Baranyi, ώστε να περιλαμβάνει τόσο την μεταβολή της φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων (Q) σε καταστάσεις μη ανάπτυξης, όσο και το έργο προσαρμογής τους στο νέο περιβάλλον, σε περίπτωση που μεταφερθούν σε συνθήκες ανάπτυξης.

Πίνακας 5.1. Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων τιμών h_s και λ (χρόνος προσαρμογής), που προέκυψαν μετά την προσαρμογή του τροποποιημένου μοντέλου.

Αρχικό $a_w/\rho H$	Τελικό $a_w/\rho H$	μ_{\max} (ώρες^{-1})	Παρατηρούμενες		Μετά από προσαρμογή των Εξ. 2, 3	
			h_s	λ (ώρες)	h_s	λ (ώρες)
0.99	0.97	0,094	0,9	9,9	1,3	13,9
	0.95	0,057	2,7	47,3	2,6	45,3
	0.93	0,03	3,6	122,7	3,8	128,9
0.97	0.95	0,053	2,2	42,1	1,6	30
	0.93	0,034	3,1	91,7	2,8	84,3
0.95	0.93	0,025	1,4	55,2	1,8	72,5
7	6	0,117	0	0	0	0
	5.8	0,111	0,5	4,3	0,8	7,1
	5.5	0,01	0,43	43,4	0,44	44
6	5.1	0,034	4	115,9	3,9	114,9
	5.8	0,101	0	0	0,1	0,9
	5.5	0,097	0,7	7,1	0	0
5.8	5.1	0,027	0	0	0	0
	5.5	0,083	0	0	0,1	1,3
	5.1	0,031	0	0	0,7	23,9
5.5	5.3	0,065	1,25	19,2	0,6	8,8
	5.1	0,036	0	0	2,6	72,5
	5.3	0,052	6	116	3,4	65,8
5.3	5.8	0,111	0,5	4,3	0,8	7,1
Ημέρες παραμονής σε a_w 0.90 ή ρH 4.9	Τελικό $a_w/\rho H$	μ_{\max} (ώρες^{-1})	Παρατηρούμενες		Μετά από προσαρμογή των Εξ. 5, 6, 7	
1	0.99	0,137	0	0	1,3	9,5
	0.97	0,1	0,97	9,7	1,39	13,9
	0.95	0,063	2,11	33,4	1,62	25,7
	0.93	0,027	2,52	93,7	2,45	91,1
5	0.99	0,135	0	0	0,52	3,9
	0.97	0,103	0,54	5,2	0,62	6
	0.95	0,06	3,28	54,7	0,84	14
	0.93	0,029	1,49	51,7	1,67	58
10	0.99	0,143	0	0	0,21	1,5
	0.97	0,104	0	0	0,3	2,9
	0.95	0,055	0	0	0,53	9,6
	0.93	0,029	1,26	43,8	1,36	47,4
1	7	0,129	0	0	0,58	4,5
	6	0,115	0	0	0,78	6,8
	5.8	0,127	1,62	12,8	0,9	7,1
	5.5	0,117	1,64	14,0	1,09	9,3
	5.3	0,067	0	0,0	1,42	21,2
	5.1	0,082	1,65	20,1	2,07	25,2
	7	0,1342	0	0	1,45	10,8
5	6	0,1141	0	0	1,77	15,5
	5.8	0,1197	2,52	21,1	1,96	16,4
	5.5	0,088	2,45	27,8	2,55	29,0
	5.3	0,065	5,35	82,3	3,53	54,3
	5.1	0,0234	5,72	244,4	6,33	270,5
10	7	0,1456	2,45	16,8	3,2	22,0
	6	0,1379	3,53	25,6	3,52	25,5
	5.8	0,1102	2,16	19,6	3,71	33,7
	5.5	0,0928	4,02	43,3	4,3	46,3
	5.3	0,0676	6,5	96,2	5,28	78,1
	5.1	0,0483	7,95	164,6	8,07	167,1

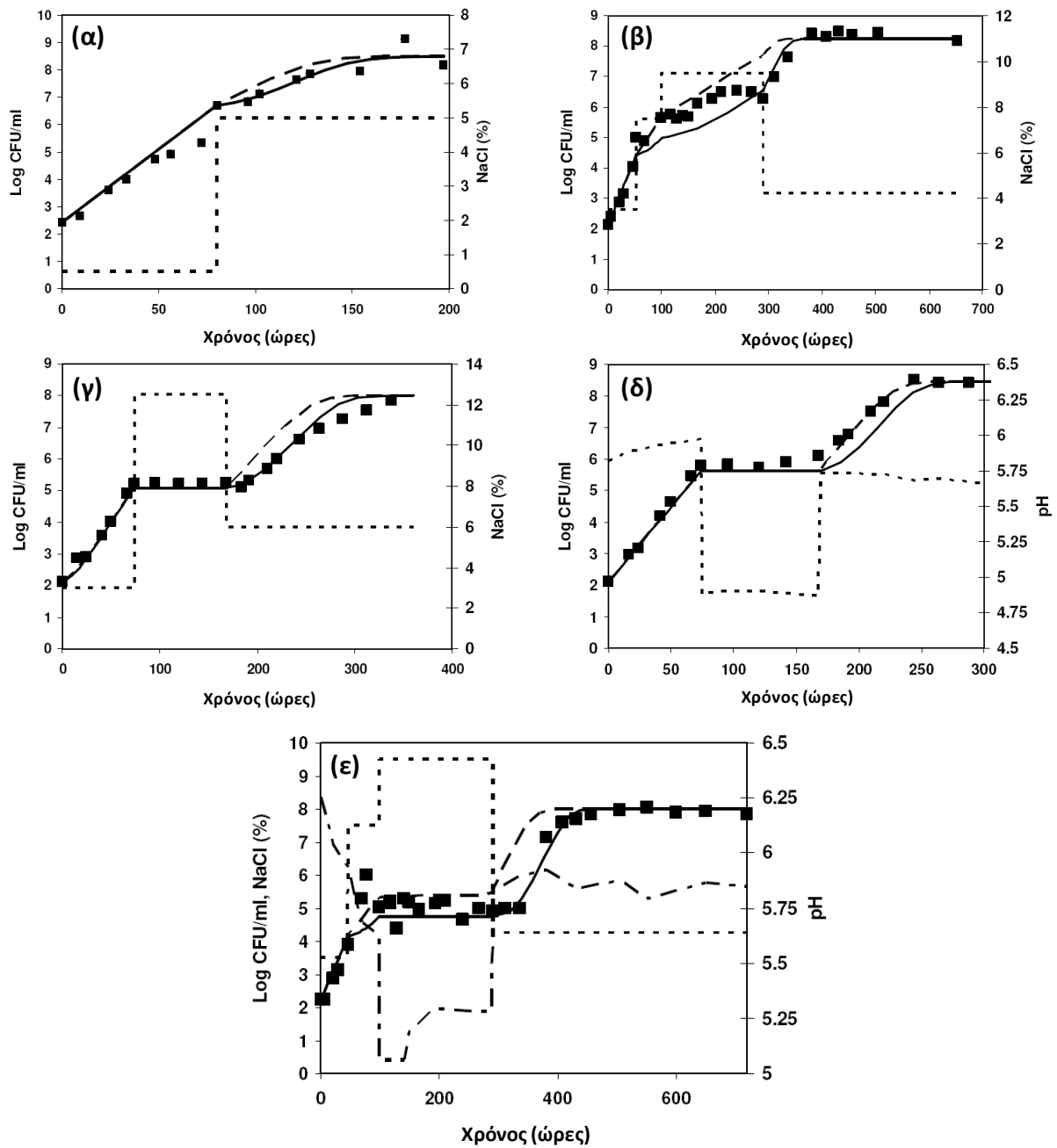
Η ποσοτικοποίηση της φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων (Q_s), υπολογίστηκε ανά περίπτωση από το αντίστοιχο έργο προσαρμογής, το οποίο με την σειρά του εξαρτάται από την ταχύτητα και τον χρόνο προσαρμογής. Για τον υπολογισμό των παραμέτρων έγινε προσαρμογή των δεδομένων αρχικά κάθε συνθήκης ανεξάρτητα από τις άλλες και στη συνέχεια όλων των συνθηκών σαν σύνολο, από τις οποίες προέκυψαν διαφορετικά h_s , ενώ διατηρώντας το μ_{max} σταθερό (και με το δεδομένο ότι ισούται με την ταχύτητα προσαρμογής) υπολογίστηκαν οι χρόνοι προσαρμογής (Πιν. 5.1). Οι τιμές pH_{min} και a_{wmin} που υπολογίστηκαν από το μοντέλο ανάπτυξης (CPM) ήταν 4.96 και 0.915, αντίστοιχα, ο συντελεστής συγγένειας σχετικά υψηλός ($R^2 = 0.95$) και το τυπικό σφάλμα της προσαρμογής χαμηλό ($SE_{fit} = 0.015$). Για τις μεταβολές μεταξύ των ορίων ανάπτυξης, τα αποτελέσματα των Εξ. 2 και 3 φαίνονται στον Πιν. 5.1, ενώ οι τιμές MAD και RMSE βρέθηκαν 8 και 9.6 για της μεταβολές a_w και 12.2 και 22.7 για τις μεταβολές pH, αντίστοιχα. Για τις μεταβολές εκατέρωθεν των ορίων ανάπτυξης, οι τιμές των παραμέτρων των Εξ. 4-6, καθώς και το Q_1 , βρέθηκαν ως εξής: Q_1 -1.15 και 1.04, v_α 0.016 και -0.017, β 0,0012 και 0,80 για τις ωσμωτικές και όξινες μεταβολές, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της Εξ. 7 (συμπεριλαμβανομένων των Εξ. 5 και 6) για κάθε περίπτωση φαίνονται στο δεύτερο μέρος του Πιν. 5.1, ενώ στην περίπτωση αυτή, οι τιμές MAD και RMSE βρέθηκαν 7.8 και 3.7 για της μεταβολές a_w και 9.8 και 12.9 για τις μεταβολές pH, αντίστοιχα. Έστι διακρίνεται η ικανότητα του μοντέλου να περιγράψει τις διάφορες τάσεις που είχαν ξεχωρίσει από τα πειραματικά αποτελέσματα. Αρχικά, την αύξηση του έργου και του χρόνου προσαρμογής με την μείωση της ενεργότητας ύδατος, την μείωση του χρόνου προσαρμογής κατά την παρατεταμένη έκθεση σε a_w 0.90, και αντίστοιχα, την μείωση του έργου προσαρμογής με την αύξηση του εύρους των όξινων μεταβολών και τέλος την αύξηση του έργου προσαρμογής κατά την παρατεταμένη έκθεση σε pH 4.9. Εντούτοις, καθώς παρατηρείται αύξηση στην παραλλακτικότητα της συμπεριφοράς της *L. monocytogenes* κοντά στα όρια αύξησής του, η αύξηση του έργου προσαρμογής, μπορεί να προέρχεται και μέσα από τον ρυθμό προσαρμογής και όχι αποκλειστικά από την αύξηση του χρόνου προσαρμογής.

Από την επικύρωση του μοντέλου, η οποία πραγματοποιήθηκε σε φρέσκο παστεριωμένο γάλα με 5 διαφορετικά προφίλ οξύτητας και αλατότητας, φάνηκε ότι στα περισσότερα από τα προφίλ τα πειραματικά δεδομένα της ανάπτυξης του μικροοργανισμού προσαρμόστηκαν καλύτερα στο μοντέλο που συμπεριελάμβανε την επίδραση των μεταβολών σε σχέση με το αντίστοιχο που δεν την συμπεριελάβε (Σχ. 5.8.). Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στις άριστες συνθήκες ($\mu_{max, ref}$) υπολογίστηκε μετά από ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε γάλα, λόγω του ότι θεωρείται μειωμένος σε σχέση με τον αντίστοιχο του εργαστηριακού υποστρώματος (Χανθιακός et al., 2006), και βρέθηκε ίσος με 0.84 (ώρες⁻¹). Οι υπόλοιπες παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη του μοντέλου επικύρωσης στο γάλα υπολογίστηκαν από πειράματα σε θρεπτικό υπόστρωμα. Στα

προφίλ 1 και 2, τα οποία αφορούν μεταβολές αλατότητας εντός των ορίων ανάπτυξης οι προβλέψεις συνάδουν ικανοποιητικά με τα δεδομένα. Στο τρίτο προφίλ, στο οποίο έγινε μεταβολή σε επίπεδο αλατότητας στα όρια μη ανάπτυξης του παθογόνου παρατηρήθηκε, μετά την επιβίωσή του, μια ενδιάμεση περίοδος προσαρμογής κατά την μεταφορά του σε 6% NaCl, σύμφωνη με την πρόβλεψη του μοντέλου (Σχ. 5.8.γ). Αντίθετα, στο τέταρτο προφίλ, στο οποίο μελετήθηκε η παραμονή του μικροοργανισμού σε συνθήκες pH μη ανάπτυξης, η αναμενόμενη ενδιάμεση περίοδος προσαρμογής (από τα πειράματα με το TSBYE, Σχ. 5.5.) δεν εμφανίστηκε και η κινητική του παθογόνου προσαρμόστηκε καλύτερα στην καμπύλη του κλασσικού μοντέλου (Σχ. 5.8.δ). Αυτό πιθανώς να οφείλεται σε τυχόν προστατευτικές ιδιότητες ορισμένων από τα συστατικά του γάλακτος, η οποίες ενδέχεται να μείωσαν την επίδραση της όξινης καταπόνησης τα βακτηριακά κύτταρα (Le Marc et al., 2010). Στο πέμπτο προφίλ πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη μεταβολή του pH και της αλατότητας, σε μία προσπάθεια προσομοίωσης των συνθηκών που αναμένεται να αντιμετωπίσουν τα κύτταρα του παθογόνου σε ένα γαλακτοκομικό προϊόν. Παρατηρήθηκε ότι το τροποποιημένο μοντέλο, (συμπεριλαμβανομένου του όρου ξ), κατάφερε να προβλέψει με ακρίβεια τόσο την μη ανάπτυξη της *L. monocytogenes* στις συνθήκες των συνδυασμένων καταπονήσεων, όσο και την ενδιάμεση φάση προσαρμογής μετά από την μεταφορά του βακτηρίου σε ευνοϊκές συνθήκες (Σχ. 5.8.ε).

Η επιλογή δυναμικών περιβαλλοντικών συνθηκών για την επικύρωση μοντέλων ανάπτυξης σε τρόφιμο έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς, κυρίως στις θερμοκρασιακές μεταβολές, λόγω της πρακτικής υπόστασης που έχει η προσομοίωση των συνθηκών κατά την αποθήκευση κι εμπορία ενός προϊόντος (Xanthiakos et al., 2006, Gougouli et al., 2008, Panagou και Nychas, 2008, Manios et al., 2009). Οι δυναμικές συνθήκες οξύτητας και αλατότητας μπορούν να προσομοιάσουν μέρος των εμποδίων αντιμετωπίζει ο παθογόνος κατά την παραγωγή ορισμένων τροφίμων (τυριά, αλλαντικά). Επιπλέον, η επιλογή ενός τροφίμου για την επικύρωση του μοντέλου, έγινε με το δεδομένο ότι στα τρόφιμα υπεισέρχονται παράμετροι, όπως η δομή, η λιποπεριεκτικότητα, η ενδογενής χλωρίδα με τα παράγωγά της ή η ύπαρξη αντιμικροβιακών ουσιών, οι οποίες ενδέχεται να επηρεάσουν σημαντικά τόσο την πιθανότητα ανάπτυξης του παθογόνου, όσο και την κινητική του όταν αυτός δύναται να αυξηθεί (Κεφ. 4.2, Xanthiakos et al., 2006, Schwartzman et al., 2010). Επομένως, η ικανότητα του μαθηματικού μοντέλου να προβλέπει με ακρίβεια την συμπεριφορά του παθογόνου κατά την διάρκεια μεταβολών της οξύτητας ή της αλατότητας στο γάλα, επιβεβαίωσε την χρησιμότητα των τροποποιήσεων που πραγματοποιήθηκαν. Περαιτέρω μελέτη σε διαφορετικές ή/και δυναμικές θερμοκρασίες (πλην των 10°C που εξετάστηκαν), με την εισαγωγή των μεταβολών οξύτητας και αλατότητας ταυτόχρονα ή κατά την φάση προσαρμογής, όπως και από/προς πιο δυσμενείς συνθήκες pH και a_w , θα βοηθήσει στην αύξηση της εγκυρότητας του μοντέλου και της

θεωρητικής του βάσης, έτσι ώστε να μπορέσει να προεκταθεί αποτελεσματικά η χρήση του και σε τρόφιμα.



Σχήμα 5.8. Ανάπτυξη του πληθυσμού της *L. monocytogenes* (■) στους 10°C σε γάλα ρυθμισμένο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος και NaCl. Η μεταβολή του pH ή της αλατότητας συμβολίζεται με διακεκομμένη γραμμή με τις τελείες, ενώ στο τελευταίο σχήμα η μεταβολή του pH συμβολίζεται με διακεκομμένη γραμμή με τελείες και παύλες. Στο σχήμα απεικονίζεται η πρόβλεψη του μοντέλου που συμπεριλαμβάνει την επίδραση των μεταφορών (συνεχής) ή όχι (διακεκομμένη με παύλες). Τα επίπεδα αλατότητας του σχήματος αναφέρονται στο πρόσθετο ποσοστό NaCl.

5.4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη, τα κύτταρα που μεταφέρθηκαν μεταξύ υποστρωμάτων διαφορετικών τιμών pH και a_w , ελήφθησαν από το τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης-αρχή της στατικής. Για τον λόγο αυτό τα αποτελέσματα δεν είναι άμεσα συγκρίσιμα με σχετικές μελέτες, στα οποίες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από την μέση της εκθετικής ή το τέλος της στατικής φάσης (Whiting και Bagi, 2002). Σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές (Mellefont et al., 2004, 2005, Robinson, 2001), τα κύτταρα στην εκθετική φάση είναι περισσότερο ευαίσθητα στις ωσμωτικές αλλαγές από τα αντίστοιχα στην στατική φάση. Τα αποτελέσματά μας αντανakλούν την απόκριση μιας ενδιάμεσης κατάστασης. Επιπλέον, μπορούν να παρέχουν συμπεράσματα για την επίδραση των μεταβολών του a_w και του pH στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* και να μειώσουν έτσι την αβεβαιότητα που υπάρχει στην μοντελοποίηση δυναμικής ανάπτυξης και στην ποσοτική μικροβιολογία κατά την εκτίμηση κινδύνου. Συγκεκριμένα, επισημάναμε ότι η παραμονή της *L. monocytogenes* σε συνθήκες μη ανάπτυξης, όπως στην περίπτωση προϊόντων με $\text{pH} < 4.4$ ή $a_w < 0.92$ ή τον συνδυασμό $\text{pH} 5.0$ και $a_w 0.94$ δεν είναι μια περίοδος, κατά την οποία ο παθογόνος απλά δεν αυξάνεται. Αντιθέτως, τέτοιου είδους συνθήκες μπορούν να πυροδοτήσουν φαινόμενα προσαρμογής ή εξασθένισης, τα οποία μπορούν να ενισχύσουν ή να μειώσουν την ανάπτυξη του βακτηρίου, όταν αυτό μεταφερθεί σε πιο ευνοϊκά περιβάλλοντα (διασταυρούμενη επιμόλυνση). Συνεπώς, οι προβλέψεις μοντέλων μικροβιακής απόκρισης κοντά στα όρια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του παθογόνου θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με προσοχή και πιθανώς οι κατάλληλες τροποποιήσεις, που θα συμπεριλαμβάνουν τα φαινόμενα προσαρμογής που περιγράφηκαν, να κρίνονται απαραίτητες. Η επίδραση των μεταβολών της a_w και του pH μελετήθηκαν ανεξάρτητα, επομένως, μελλοντικός στόχος θα μπορούσε να είναι η μελέτη της επίδρασης ταυτόχρονων μεταβολών (a_w και pH) στην ενδιάμεση φάση προσαρμογής. Ένας επιπλέον μελλοντικός στόχος θα μπορούσε να είναι η μελέτη του φαινομένου σε κύτταρα της *L. monocytogenes* που αυξάνονται σε στερεά υποστρώματα ή ακινητοποιημένα σε γαλακτώματα (λαδιού σε νερό ή νερού σε λάδι). Τα αποτελέσματά μας, αν και αναφέρονται σε μονοκαλλιέργεια, μπορούν να θεωρηθούν αντιπροσωπευτικά για την πιθανή συμπεριφορά του παθογόνου στο περιβάλλον ενός τυροκομείου, γιατί το επιλεγμένο στέλεχος απομονώθηκε από ένα τέτοιο περιβάλλον. Εντούτοις, θα ήταν επιθυμητή η μελέτη της επίδρασης καλλιέργειας πολλαπλών στελεχών στις συνθήκες του πειράματος, έτσι ώστε να συμπεριληφθεί η πιθανή διαφορετικότητα των στελεχών στην ανάπτυξη και την προσαρμογή της *L. monocytogenes* σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Shabala et al., 2008).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ (ΛΟΓΩ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ) ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *Listeria monocytogenes* ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΣΤΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΣΗ ΦΕΤΑΣ ΚΑΙ ΓΡΑΒΙΕΡΑΣ

6.1. Εισαγωγή

Η βιομηχανία παραγωγής τυροκομικών προϊόντων, αποτελεί παγκοσμίως ένα από τους σημαντικότερους κλάδους της βιομηχανίας τροφίμων, με την παραγωγή πολυάριθμων διαφορετικών τύπων τυριών, από μικρής κλίμακας βιοτεχνίες μέχρι και πολυεθνικές εταιρίες. Τα τυροκομικά προϊόντα κατηγοριοποιούνται συνήθως ανάλογα την περιεκτικότητά τους σε υγρασία (μαλακά, ημίσκληρα, σκληρά), και στη συνέχεια ανάλογα με τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται κατά τη παραγωγή και ωρίμανσή τους (Little et al., 2008, Samelis et al., 2008). Η πλειοψηφία των τυροκομικών προϊόντων ανήκουν στην κατηγορία των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων και οποιαδήποτε επιμόλυνση κατά τη διάρκεια ή μετά από την παραγωγή τους ενδέχεται να προκαλέσει τροφिमογενείς δηλητηριάσεις, όπως έχουν παρουσιαστεί και στο παρελθόν (Leite et al., 2006, Lianou και Sofos, 2007).

Η τεχνολογία παραγωγής των τυριών έχει σημαντική επίπτωση στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων, ενώ παράλληλα με την κατάλληλη συσκευασία και αποθήκευση, λειτουργεί σαν ένα σύνολο 'εμποδίων' έναντι της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών (Leistner, 2000). Με τη διασφάλιση αυτού του συνόλου εμποδίων τα προϊόντα καθίστανται ασφαλή για μακροχρόνια συντήρηση υπό ψύξη και εμπορεία τους σε διαφορετικές χώρες, ακόμα και ηπείρους. Μια τυπική τεχνολογία τυροκόμησης περιλαμβάνει κρίσιμα βήματα για τη σημαντική μείωση ή ακόμα και εξάλειψη των παθογόνων μικροοργανισμών, όπως την παστερίωση, την προσθήκη εναρκτήριας καλλιέργειας, την ωρίμαση και συσκευασία και τέλος, την αποθήκευση υπό ψύξη (Mauropoulos και Arvanitogiannis, 1999; Arvanitogiannis και Mauropoulos, 2000; Silva et al., 2003). Επιπλέον, ιδιαίτερα σημαντική είναι η μικροβιολογική κατάσταση του αρχικού προϊόντος (νωπό γάλα), τόσο για παραγωγή τυριών στην οποία περιλαμβάνεται το στάδιο της παστερίωσης (Mauropoulos και Arvanitogiannis, 1999; Silva et al., 2003), όσο κυρίως για τυριά νωπού γάλακτος (raw/unpasteurized milk cheese, Millet et al., 2006, Little et al., 2008, Samelis et al., 2009). Στις μέρες μας, παρασκευάζεται παγκοσμίως μεγάλος αριθμός τυριών από μη παστεριωμένο γάλα ή ελλιπώς παστεριωμένο γάλα (θερμισμένο), είτε λόγω παραδοσιακών τεχνολογιών ή λόγω της βελτίωσης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών που πιστεύεται από πολλούς ότι έχουν τα τελικά προϊόντα (Millet et al., 2006, Little et al., 2008).

Εξίσου σημαντική είναι η πιθανότητα διασταυρούμενης επιμόλυνσης των προϊόντων, έπειτα από επιτυχημένη παστερίωση του γάλακτος, και καθόλη τη διάρκεια παραγωγής και ωρίμανσής τους, από τις επιφάνειες και τα σκεύη χειρισμού (ιμάντες, περιέκτες, σωλήνες, ράφια ωρίμανσης, κ.α.), το γενικότερο περιβάλλον ενός τυροκομείου (πατώματα, αποχετεύσεις) και το προσωπικό που τα μεταχειρίζεται (Kousta et al., 2010). Αιτία αυτού του φαινομένου είναι ότι σε περιπτώσεις μη ικανοποιητικού καθαρισμού και απολύμανσης των επιφανειών και των σκευών, που χρησιμοποιούνται στη γραμμή παραγωγής των τυριών, κύτταρα μικροοργανισμών προσκολλούνται στις επιφάνειες και παρουσία οργανικής ύλης σχηματίζουν βιοϋμένια (Shi και Zhu, 2009). Τα κύτταρα των βακτηρίων, με τη μορφή των βιοϋμενίων, έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν για μακρά χρονικά διαστήματα στις επιφάνειες των τυροκομείων, να δημιουργούν προβλήματα στην μεταφορά θερμότητας κατά την παστερίωση, και να επιμολύνουν τα προϊόντα τόσο με παθογόνους, όσο και με αλλοιογόνους μικροοργανισμούς (Sharma και Anand, 2002, Leite et al., 2006, Wilks, et al., 2006). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που απαντώνται συχνότερα στο γάλα και τα προϊόντα του είναι οι *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* 0157:H7 και *Salmonella* spp. (Κεφ. 2, Little et al, 2008).

Για την αντιμετώπιση του προβλήματος έχουν θεσπιστεί κανονισμοί τόσο στις ΗΠΑ (από τους USDA και FDA), όσο και από την Ευρωπαϊκή Ένωση (EC 2073/2005, EC 1441/2007), που προσδιορίζουν την διαδικασία της δειγματοληψίας και οριοθετούν τα αποδεκτά επίπεδα παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα, ανάλογα με το στάδιο επεξεργασίας και τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, τους οποίους καλούνται να ικανοποιούν και οι Έλληνες παραγωγοί (Little et al., 2008; Kagli et al., 2009, Jacxsens et al., 2009). Αξίζει να αναφερθεί ότι η *L. monocytogenes* είναι ο πρώτος μικροοργανισμός που αναφέρεται στα κριτήρια ασφαλείας του κανονισμού, όπως επίσης ότι τα όριά του δεν διαφοροποιούνται μεταξύ των διαφόρων ειδών τροφίμων (τυριά, κρέατα, κ.α.), όπως σε άλλα παθογόνα βακτήρια. Συγκεκριμένα για την *L. monocytogenes* ο ΕΚ 1441/2007 επιτρέπει ως ανώτερο όριο τα 100 CFU/g (5 δειγ/ψίες, EN/ISO 11290-2) σε προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια της διατήρησής τους, ανεξαρτήτως αν είναι ικανά ή μη ικανά να υποστηρίξουν την αύξησή του. Σε προϊόντα που διατίθενται στην αγορά και προορίζονται για βρέφη ή για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς απαιτείται απουσία του παθογόνου στα 25 g (10 δειγ/ψίες, EN/ISO 11290-1). Επιπλέον, απουσία του παθογόνου απαιτείται, πριν την αποδέσμευση από τον άμεσο έλεγχο του παραγωγού, σε προϊόντα ικανά να υποστηρίξουν ανάπτυξη του μικροοργανισμού, σε περίπτωση που δεν μπορεί να αποδείξει επιστημονικά ότι το προϊόν δεν θα υπερβεί το όριο των 100 CFU/g κατά τη διάρκεια της διατήρησης. Ως μη ικανά να υποστηρίξουν ανάπτυξη αναφέρονται τα προϊόντα με $pH \leq 4,4$ ή $a_w \leq 0,92$, τα προϊόντα με $pH \leq 5,0$ και $a_w \leq 0,94$ και τα προϊόντα με διάρκεια διατήρησης μικρότερη από 5 ημέρες

(ΕΚ 1441/2007). Στην τελευταία κατηγορία μπορούν να συμπεριληφθούν και άλλες κατηγορίες προϊόντων, αρκεί να τεκμηριωθούν επιστημονικά. Ο FDA, ο οποίος πρόσφατα άλλαξε την πολιτική "μηδενικής ανέχειας" στο ανώτατο όριο των 100 CFU/g για τα τρόφιμα μη ικανά να υποστηρίξουν ανάπτυξη, συμπεριλαμβάνει σε αυτή την κατηγορία, εκτός από τα παραπάνω, και τα τρόφιμα που περιέχουν ή έχουν παραχθεί με αντιμικροβιακές ουσίες (πχ γαλακτικό οξύ, σορβικά κ.α., Kraiss, 2008). Εντούτοις, το επίπεδο των 100 CFU/g κριτικάρεται έντονα στην Αμερική από τον FSIS (USDA-FSIS), λόγω της διαφορετικής παθογένειας (virulence) των στελεχών της *L. monocytogenes*, της διαφορετικής φυσικής κατάστασης των ατόμων που δύναται να εκτεθούν σε αυτό το επίπεδο και γενικότερα λόγω του ότι δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα να το υποστηρίξουν. Τονίζουν, επίσης, την πιθανή διασταυρούμενη επιμόλυνση από προϊόντα "μη ικανά", που περιέχουν λιγότερο από 100 CFU/g, σε προϊόντα "ικανά" που παράγονται στο ίδιο περιβάλλον ή ακόμα και στην ίδια γραμμή παραγωγής (Kraiss, 2008). Το τελευταίο μπορεί να συνδεθεί με την Ελληνική πραγματικότητα, δεδομένου ότι τα περισσότερα τυροκομεία παράγουν μαλακά τυριά από τον ορό που παράγεται κατά την παραγωγή Φέτας ή Γραβιέρας (Panagou et al., 2012). Από τη μελέτη του κανονισμού διαφαίνεται το πόσο σημαντικό είναι για έναν παραγωγό να γνωρίζει τη συμπεριφορά της *L. monocytogenes* στα προϊόντα του σε όλη τη διάρκεια του χρόνου ζωής τους.

Η φυσιολογία των κυττάρων της *L. monocytogenes* είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επιδρούν στην συμπεριφορά και την κινητική του κατά την παραγωγή, ωρίμαση και αποθήκευση διαφόρων τυριών παγκοσμίως. Η προϋπαρξη του παθογόνου σε περιβάλλοντα με διαφορετικά χαρακτηριστικά (pH, aw, θερμοκρασία, υγρασία, οξέα), ο χρόνος παραμονής του σε αυτά και οι ενδεχόμενες διαδοχικές μετακινήσεις του σε διαφορετικά περιβάλλοντα αποτελούν την προϊστορία ή αλλιώς τη φυσιολογία του. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με τη συμπεριφορά της *L. monocytogenes* κατά την παραγωγή τυριών, έχουν χρησιμοποιήσει ένα μόνο στέλεχος του παθογόνου ή διαφορετικά στελέχη σαν μίγμα (Erkmen, 2000, Morgan et al., 2001, Kagli et al., 2009, Samelis et al., 2009). Εντούτοις, επιμόλυνση δύναται να προκύψει από ποικίλες πηγές, όπως γάλα, άλμη, επιφάνειες, προσωπικό, ενδιάμεσα προϊόντα, άλλα τυριά κ.α., η καθεμία από τις οποίες επιδρά διαφορετικά στη φυσιολογία του μικροοργανισμού (Ribeiro et al., 2006). Πρώτοι οι Parageorgiou και Marth (1989) μελέτησαν τις διαφορετικές συμπεριφορές δύο στελεχών *L. monocytogenes* (ScottA: ορότυπος 4b, απομόνωση από νοσούντα, California (CA): ορότυπος 4b, απομόνωση από τυρί), κατά τη διάρκεια ταυτόχρονων τυροκομήσεων Φέτας, εργαστηριακού επιπέδου. Τα δύο στελέχη παρουσίασαν αντίστοιχη ανάπτυξη (από $10^{3.5}$ σε 10^6 CFU/g) κατά τη διάρκεια της παραγωγής (μέχρι τη μείωση του pH), διαφορετική ωστόσο επιβίωση κατά τη διάρκεια της ωρίμασης, στο τέλος της οποίας οι πληθυσμοί τους ανέρχονταν σε 10^5 CFU/g για το ScottA και 10^3 CFU/g για το CA. Επιπλέον, ενδιαφέρον έχει να εκτιμηθεί κατά πόσο η επιβίωση του παθογόνου

στο δυσμενές περιβάλλον ενός τυροκομείου ή ενός τυροκομικού προϊόντος, με ο, τι αυτό συνεπάγεται, το καθιστά ισχυρότερο ή ασθενέστερο, από ότι θα ήταν αν προϋπήρχε σε ένα πιο ευνοϊκό περιβάλλον, όπως αυτό του γάλακτος ή σε ένα μαλακό τυρί.

Σκοπός της εργασίας ήταν η συγκριτική μελέτη των κρίσιμων παραγόντων που επηρεάζουν την συμπεριφορά της *L. monocytogenes* καθόλη τη διάρκεια παραγωγής και ωρίμασης δύο δημοφιλών Ελληνικών τυριών, της Φέτας και της Γραβιέρας. Συγκεκριμένα οι παράγοντες που εξετάστηκαν ταυτόχρονα ήταν τρεις: α) η τεχνολογία παραγωγής, η οποία μεταξύ των δύο τυριών έχει σημαντικές διαφορές που αντικατοπτρίζονται και στα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, β) το στάδιο επιμόλυνσης του προϊόντος στις δύο τεχνολογίες και τέλος γ) η φυσιολογία του παθογόνου σε κάθε στάδιο ενοφθαλμισμού.

6.2 Υλικά και μέθοδοι

6.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Για τους σκοπούς της μελέτης πραγματοποιήθηκαν παραδοσιακές τυροκομήσεις Φέτας και Γραβιέρας από πρόβειο γάλα σε εργαστηριακή κλίμακα. Στόχος ήταν η συγκριτική αξιολόγηση της τεχνολογίας παραγωγής των τυριών, του σταδίου επιμόλυνσής τους με *L. monocytogenes* και της φυσιολογίας του, όσον αφορά την επίδρασή τους στη συμπεριφορά του παθογόνου κατά την παραγωγή και ωρίμαση των τυριών. Αρχικά, επιλέχθηκαν δύο δημοφιλή Ελληνικά τυριά από πρόβειο γάλα, με διαφορετικές ωστόσο τεχνολογίες παρασκευής. Στη παρασκευή Φέτας αναμένεται σημαντική πτώση του pH από τις πρώτες 24 ώρες παραγωγής, δεδομένης όμως της υψηλής υγρασίας του τυριού (6% άλμη από τη 2^η έως την 15^η ημέρα) και της θερμοκρασίας της πρώτης ωρίμασης (18°C), δεν αποκλείεται η επιβίωση του παθογόνου, ιδιαίτερα αν έχει αυξηθεί κατά τις πρώτες 24 ώρες παραγωγής. Στη τεχνολογία της Γραβιέρας υπάρχουν περισσότερα εμπόδια για τον παθογόνο κατά τη διάρκεια της παραγωγής (αναθέρμανση, προσθήκη αλατιού, λεπτόκοκκος τεμαχισμός, πίεση), εντούτοις, η θερμοκρασία της πρώτης ωρίμασης (18°C για 7 ημέρες) και η υψηλή τιμή pH (>5,5) σε όλη την διάρκεια της ωρίμασης αυξάνει την επικινδυνότητα του τελικού προϊόντος. Τα τρία στάδια από το διάγραμμα ροής των τυριών, που πραγματοποιήθηκε ο ενοφθαλμισμός (γάλα μετά την παστερίωση, τυρόπηγμα μετά τον τεμαχισμό και κεφάλι τυρί μετά την πρώτη ωρίμαση), επιλέχθηκαν σύμφωνα με την αυξημένη πιθανότητα να επιμολυνθούν σε αυτά, τα ενδιάμεσα προϊόντα στις συνθήκες ενός τυροκομείου. Τέλος, η επιλογή των στελεχών της *L. monocytogenes* με διαφορετική φυσιολογία, έγινε για να προσομοιάσει την ποικιλομορφία των ενδεχόμενων πηγών επιμόλυνσης των τυριών. Συγκεκριμένα, τα πλαγκτονικά (σε αιώρηση) κύτταρα προσομοιάζουν επιμόλυνση από άλλα αρχικά, ενδιάμεσα και τελικά τυροκομικά προϊόντα που συνυπάρχουν στο χώρο της παραγωγής και της αποθήκευσης, παραπροϊόντα, απόβλητα, κ.α., και τα βιοϋμένια (κύτταρα αποκολλημένα από επιφάνειες) προσομοιάζουν επιμόλυνση από επιφάνειες επεξεργασίας, εργαλεία ανάδευσης και τεμαχισμού, σκεύη αποθήκευσης, χέρια και ποδιές προσωπικού, κ.α. Τα πλαγκτονικά κύτταρα και τα βιοϋμένια προϋπήρχαν σε TSBYE (άριστο περιβάλλον), MRD (έλλειψη θρεπτικών συστατικών), γάλα (υψηλά pH, a_w), γραβιέρα (υψηλό pH, χαμηλή a_w), και φέτα (χαμηλό pH, χαμηλή a_w). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα προσαρμοσμένα (OA) ή μη (MO) σε όξινες συνθήκες.

6.2.2. Επιλογή και προετοιμασία των βακτηριακών στελεχών

Για την δημιουργία των εμβολίων χρησιμοποιήθηκαν επτά στελέχη της *L. monocytogenes*, τα οποία αποτελούσαν απομονώσεις από επιφάνειες τυροκομείων (T₁₋₂: Πλακάκια δαπέδου, T₁₋₉:

μεταλλική επιφάνεια πιεστηρίου, T₁₋₁₂: Απόβλητα, C₅) και γαλακτοκομικών προϊόντων (T₂₋₉: Ανθότυρο, 6179) της Ελλάδας και της Ιρλανδίας και από νοσούντες (Scott A). Η επιλογή των στελεχών έγινε έτσι ώστε να μελετηθούν στελέχη αντιπροσωπευτικά των πιο αντίξων συνθηκών που μπορεί να αντιμετωπίσει το εν λόγω βακτήριο και να καταστεί ασφαλέστερη η γενίκευση των αποτελεσμάτων (Kagli et al., 2009). Συγκεκριμένα, τα απομονωμένα στελέχη από επιφάνειες επιλέχθηκαν για την αυξημένη ανθεκτικότητα που αναμένεται να παρουσιάσουν σε συνθήκες καταπόνησης, λόγω της χρόνιας παραμονής τους σε ακραίες συνθήκες (χαμηλό a_w, έλλειψη θρεπτικών συστατικών, απολύμανση). Τα απομονωμένα στελέχη από τυρί ενδέχεται να είναι περισσότερο ανθεκτικά σε περιβάλλον με χαμηλό pH και υψηλή αλατότητα, σε σχέση με αντίστοιχα στελέχη απομονωμένα από τρόφιμα με ευνοϊκότερες φυσικοχημικές ιδιότητες (π.χ. κρέας ή ψάρι, Faleiro et al., 2003). Επιπλέον, επιλέχθηκαν στελέχη από δύο χώρες με διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες και διαφορετικό μέσο όρο θερμοκρασίας, ώστε να καλυφτεί το ενδεχόμενο η μακρόχρονη παραμονή σε χαμηλές θερμοκρασίες (Ιρλανδία) ή υψηλές (Κρήτη) αντίστοιχα να έχει εισάγει ανθεκτικότητα στο παθογόνο σε άλλες συνθήκες καταπόνησης. Τέλος, εκτός από μεγάλη σημασία του στελέχους Scott A στη σύγκριση των αποτελεσμάτων της μελέτης, εξαιτίας της ευρύτατης χρήσης του στην παγκόσμια βιβλιογραφία, σαν απομόνωση από νοσούντα, έχει υπάρξει σε δυσμενή περιβάλλοντα, όπως αυτό του ανθρώπινου στομάχου (pH 1,5).

Τα στελέχη *L. monocytogenes*, παρέμεναν στους -22°C σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSBYE παρουσία 20% γλυκερόλης. Για την ενεργοποίησή του κάθε στελέχους χωριστά πραγματοποιήθηκε επώαση, 0,1 ml της προηγούμενης καλλιέργειας σε 10 ml TSBYE στους 37°C, αρχικά για 24 ώρες και ακολούθως για 16 ώρες, διάρκεια στην οποία το βακτήριο εισέρχεται στην στατική φάση ανάπτυξης (10⁹ CFU/ml), που θεωρείται η φάση στην οποία βρίσκονται οι περισσότεροι μικροοργανισμοί στα τρόφιμα (Skandamis et al., 2008). Στη συνέχεια το σύνολο της καλλιέργειας μεταγγίστηκε σε falcon χωρητικότητας 15 ml και φυγοκεντρήθηκε (3600 rpm, 4°C, 15 λεπτά). Ακολούθησε διπλή έκπλυση των κυττάρων με φυγοκέντρηση (ως άνω) κι επαναιώρηση της βιομάζας σε MRD. Ο επιθυμητή συγκέντρωση ενοφθαλισμού του κάθε στελέχους του βακτηρίου επιτεύχθηκε μετά από διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις της τελευταίας επαναιώρησης σε MRD.

6.2.3. Προετοιμασία καλλιεργειών με διαφορετική φυσιολογική κατάσταση προς ενοφθαλισμό

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία των διαφορετικών τύπων κυττάρων ήταν τα εξής: TSBYE, MRD, πλήρες φρέσκο γάλα απλής παστερίωσης, Φέτα και Γραβιέρα σε εμπορικές συσκευασίες. Τα υποστρώματα που υποστηρίζουν ανάπτυξη του παθογόνου (TSBYE, MRD, γάλα) εμβολιάστηκαν με 10²⁻³ CFU/ml από το κάθε στέλεχος, ενώ τα τυροκομικά προϊόντα, που υποστηρίζουν επιβίωση, εμβολιάστηκαν με 10⁶⁻⁷ CFU/ml της *L. monocytogenes*. Συγκεκριμένα,

κάθε δείγμα τυριού (100 g) τεμαχίστηκε σε δύο ίσα μέρη (50 g) κι εμβολιάστηκε επιφανειακά με 0,4 ml (0,1 ml x 4) από την τελική καλλιέργεια του κάθε στελέχους (διαφορετικό στέλεχος ανά δείγμα). Ακολουθούσε τοποθέτηση επιφανειών ανοξειδωτού χάλυβα (5*2*0,2 cm) ανάμεσα στα δύο τεμάχια των τυριών, έτσι ώστε να σχηματιστούν βιοϋμενικά κύτταρα και από τις δύο πλευρές τους. Παράλληλα, ποσότητα 1 ml από την επιθυμητή συγκέντρωση των στελεχών μεταφέρθηκε σε σωλήνες falcon (περιεκτικότητα 50 ml), οι οποίοι περιείχαν 40 ml από το κάθε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (TSBYE, MRD, γάλα), με στόχο την τελική τους συγκέντρωση στο υπόστρωμα τα 10^{2-3} CFU/ml. Στους σωλήνες προστέθηκαν αποστειρωμένες επιφάνειες από ανοξειδωτο χάλυβα (ως ανωτέρω), με τρόπο ώστε να καλύπτονται πλήρως από τα υποστρώματα. Ακολούθησε επώαση όλων των υποστρωμάτων στους 20°C για διάστημα 4 ημερών και παραλαβή των πλαγκτονικών κυττάρων (ΠΚ) κι αποκολλημένων κυττάρων (ΑΚ, βιοϋμενίων), με την μέθοδο glass beads, που έχει περιγραφεί σε προηγούμενα κεφάλαια της διατριβής (Κεφ. 3). Κάθε ένα από τα εμβόλια του πειράματος (π.χ. γάλα πλαγκτονικά, γραβιέρα βιοϋμένια, κ.τ.λ) προήλθε από την ένωση 1ml από κάθε επανάληψη του κάθε στελέχους που εμβολιάστηκε στο συγκεκριμένο υπόστρωμα: 7 στελέχη*2 επαναλήψεις*1ml=14ml, τα οποία στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν, εκπλύθηκαν δις με MRD και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2 ml MRD για να χρησιμοποιηθεί στον ενοφθαλμισμό των τυριών. Υπενθυμίζεται ότι μετά από την διαδικασία απόξεσής τους τα βιοϋμένια βρίσκονται σε αιώρηση (αποκολλημένα κύτταρα) σε MRD. Για την παραλαβή των πλαγκτονικών κυττάρων από τη Φέτα και τη Γραβιέρα 10 g τροφίμου αναμίχθηκαν με ίση ποσότητα MRD, ακολούθησε ομογενοποίηση και παραλαβή 1ml από κάθε επανάληψη του κάθε στελέχους, όπως στα υγρά υποστρώματα. Επιπλέον, μελετήθηκαν κύτταρα του παθογόνου προσαρμοσμένα σε όξινης συνθήκες (AA), μετά από την διπλή καλλιέργεια τους (σε χρόνους και θερμοκρασίες που αναφέρονται ανωτέρω) σε TSBYE με προσθήκη 1% γλυκόζης και μη προσαρμοσμένα σε όξινης συνθήκες (NA), μετά από την καλλιέργεια τους σε TSBYE απουσία γλυκόζης. Σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, ώστε το κάθε εμβόλιο να έχει την επιθυμητή τελική συγκέντρωση.

6.2.4. Παρασκευή των δειγμάτων Φέτας και Γραβιέρας κι ενοφθαλμισμός

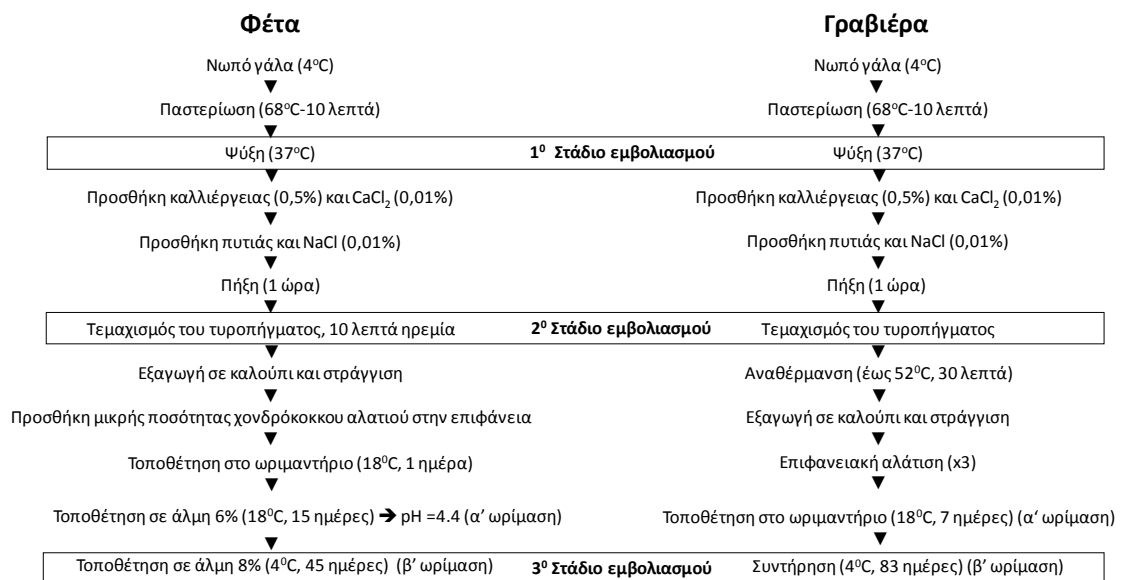
Παρασκευάστηκαν εργαστηριακά δείγματα μαλακού τυριού τύπου Φέτας και σκληρού τυριού τύπου Γραβιέρας, σύμφωνα με την τυπική γραμμή παραγωγής από 100% πρόβειο γάλα. Η διάρκεια ωρίμασης των δειγμάτων τροποποιήθηκε ανάλογα με το μέγεθός τους (100±10 g στα δείγματα Φέτας και 150±10g στα δείγματα Γραβιέρας), ενώ το τέλος της ορίστηκε με βάση την οξύτητα ($pH=4,7 \pm 0,05$) για τα δείγματα Φέτας και την υγρασία για τα δείγματα της Γραβιέρας (<38%). Ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών καθορίζει συγκεκριμένα όρια για το είδος και την προέλευση του

γάλακτος, καθώς και για τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, το μέγεθος, την υφή και την διάθεση των τελικών προϊόντων. Τα κεφάλια των δύο τυριών που παρασκευάστηκαν στα πλαίσια του πειράματος κάλυπταν στο ακέραιο όλες τις προϋποθέσεις που θέτει ο ΚΤΠ, εκτός ίσως από το μέγεθος. Αν και στον Κώδικα δεν αναφέρεται συγκεκριμένο μέγεθος και βάρος για τα δύο τυριά (Βάρη/Διάσταση: Διάφορα), στο εμπόριο κυκλοφορούν συνήθως σε κεφάλια άνω του ενός κιλού (ΚΤΠ, 1998). Ωστόσο, λόγω της πολυπαραγοντικής φύσης του πειράματος (σύνολο 156 κεφάλια), της επαναληψιμότητας, της χρήσης ενός παθογόνου μικροοργανισμού, που απέκλισε την δυνατότητα μεταφοράς του πειράματος στις εγκαταστάσεις ενός τυροκομείου, της έλλειψης εξοπλισμού κατάλληλου να δεχθεί μεγάλες ποσότητες γάλακτος και τυριού (καζάνια, παστεριωτήρες, καλούπια, ωριμαντήριο, ψυγεία κ.α.) και την ανάγκη να είναι όλα τα σκεύη και τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα, το τελικό μέγεθος των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν ήταν σημαντικά μικρότερο από του εμπορίου ως εκ τούτου ήταν τυριά **τύπου Φέτας** και **τύπου** Γραβιέρας. Εντούτοις, από τη στιγμή που τα τυριά αυτά χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά για τις ανάγκες του πειράματος και κυρίως για χάριν ευκολίας, στο κείμενο θα αναφέρονται σαν Φέτα και Γραβιέρα.

Ο ενοφθαλισμός πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια της τυροκόμησης των δειγμάτων τυριών ως εξής: στο γάλα μετά την παστερίωση, στο τυρόπηγμα μετά τον τεμαχισμό του και σε κεφάλια τυριού μετά την πρώτη ωρίμαση (πριν την συντήρηση στους 4°C). Η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων του παθογόνου σε κάθε περίπτωση ήταν 10^{2-3} CFU/ml. Μετά τον ενοφθαλισμό τους τα δείγματα αποθηκεύτηκαν, σε θαλάμους υψηλής ακρίβειας, στην κατάλληλη θερμοκρασία ανάλογα με το στάδιο της τυροκόμησης.

Αναλυτικότερα, η διαδικασία τυροκόμησης κάθε τυριού ξεκινούσε με την παραλαβή φρέσκου, νωπού, ομογενοποιημένου και φιλτραρισμένου πρόβειου γάλακτος από τοπικό παραγωγό. Αμέσως μετά την παραλαβή ακολουθούσε η κατανομή του γάλακτος σε αποστειρωμένα ποτήρια ζέσεως των 2L (σκεπασμένα με αλουμινόχαρτο) και η παστερίωσή του σε προθερμασμένα υδατόλουτρα (68°C για 10 λεπτά). Ο όγκος του γάλακτος σε κάθε ποτήρι ζέσεως ήταν 2L, η θερμοκρασία του γάλακτος ελέγχονταν συνεχώς με αποστειρωμένο ειδικό θερμόμετρο, ενώ είχε προηγηθεί προκαταρκτικό πείραμα για την επίτευξη των επιθυμητών χρόνων και θερμοκρασιών στο υδατόλουτρο. Παράλληλα, λαμβάνονταν δείγματα νωπού και παστεριωμένου γάλακτος για τον έλεγχο της ΟΜΧ, των οξυγαλακτικών βακτηρίων, των ζυμών και μυκήτων, των εντεροβακτηρίων, των κολοβακτηριδίων, των μικρόκοκκων, του *S. aureus* και της *L. monocytogenes*. Με το πέρας της παστερίωσης, τα ποτήρια ζέσεως που περιείχαν το γάλα μεταφέρονταν σε παγολεκάνες, για να πραγματοποιηθεί η ψύξη του γάλακτος (37°C). Στα δείγματα που είχαν επιλεγεί για το πρώτο στάδιο ενοφθαλισμού, ακολουθούσε προσθήκη 2 ml από το κάθε εμβόλιο στο αντίστοιχο ποτήρι ζέσεως

που προορίζονταν για το συγκεκριμένο εμβόλιο (6 εμβόλια ανά τυρί), έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των κυττάρων στο γάλα να είναι 10^{2-3} CFU/ml και ανάδευση. Ανεξαρτήτως σταδίου ενοφθαλμισμού και τύπου τυριού, ακολουθούσε προσθήκη, υπό ανάδευση, ποσότητας (1%) εμπορικού γιαουρτιού (πρόβειο, 10% λιπ/τα) και χλωριούχου ασβεστίου CaCl_2 (0,01%), που ενισχύει την ποιότητα του πήγματος. Τα ποτήρια ζέσεως μεταφέρονταν σε υδατόλουτρα (37°C), όπου το γάλα παρέμενε σε ηρεμία για 20 λεπτά. Ακολουθούσε προσθήκη εμπορικής πυτιάς (0,01%) και χλωριούχου νατρίου αναλυτικής καθαρότητας (0,01%) και προσεκτική ανάδευση του γάλατος. Μετά από 10-15 λεπτά γινόταν ο έλεγχος της πρόπτηξης. Αν υπήρχαν ενδείξεις ότι το γάλα άρχιζε να πήζει, αφήνονταν σε ηρεμία στο υδατόλουτρο για 1 ώρα. Σε διαφορετική περίπτωση προσθέτονταν η ίδια ποσότητα πυτιάς και επαναλαμβάνονταν η όλη διαδικασία.



Σχήμα 6.1. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων μιας τυπικής τυροκόμησης Φέτας και Γραβιέρας. Το πρώτο στάδιο ενοφθαλμισμού των δειγμάτων με τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* έλαβε χώρα μετά την παστερίωση και την ψύξη του γάλακτος, το δεύτερο κατά τον τεμαχισμό του τυροπήγματος και το τρίτο στην αρχή της δεύτερης ωρίμασης των τυριών.

Στη συνέχεια λαμβάνανε χώρα τεμαχισμός του πήγματος με τη βοήθεια αποστειρωμένων μαχαιριών, σε κύβους των 1-2cm για τη Φέτα ή σε μέγεθος ρυζιού για τη Κεφαλογραβιέρα. Στα δείγματα που είχαν επιλεγεί για το δεύτερο στάδιο ενοφθαλμισμού, ακολουθούσε προσθήκη 2 ml από το κάθε εμβόλιο στο αντίστοιχο ποτήρι ζέσεως που προορίζονταν για το συγκεκριμένο εμβόλιο (6 εμβόλια ανά τυρί), έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των κυττάρων στο πήγμα να είναι 10^{2-3} CFU/g και ανάδευση του τυροπήγματος.

Έπειτα από το στάδιο του τεμαχισμού του τυροπήγματος, η τεχνολογία παραγωγής των δύο τυριών διαφέρει. Κατά την παραγωγική διαδικασία που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο, μετά το τεμαχισμό του, το τυρόπηγμα της Φέτας κατανεμήθηκε σε αποστειρωμένους αλουμινένιους περιέκτες με τρύπες για την απομάκρυνση του ορού. Κατά τη διάρκεια της στράγγισης προστέθηκε μικρή ποσότητα χοντροκομμένου εμπορικού αλατιού στην επιφάνεια των δειγμάτων, ενώ για την αποφυγή επιμόλυνσης οι μεταλλικοί περιέκτες καλύπτονταν με πλαστικά δισκία. Μετά το πέρας της στράγγισης (περίπου 2 ώρες) τα δείγματα μεταφέρθηκαν με τους περιέκτες τους, σε ειδικούς κλιβάνους, όπου παρέμειναν στους 18°C για 24 ώρες. Ακολούθησε απομάκρυνση των περιεκτών και τοποθέτηση του κάθε δείγματος σε πλαστική συσκευασία, στην οποία σφραγίστηκε αεροστεγώς (συνθήκες περιβάλλοντος) μαζί με κατάλληλη ποσότητα άλμης 6% ώστε να καλύπτεται πλήρως. Στην κατάσταση αυτή παρέμεινε για 15 ημέρες στους 18°C, μέχρι την ολοκλήρωση της πρώτης ωρίμασης, η οποία σημάνθηκε από την πτώση του pH στο 4,7. Στη τυροκόμηση της Γραβιέρας αντίθετα, μετά τον τεμαχισμό του πήγματος ακολούθησε η αναθέρμανσή του με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από τους 37°C στους 52°C για σύνολο 30 λεπτών. Το τυρόπηγμα διαμοιράστηκε στη συνέχεια σε αλουμινένιους περιέκτες με τρύπες για να στραγγίξει ο ορός του γάλακτος. Η στράγγιση ολοκληρώθηκε μετά από τρεις επαλείψεις με χονδρόκοκκο αλάτι στην επιφάνεια του κάθε τυριού ανά μισή ώρα (σύνολο 2 ώρες). Στη συνέχεια τα δείγματα Γραβιέρας συσκευάστηκαν ξεχωριστά σε πλαστικές συσκευασίες, οι οποίες σφραγίστηκαν αεροστεγώς και παρέμειναν στους 18°C για 7 ημέρες, για να μειωθεί η υγρασία τους, λόγω του αλατιού και να ολοκληρωθεί η πρώτη ωρίμαση. Τα δείγματα Φέτας που είχαν εμβολιστεί κατά τα πρώτα δύο στάδια μεταφέρθηκαν, μετά την πρώτη ωρίμαση σε καινούργιες πλαστικές συσκευασίες, με προσθήκη άλμης 8% , οι οποίες σφραγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε κλιβάνους στους 4°C. Τα αντίστοιχα δείγματα Γραβιέρας μεταφέρθηκαν απλώς από κλιβάνους των 18°C σε κλιβάνους των 4°C. Στα δείγματα (κεφάλια) των τυριών, που είχαν επιλεγεί να εμβολιαστούν στο τέλος της πρώτης ωρίμασης, πραγματοποιήθηκε επιφανειακός ενοφθαλμισμός με 0,2 ml (2 επιφάνειες x 0,1 ml) από την κατάλληλη αραιώση του κάθε εμβολίου (12 εμβόλια ανά τυρί), έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του παθογόνου στο τυρί να είναι 10^{2-3} CFU/g. Ακολούθησε η συσκευασία των δειγμάτων σε πλαστικούς περιέκτες και η συντήρησή τους στους 4°C, όπως αναφέρεται ανωτέρω.

6.2.5. Μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις

Η χρονική διάρκεια της τυροκόμησης και ωρίμασης των τυριών καθορίστηκε στις 90 ημέρες για τη Φέτα και Γραβιέρα, στην διάρκεια των οποίων πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες για τον έλεγχο της πορείας της *L. monocytogenes* καθώς και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των τυριών. Για τη δειγματοληψία του πήγματος ή των τυριών γινόταν ομογενοποίηση των δειγμάτων με MRD σε

αναλογία 1:10, ενώ για το γάλα 1 ml του δείγματος μεταφερόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 9 ml MRD. Ακολουθούσε επιφανειακή επίστρωση σε τρυβλία ALOA (για την καταμέτρηση της *L. monocytogenes*, 37°C, 2 ημ., EN ISO 11290-2:1998) και σε τρυβλία TSA (για καταμέτρηση της ολικής μεσόφιλης μικροχλωρίδας, 30°C, 2 ημ.). Για τον έλεγχο της μικροβιολογικής κατάστασης του νωπού και παστεριωμένου γάλακτος έγινε ενσωμάτωση 1ml γάλακτος σε: TSA (OMX, 30°C για 2 ημ., ISO 4833:2003), MRS (οξυγαλακτικά, 30°C, 3 ημ., EN ISO 15214:1998), VRBG (εντεροβακτήρια, 37°C, 1 ημ., EN ISO 5552:1997), Chromocult (Κολοβακτηρίδια, 37°C, 1 ημ., EN ISO 4832:2006), επιφανειακή επίστρωση 0,1 ml γάλακτος σε YGC (ζύμες και μύκητες, 25°C, 5 ημ., EN ISO 6611:2004) και BP (μικρόκοκκοι και *St. aureus*, 37°C, 2 ημ., EN ISO 6888-1:1999) και προσθήκη 1ml γάλακτος σε 9 ml 1/2 Fraser (ανίχνευση *L. monocytogenes*, EN ISO 11290-1:1998). Παράλληλα με τις μικροβιολογικές, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του pH των δειγμάτων με ψηφιακό πεχάμετρο (pH 691, Metrohm), της ενεργότητας ύδατος με ενεργόμετρο (HygroLab Rotronic, Bassersdorf, Switzerland) και της υγρασίας των δειγμάτων σύμφωνα με το πρότυπο ISO 5534 - IDF 4. Αναλυτικότερα, πορσελάνινες κάψες πληρωμένες με NaCl μαζί με μια υάλινη ράβδο θερμαίνονταν στους 102°C για 4 ώρες. Στη συνέχεια τοποθετούνταν προσεκτικά σε ειδικά ξηραντήρια, μέχρι να αποκτήσουν την θερμοκρασία περιβάλλοντος και να σταθεροποιηθεί το βάρος τους. Μετά την προσθήκη του δείγματος στην κάψα και της ενσωμάτωσής του στο NaCl με τη βοήθεια της υάλινης ράβδου, το σύνολο θερμαίνονταν στους 102 °C για άλλες 4h. Το ποσοστό της υγρασίας υπολογίστηκε από τους τύπους του προτύπου.

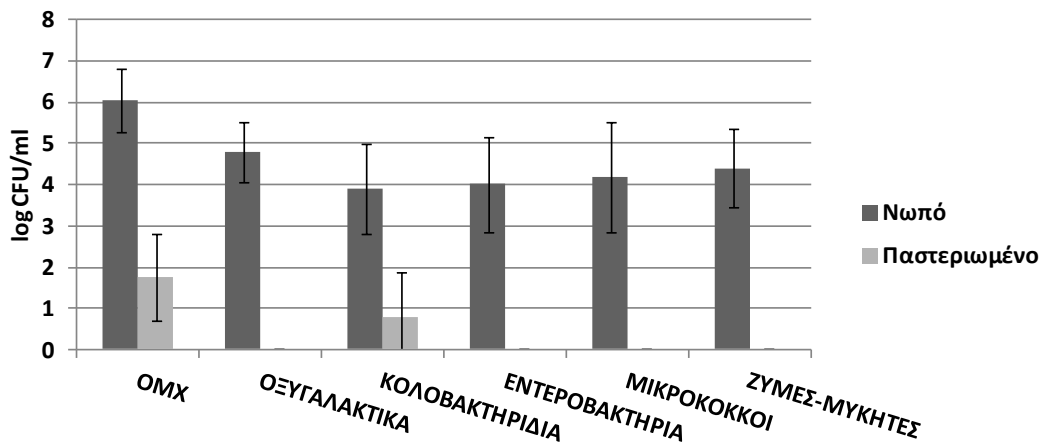
6.2.6. Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Από τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων υπολογίστηκε ο αριθμός των μικροοργανισμών σε CFU/g ή ml, για τα στερεά και τα υγρά τρόφιμα αντίστοιχα, σύμφωνα με το πρότυπο ISO 15214:1998, ο οποίος στη συνέχεια εκφράστηκε σε δεκαδικό λογάριθμο (log CFU/g ή log CFU/ml). Στα διαγράμματα απεικονίζονται ο μέσος όρος των λογαρίθμων των επαναλήψεων και η τυπική τους απόκλιση από αυτόν. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS (16.0). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των πειραματικών δεδομένων με ένα δυναμικό ενοποιημένο (integrated) μοντέλο, από την βάση δεδομένων GroPIN (Psomas και Skandamis, 2013, <http://www.aua.gr/psomas/gropin/>). Από το πρόγραμμα επιλέχθηκε για την κινητική ανάπτυξης το μοντέλο 311, ένα gamma concept μοντέλο σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Mejlholm et al., 2010), για την κινητική θανάτωσης το 301, πολυωνυμικό μοντέλο σε υγρό υπόστρωμα (BHIB), που περιλαμβάνει μεταξύ άλλων την επίδραση του γαλακτικού οξέος (Buchanan et al., 1997) και για την πιθανότητα ανάπτυξης το 290, ένα μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης σε υγρό υπόστρωμα (TSB, Koutsoumanis και Sofos, 2005).

6.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

6.3.1. Υγιεινολογική κατάσταση νωπού γάλακτος και πληθυσμοί εμβολίων

Ύψιστη σημασία για την ποιότητα και την ασφάλεια ενός τυροκομικού προϊόντος κατέχει η υγιεινολογική κατάσταση του νωπού γάλακτος από το οποίο πρόκειται να παραχθεί. Η μικροβιολογική κατάσταση του γάλακτος πρέπει να είναι τουλάχιστον ικανοποιητική και σε επίπεδα που να επιτρέπει την τυροκόμηση να λάβει χώρα. Όπως είναι γνωστό όταν το γάλα είναι επιβαρυνμένο μικροβιολογικά "κόβει" κατά την θέρμανσή του. Όσο μάλιστα καλύτερη είναι η ποιότητα του νωπού γάλακτος, τόσο αυξάνονται οι πιθανότητες παραγωγής ενός ασφαλούς τροφίμου με άριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Στα πλαίσια του πειράματος, εξετάστηκε λεπτομερώς η μικροβιολογική κατάσταση του νωπού γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε, με σκοπό την πληρέστερη γνώση του ανταγωνισμού της *L. monocytogenes*.



Σχήμα 6.2. Υγιεινολογική κατάσταση του νωπού και του παστεριωμένου γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε στις εργαστηριακές τυροκομήσεις Φέτας και Γραβιέρας. Μετρήθηκαν η ολική μεσόφιλη μικροχλωρίδα (TSA), τα οξυγαλακτικά βακτήρια (MRS), τα κολοβακτηριδία (Chromocult), τα εντεροβακτήρια (VRBG), οι μικροκόκκοι (BPA) και οι ζύμες και μύκητες (YGC).

Στο σχήμα 6.2. φαίνονται τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής εξέτασης του γάλακτος πριν και μετά την παστερίωση που πραγματοποιήθηκε στην αρχή της κάθε τυροκόμησης. Αναλυτικά παρατηρήθηκε σημαντική μείωση, αλλά όχι πλήρης θανάτωση στην ολική μεσόφιλη μικροχλωρίδα και των πληθυσμών των κολοβακτηριδίων. Αντίθετα, κάτω από το όριο αρίθμησης βρέθηκαν μετά την παστερίωση οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων, των εντεροβακτηρίων, των μικροκόκκων καθώς και των ζυμών και μυκήτων, το σύνολο των οποίων βρισκόταν στους 4 λογαρίθμους στο νωπό γάλα (Σχ. 6.2.). Επιπλέον, αρνητικά βρέθηκαν όλα τα δείγματα νωπού και παστεριωμένου γάλακτος, που εξετάστηκαν για την παρουσία της *L. monocytogenes* (EN ISO 11290-1:1998). Παρά την

επιβαρυσμένη αρχική μικροβιολογική κατάσταση γάλακτος η παστερίωσή του μείωσε τους πληθυσμούς σε αποδεκτά από την νομοθεσία επίπεδα (ΕΚ 1441/2007). Σημαντική κρίθηκε η απουσία παρεμποδιστικών στο παθογόνο μικροοργανισμών, όπως είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια, ιδιαίτερα οι εντερόκοκκοι, μέσω της παραγωγής βακτηριοσινών (Sulzer και Busse, 1991).

Για τη δημιουργία κυττάρων της *L. monocytogenes* με διαφορετική φυσιολογία χρησιμοποιήθηκαν επτά υποστρώματα διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων (TSBYE, MRD, γάλα, Φέτα, Γραβιέρα, TSBYE+G, TSBYE-G), τα οποία εμβολιάστηκαν με κύτταρα του παθογόνου και συντηρήθηκαν 4 ημέρες στους 20°C, παρουσία επιφανειών ΑΧ για τον σχηματισμό βιοϋμενίων. Όσον αφορά τα πλαγκτονικά κύτταρα στα υγρά υποστρώματα παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού από τους 2-3 log CFU/ml, που εμβολιάστηκε στους 7 log CFU/ml για το γάλα και τους 8-9 λογαρίθμους κατά προσέγγιση για το MRD το TSBYE. Στο γάλα, η παράλληλη ανάπτυξη της ενδογενούς μικροβιολογικής χλωρίδας περιόρισε την περαιτέρω ανάπτυξη της *L. monocytogenes*. Στη Γραβιέρα και τη Φέτα ο πληθυσμός του μικροοργανισμού επιβίωσε στα αρχικά του επίπεδα (10^{6-7} CFU/ml). Όσον αφορά τα αποκολλημένα κύτταρα, τα σχηματισμένα βιοϋμένια που αποκολλήθηκαν με bead vortex, σε όλα τα υποστρώματα, οι πληθυσμοί κινήθηκαν μεταξύ των 4 και 5 log CFU/ml, εκτός από μία περίπτωση σχηματισμού σε Φέτα που μετρήθηκαν 3,4 log CFU/ml. Τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, στις οποίες οι πληθυσμοί των προσκολλημένων κυττάρων της *L. monocytogenes* που αναμένονται σε επιφάνειες ΑΧ παρουσία τροφίμων στους 20 °C κυμαίνεται μεταξύ των 3,5 και 5,5 log CFU/cm² (Poimenidou et al., 2009). Τέλος, η υγρασία στα τυριά μετρήθηκε στο 55,7±0,9% για την Φέτα και στο 35,8±1,5% για την Γραβιέρα, τα οποία βρίσκονται σε συμφωνία με την νομοθεσία.

Πίνακας 6.1. Πληθυσμοί των πλαγκτονικών ή αποκολλημένων κυττάρων της *L. monocytogenes* (μέσες τιμές log CFU/ml ή g ή cm² ± τυπική απόκλιση) μετά από παραμονή για 4 ημέρες στους 20°C σε (TSBYE, MRD, γάλα, Φέτα, Γραβιέρα, ΟΑ: Οξεοανθεκτικά, ΝΑ: μη οξεοανθεκτικά) παρουσία επιφανειών ανοξειδωτου χάλυβα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σαν εμβόλια στις τυροκομήσεις Φέτας και Γραβιέρας.

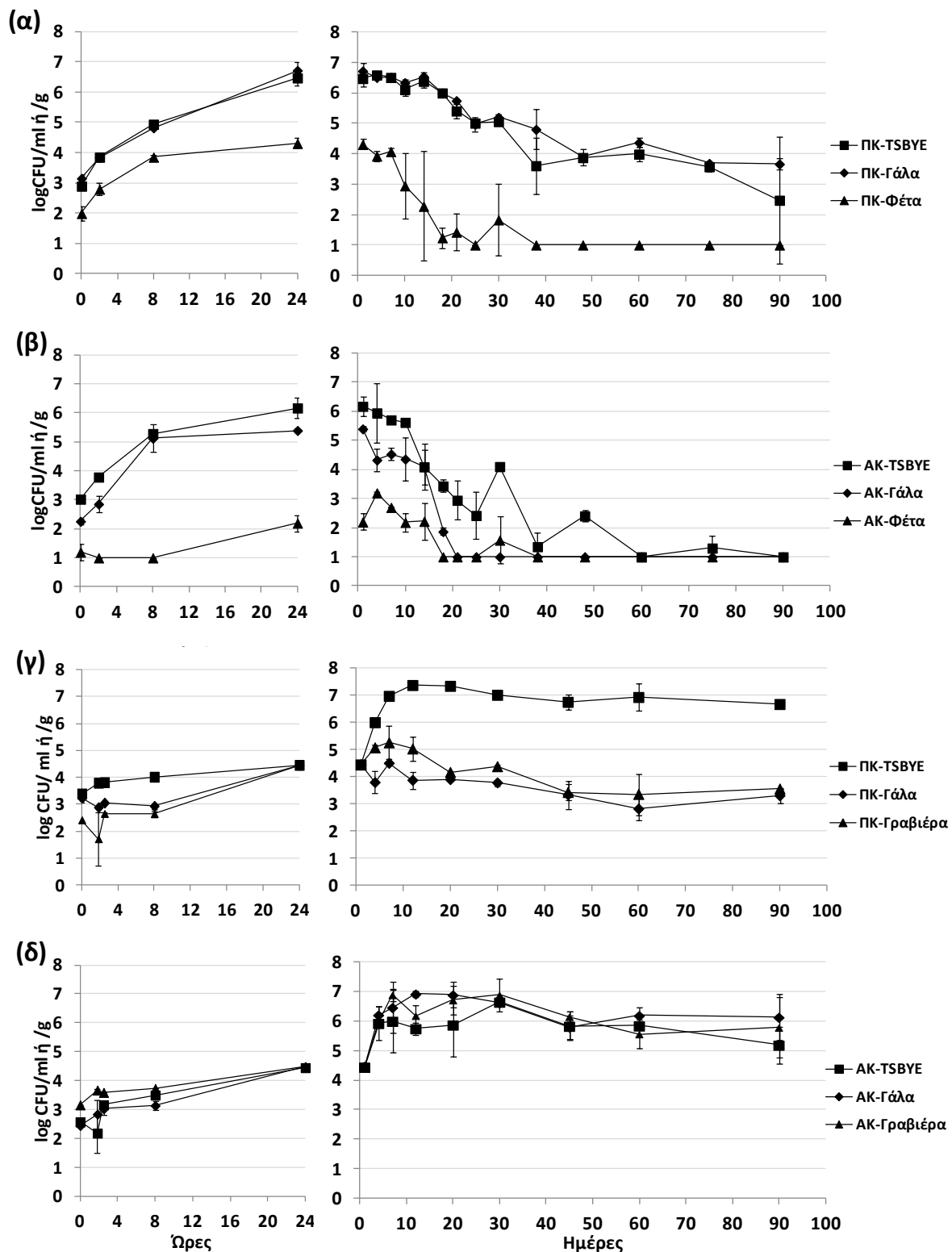
	Φέτα		Γραβιέρα	
	Πλαγκτονικά	Βιοϋμένια	Πλαγκτονικά	Βιοϋμένια
TSBYE	8,8 ± 0,1	5,1 ± 0,1	8,8 ± 0,1	4,9 ± 0,1
MRD	9,6 ± 0,7	4,1 ± 0,7	6,7 ± 0,1	4,7 ± 0,1
Γάλα	7,7 ± 0,2	4,5 ± 0,1	6,9 ± 0,1	5,1 ± 0,1
Γραβιέρα	6,4 ± 0,1	3,7 ± 1,1	6,4 ± 0,1	5,1 ± 0,1
Φέτα	5,9 ± 0,1	3,8 ± 0,1	5,9 ± 0,1	3,4 ± 0,0
ΟΑ	8,9 ± 0,1	- ^α	8,7 ± 0,1	-
ΝΑ	8,9 ± 0,1	-	8,9 ± 0,1	-

α: Δεν μελετήθηκαν βιοϋμένια των οξεοανθεκτικών και μη κυττάρων της *L. monocytogenes*

6.3.2. Συμπεριφορά της *L. monocytogenes* μετά τον ενοφθαλμισμό του στο στάδιο μετά την παστερίωση του γάλακτος κατά την τυροκόμηση δειγμάτων Φέτας και Γραβιέρας

Στην τεχνολογία παραγωγής τυροκομικών προϊόντων η επιτυχία του σταδίου της παστερίωσης καθορίζει τόσο την ποιότητα, όσο και την ασφάλεια των τελικών τροφίμων. Αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα κρίσιμα σημεία ελέγχου της διαδικασίας, λόγω της ικανότητάς της να θανατώσει σχεδόν το σύνολο των βακτηρίων σε βλαστική μορφή, των ψυχρότροφων μικροοργανισμών, καθώς και των ζυμών και των μυκήτων που υπάρχουν στο νωπό γάλα (Μανγορούλος και Αρνανιτογιάννης, 1999). Η ύπαρξη της *L. monocytogenes* σε παστεριωμένο γάλα, ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα μιας μη αποτελεσματικής διαδικασίας παστερίωσης, λόγω της ύπαρξης βιοϋμενίων, υπολειμμάτων τροφίμων και αλάτων στα τοιχώματα των σωληνώσεων και των παστεριωτήρων (fouling), ή επιμόλυνση από το περιβάλλον, τις επιφάνειες ή το προσωπικό (Μανγορούλος και Αρνανιτογιάννης, 1999). Στις πρώτες 24 ώρες της τυροκόμησης τα τυριά παραμένουν σε συνθήκες ικανές να υποστηρίξουν την ανάπτυξη ή να παρατείνουν την επιβίωση της *L. monocytogenes*, ανάλογα με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους. Στο διάστημα αυτό η συμπεριφορά του παθογόνου εξαρτάται από το στάδιο επιμόλυνσης του τροφίμου, την τεχνολογία του τροφίμου και την σταδιακή ανάπτυξη (ή μη) της ανθεκτικότητάς του έναντι της συνεχώς αυξανόμενης οξύτητας και της αλατότητας των προϊόντων. Στη συνέχεια, κατά την ωρίμανσή τους τα τυριά λαμβάνουν σταδιακά τις τελικές τους φυσικοχημικές ιδιότητες που τα καθιστούν ασφαλή. Η χαμηλή υγρασία για τη Γραβιέρα και η υψηλή οξύτητα για τη Φέτα, αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες για το παθογόνο και σε συνδυασμό με την χαμηλή θερμοκρασία ωρίμανσης συμβάλουν στην απενεργοποίησή του στα τρόφιμα. Για τη διερεύνηση του φαινομένου, πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός κατά τη διάρκεια της τυροκόμησης δειγμάτων τυριών με κύτταρα του μικροοργανισμού που αναμένεται να απομονωθούν από ένα τυπικό τυροκομείο, προερχόμενα δηλαδή από γάλα και Φέτα ή Γραβιέρα αντίστοιχα (πλαγκτονικά και βιοϋμενία), όπως και από ένα εργαστηριακό υπόστρωμα, ώστε να καταστεί εφικτή η σύγκριση των αποτελεσμάτων με τη βιβλιογραφία.

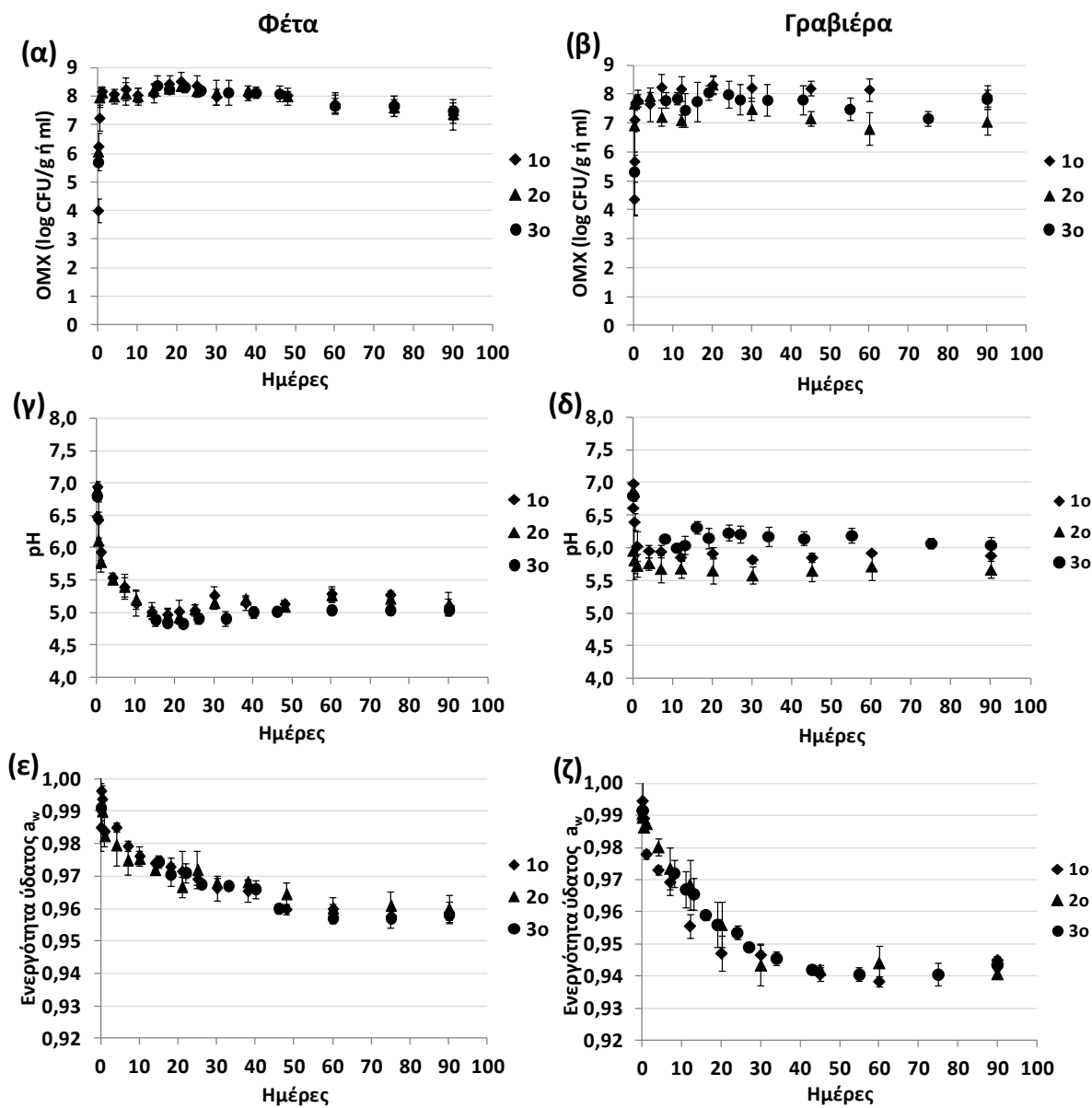
Στα δείγματα Φέτας παρατηρήθηκε ανάπτυξη του πληθυσμού των ΠΚ και των ΑΚ *L. monocytogenes* μετά από ενοφθαλμισμό σε γάλα, με ανώτερες τιμές τους 6.5 και 6 log CFU/g, αντίστοιχα (Σχ. 6.3). Εμφανείς διαφορές στην κινητική ανάπτυξης παρατηρήθηκαν μεταξύ των εμβολίων από διαφορετικά υποστρώματα με τα δύο ευνοϊκά (TSBYE και γάλα) να υπερिशύουν κατά τουλάχιστον 2,5 λογαρίθμους από τους τελικούς πληθυσμούς που έλαβαν τόσο τα ΠΚ (4,3 log CFU/g) όσο και τα ΑΚ (2,2 log CFU/g) που προέρχονταν από Φέτα (Σχ. 6.3 α, β). Όπως αναφέρθηκε στο Κεφ. 5 της παρούσας διατριβής, τα κύτταρα που προέρχονται από περιβάλλον με pH μη



Σχήμα 6.3. Συμπεριφορά της *L. monocytogenes* (log CFU/ml ή g) κατά την τυροκόμηση (αριστερά διαγράμματα) και την ωρίμαση (δεξιά διαγράμματα) δειγμάτων Φέτας (α, β) και Γραβιέρας (γ, δ), έπειτα από ενοφθαλμισμό στο παστεριωμένο γάλα με πλαγκτονικά (α, γ) και αποκολλημένα (β, δ, βιοϋμένια) κύτταρα της *L. monocytogenes*, προερχόμενα από TSBYE, γάλα, Φέτα ή Γραβιέρα. Το πρώτο σημείο (1^η ημέρα) κάθε καμπύλης στο διάγραμμα ωρίμασης συμπίπτει με το τελευταίο (24 ώρες) στο διάγραμμα τυροκόμησης.

ανάπτυξης (επιβίωσης), όπως είναι αυτό της Φέτας, αναμένεται να έχουν μεγαλύτερο έργο προσαρμογής στο νέο περιβάλλον και μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης, σε σχέση με κύτταρα που προέρχονται από περιβάλλοντα ανάπτυξης, ακόμα και στην περίπτωση που το νέο περιβάλλον χαρακτηρίζεται από άριστες φυσικοχημικές συνθήκες (γάλα, pH 6,8 και a_w 0,99). Ο παρατεταμένος χρόνος προσαρμογής και ο χαμηλός πληθυσμός των ΑΚ της Φέτας, υποδεικνύει την σημαντική φυσιολογική μεταβολή κατά την προσπάθειά τους να σχηματίσουν βιοϋμένια στο αφιλόξενο περιβάλλον της Φέτας. Η συγκεκριμένη συμπεριφορά, η οποία εμφανίζεται και στις υπόλοιπες περιπτώσεις ενοφθαλισμού που εξετάζονται τα αποκολλημένα κύτταρα της Φέτας (Σχ. 6.5. και 6.6.), πιθανώς να οφείλεται στην αδυναμία σχηματισμού ισχυρού βιοϋμενίου από το παθογόνο στο όξινο περιβάλλον της Φέτας, καθώς και στην αδυναμία των κυττάρων, λόγω της φυσιολογίας τους να αντιμετωπίσουν τις καταπονήσεις του καινούριου περιβάλλοντος (Adrião et al., 2008, Belessi et al., 2008).

Κατά την ωρίμαση των δειγμάτων Φέτας, τα οποία είχαν επιμολυνθεί με κύτταρα του *L.monocytogenes* πριν την προσθήκη της εναρκτήριας καλλιέργειας παρατηρήθηκε αρχικά επιβίωση των κυττάρων του παθογόνου μέχρι την 10^η ημέρα και στη συνέχεια σταδιακή μείωσή του σε επίπεδα σύμφωνα με τη νομοθεσία (<10² CFU/ml). Η αρχική επιβίωση του μικροοργανισμού οφείλεται στο ότι το pH των δειγμάτων μέχρι την 10^η ημέρα ωρίμασης βρίσκεται σε τιμές >5.2, η θερμοκρασία στους 18°C, ενώ η ενεργότητα ύδατος περί του 0,97 (Σχ. 6.4.). Από την 15^η ημέρα ωρίμασης το pH των δειγμάτων λαμβάνει τιμές <5.0, ενώ τα δείγματα μεταφέρονται σε αλατότητα 8% από 6% που βρίσκονταν κατά την πρώτη ωρίμαση, και η θερμοκρασία μειώνεται στους 4 °C. Σε αυτό το στάδιο το παθογόνο κλήθηκε να αντιμετωπίσει ένα σύνολο εμποδίων, έναντι των οποίων ανάλογα με την φυσιολογία του μειώθηκε ή θανατώθηκε. Τα πλαγκτονικά κύτταρα μειώθηκαν με μικρότερο ρυθμό απ' ότι τα βιοϋμενικά (ΑΚ), ενώ ιδιαίτερα τα ΠΚ που προέρχονταν από τα υποστρώματα TSBYE και γάλα διατήρησαν τον πληθυσμό τους σε επίπεδα ανώτερα (2,5 και 3,7 log CFU/g αντίστοιχα) του ορίου της νομοθεσίας μέχρι και την 90^η ημέρα ωρίμασης (Σχ. 6.3.). Αντίστοιχη επιβίωση παρατήρησαν οι Parageorgiou και Marth (1989) έπειτα από αρχική ανάπτυξη (6 log CFU/g) του στελέχους California κατά την τυροκόμηση και ωρίμαση Φέτας, ενώ το στέλεχος Scott A, που συμπεριλαμβάνεται στα στελέχη της παρούσας μελέτης, παρουσίασε μεγαλύτερη επιβίωση (4,5-5 log CFU/g στις 90 ημέρες). Αντίθετα, μεγαλύτερη μείωση του *L.monocytogenes* (5,5-7 λογαρίθμους) παρατήρησαν οι Ekremen (2000), μετά ενοφθαλισμό (10⁶⁻⁷ CFU/ ml) του σε παστεριωμένο γάλα κατά την τυροκόμηση και ωρίμαση 90 ημερών, ενός Τούρκικου λευκού τυριού άλμης. Τα παρασκευασμένα λευκά τυριά αν και είχαν παρόμοια μέση τιμή pH (4.77) με αυτή των δειγμάτων Φέτας και ωριμάσανε στους 4°C, συντηρήθηκαν σε άλμη υψηλότερης αλατότητας (αρχικά 15-20% και στη συνέχεια 9%), γεγονός που επηρέασε την κινητική θανάτωσής τους.



Σχήμα 6.4. Διαγράμματα της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX, log CFU/ml ή g, α, β), του pH (γ, δ) και της ενεργότητας ύδατος (a_w , ε, ζ) κατά την τυροκόμηση και την ωρίμαση δειγμάτων Φέτας (α, γ, ε) και Γραβιέρας (β, δ, ζ). Η κάθε καμπύλη αντιστοιχεί σε κάθε ένα στάδιο της τεχνολογίας παρασκευής των τυριών που επιλέχθηκε για τον ενοφθαλισμό της *L. monocytogenes* κατά την παραγωγική διαδικασία (1^ο, 2^ο, 3^ο στάδιο ενοφθαλισμού Σχ. 6.1).

Η επιμόλυνση με διαφορετικούς τύπους κυττάρων του *L.monocytogenes* σε παστεριωμένο γάλα που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δειγμάτων Γραβιέρας οδήγησε σε ανάπτυξη του μικροοργανισμού τόσο στα πλαγκτονικά όσο και στα βιοϋμένια (AK) με ανώτερους πληθυσμούς τους 6,5 και 7 log CFU/g για τα ΠΚ και τα AK αντίστοιχα (Σχ. 6.3.). Η αρχική ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά την πρώτη η μέρα της τυροκόμησης παρατηρήθηκε μειωμένη σε σχέση με την αντίστοιχη ανάπτυξη στη Φέτα. Ο πληθυσμός του παθογόνου αυξήθηκε κατά 1-1,5 log CFU/g (φτάνοντας τα 4,2 log CFU/g και στις δύο περιπτώσεις), ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών εμβολίων. Τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα των Samelis et al. (2009), οι οποίοι παρατήρησαν ανάπτυξη άνω των 1,5 log CFU/g, σε γάλα με προσθήκη καλλιέργειας, σε διάστημα 3 ημερών. Μέχρι τη δέκατη ημέρα ωρίμασης ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* ανήλθε στους 6-7 log CFU/g στα δείγματα που εμβολιάστηκαν με AK (Σχ. 6.3.δ), ενώ σημαντική ήταν διαφοροποίηση μεταξύ των εμβολίων στα ΠΚ, όπου παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα προερχόμενα από το TSBYE μετρήθηκαν σε υψηλότερους πληθυσμούς (7 log CFU/g), σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα από το γάλα και τη Γραβιέρα (4,5-5 log CFU/g, Σχ. 6.3.γ.). Η διαφορά μεταξύ των δύο τελευταίων εμβολίων με αυτό του TSBYE, θα μπορούσε να αποδοθεί στην προϋπαρξή τους σε γαλακτοκομικά προϊόντα με έντονη την παρουσία οξυγαλακτικών, μέρος των οποίων αναμένονταν να περάσει μέσω του εμβολίου στο γάλα της τυροκόμησης. Στην παρασκευή των τυριών ωστόσο, πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των περιπτώσεων σχεδόν ταυτόχρονη προσθήκη εναρκτήριας καλλιέργειας, σε πληθυσμούς τουλάχιστον ίσους με αυτούς των εμβολίων. Επιπλέον, οι διαφοροποιήσεις στο pH των τυριών που παρασκευάστηκαν ήταν μη σημαντικές (Σχ. 6.4), ενώ δεν παρατηρήθηκε η ίδια συμπεριφορά στην περίπτωση των εμβολίων αποκολλημένων κυττάρων, στα οποία αναμένονταν και κύτταρα από βιοϋμένια της ενδογενούς χλωρίδας των τροφίμων (Σχ. 6.3.δ). Συνοπτικά, σε περίπτωση που εμπλέκεται η ενδογενής χλωρίδα των τροφίμων για την διαφορετική συμπεριφορά των εμβολίων ΠΚ-Γάλα και ΠΚ-Γραβιέρα με αυτή των ΠΚ-TSBYE, αυτό δεν έγινε μέσω της περεταίρω μείωσης του pH, αλλά μέσω διαφορετικών αντιβακτηριακών παραγόντων, όπως είναι η παραγωγή βακτηριοσινών από οξυγαλακτικά βακτήρια διαφορετικά της εναρκτήριας καλλιέργειας (NSLAB, Elotmani et al., 2002, Samelis et al., 2009).

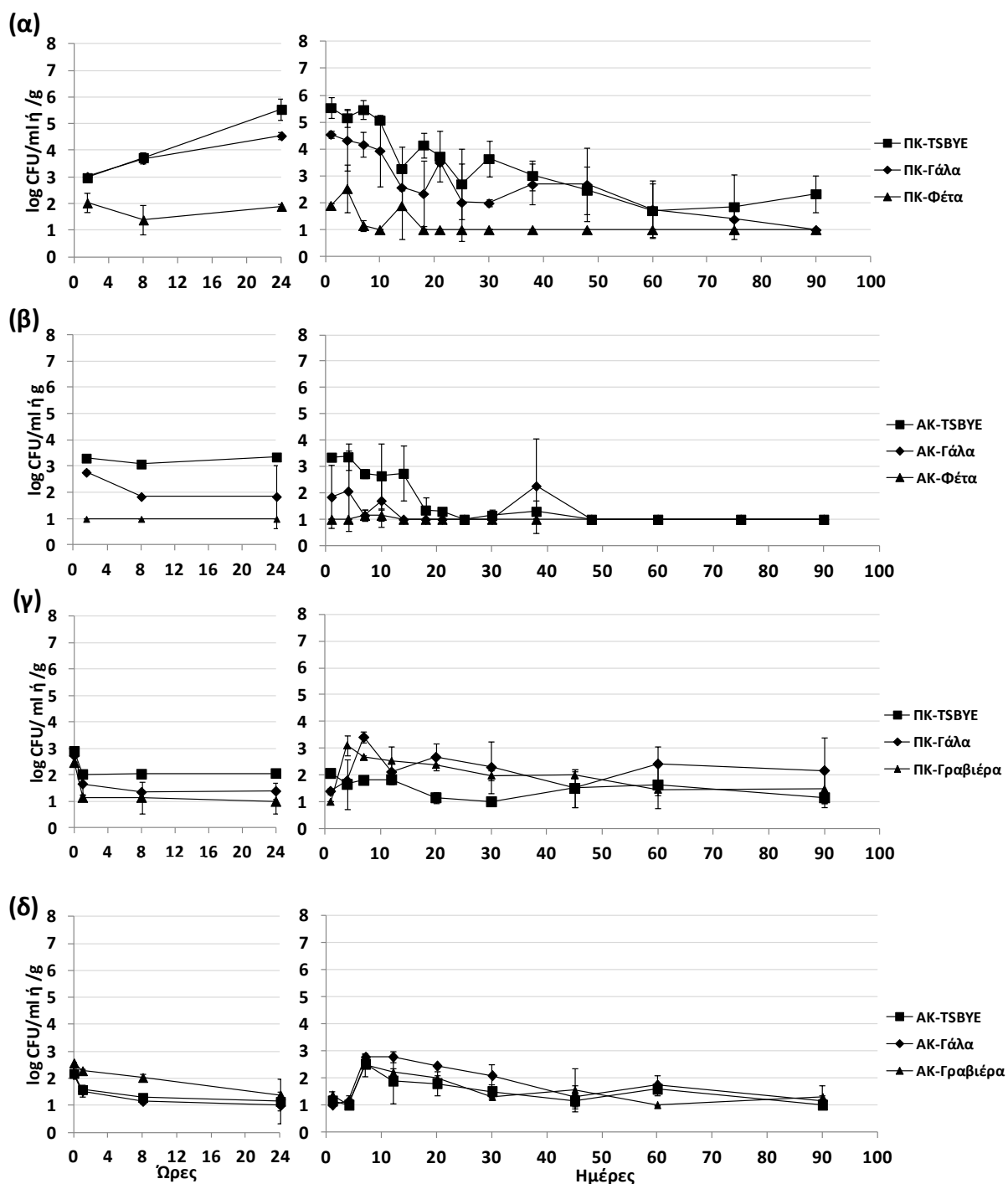
Στα αρχικά στάδια της τεχνολογίας της Γραβιέρας περιλαμβάνεται η αναθέρμανση του πήγματος με σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό του από τον ορό. Κατά την διαδικασία της αναθέρμανσης λαμβάνει χώρα αδρανοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, με συνέπεια να διακόπτεται η μείωση του pH του τροφίμου. Στα δείγματα που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο, το pH μειώθηκε από την μέση τιμή 6,8 του νωπού γάλακτος σε 5,9-6,0 κατά την διάρκεια της πρώτης ημέρας τυροκόμησης, την οποία διατήρησε με μη σημαντικές αποκλίσεις μέχρι και την 90^η ημέρα ωρίμασης (Σχ. 6.4.). Η ενεργότητα ύδατος από την τιμή 0,99 στην τιμή 0,97 στις πρώτες 7

ημέρες ωρίμασης και σταδιακά στην τιμή 0,94, στην οποία παρέμειναν με διακυμάνσεις στη διάρκεια των 90 ημερών. Η μεταφορά των δειγμάτων Γραβιέρας σε θερμοκρασία ψύξης (4°C) από την έβδομη κιόλας ημέρα ωρίμασης, δεν είχε αρνητική επίδραση στον παθογόνο, οι πληθυσμοί του οποίου είτε διατηρήθηκαν στα επίπεδα της αρχικής ανάπτυξης ή μειώθηκαν κατά 1-1,5 λογαρίθμους CFU/g (Σχ. 6.3.γ και δ). Σε κάθε περίπτωση, οι τελικοί πληθυσμοί των 3,5 ή 7 log CFU/g για τα ΠΚ και των 5-6 log CFU/g για τα ΑΚ, βρέθηκαν σημαντικά υψηλότεροι από τα όρια της νομοθεσίας. Η αρχική ανάπτυξη του πληθυσμού του *L. monocytogenes* και η μετέπειτα επιβίωσή του σε υψηλές συγκεντρώσεις ή η μείωσή του σε πληθυσμούς πάνω από τα όρια της νομοθεσίας, ακόμα και για παρατεταμένες περιόδους ωρίμασης, έχει σημειωθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Ryser και Marth, 1987, Parageorgiou και Marth 1989, Gameiro et al., 2007). Από την αδυναμία ελέγχου του πληθυσμού του μικροοργανισμού μετά από μία επιμόλυνση στα πρώτα στάδια παραγωγής τυροκομικών προϊόντων, κρίνεται απαραίτητος τόσο ο συνεχής έλεγχος του νωπού γάλατος για την ύπαρξη του παθογόνου, όσο και ο ενδεδειγμένος καθαρισμός επιφανειών και εξοπλισμού και ο έλεγχος των διαδικασιών, για την αποτροπή μιας διασταυρούμενης επιμόλυνσης στο παστεριωμένο γάλα.

6.3.3. Συμπεριφορά της *L. monocytogenes* μετά από ενοφθαλμισμό στο στάδιο τεμαχισμού του τυροπήγματος κατά τη τυροκόμηση δειγμάτων Φέτας και Γραβιέρας.

Από τα σημαντικότερα κρίσιμα σημεία επιμόλυνσης με *L. monocytogenes* κατά την παραγωγή Φέτας και Γραβιέρας, είναι τα στάδια που ακολουθούν την παστερίωση του γάλακτος, όπως είναι η προσθήκη της πυτιάς, εναρκτήριας καλλιέργειας και αλάτων, καθώς και ο τεμαχισμός του τυροπήγματος για την εξαγωγή του ορού, κυρίως λόγω πλημμελούς υγιεινής του εξοπλισμού και του προσωπικού που εργάζονται σε αυτά (Manfroulos και Arvanitoyannis, 1999, 2000).

Στα δείγματα Φέτας που παρασκευάστηκαν μετά από τυροκόμηση με ενοφθαλμισμό της *L. monocytogenes* στο στάδιο τεμαχισμού του τυροπήγματος παρατηρήθηκε στα ΠΚ ανάπτυξη του πληθυσμού την οποία ακολούθησε η μείωσή του, ενώ τα αντίστοιχα ΑΚ επιβίωσαν στους αρχικούς πληθυσμούς για ένα διάστημα και στη συνέχεια μειώθηκαν κάτω από το όριο αρίθμησης (Σχ. 6.5.). Συγκεκριμένα, στα δείγματα των ΠΚ παρατηρήθηκε ανάπτυξη του πληθυσμού αντίστοιχη με το πρώτο στάδιο ενοφθαλμισμού, με χαμηλότερους ωστόσο τελικούς πληθυσμούς (5,5 και 4,5 log CFU/g για το TSBYE και το γάλα, αντίστοιχα, Σχ. 6.5.α). Ομοίως με το πρώτο στάδιο, τα κύτταρα επιβίωσαν στα επίπεδα αυτά για τις πρώτες 7 ημέρες της ωρίμασης και στη συνέχεια, λόγω της διαφοροποίησης των φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών (Σχ. 6.4.), μειώθηκαν σταδιακά σε πληθυσμούς κάτω από το όριο ανίχνευσης, με εξαίρεση τα ΠΚ- TSBYE, τα οποία παρέμειναν κοντά στο όριο της νομοθεσίας. Την αρχική επιβίωση (5 ημέρες) του παθογόνου τα δείγματα που



Σχήμα 6.5. Συμπεριφορά της *L. monocytogenes* (log CFU/ml ή g) κατά την τυροκόμηση (αριστερά διαγράμματα) και την ωρίμασή (δεξιά διαγράμματα) σε δειγμάτων Φέτας (**α**, **β**) και Γραβιέρας (**γ**, **δ**), έπειτα από ενοφθαλισμό κατά το κόψιμο του τυροπήγματος, με πλαγκτονικά (**α**, **γ**) και αποκολλημένα (**β**, **δ**, βιοϋμένια) κύτταρα *L. monocytogenes*, προερχόμενα από TSBYE, γάλα, και Φέτα ή Γραβιέρα. Το πρώτο σημείο (1^η ημέρα) κάθε καμπύλης στο διάγραμμα ωρίμασης συμπίπτει με το τελευταίο (24 ώρες) στο διάγραμμα τυροκόμησης.

εμβολιάστηκαν με τα ΑΚ, ακολούθησε η μείωση του πληθυσμού του, ενώ από την 18^η ημέρα ωρίμασης (3^η στους 4°C) τα κύτταρα βρέθηκαν σε επίπεδα χαμηλότερα της νομοθεσίας (Σχ. 6.5.β.). Τα διαφορετικά επίπεδα ενοφθαλμισμού οφείλονται στη μειωμένη ποσότητα βιοϋμενίου που σχηματίστηκε στο περιβάλλον της Φέτας, γεγονός που επηρέασε και την μετέπειτα συμπεριφορά των συγκεκριμένων κυττάρων κατά την διάρκεια της τυροκόμησης και ωρίμασης και τα διαφοροποίησε από τα αντίστοιχα ΑΚ που προέρχονταν από το TSBYE και το γάλα (Σχ. 6.5.β.).

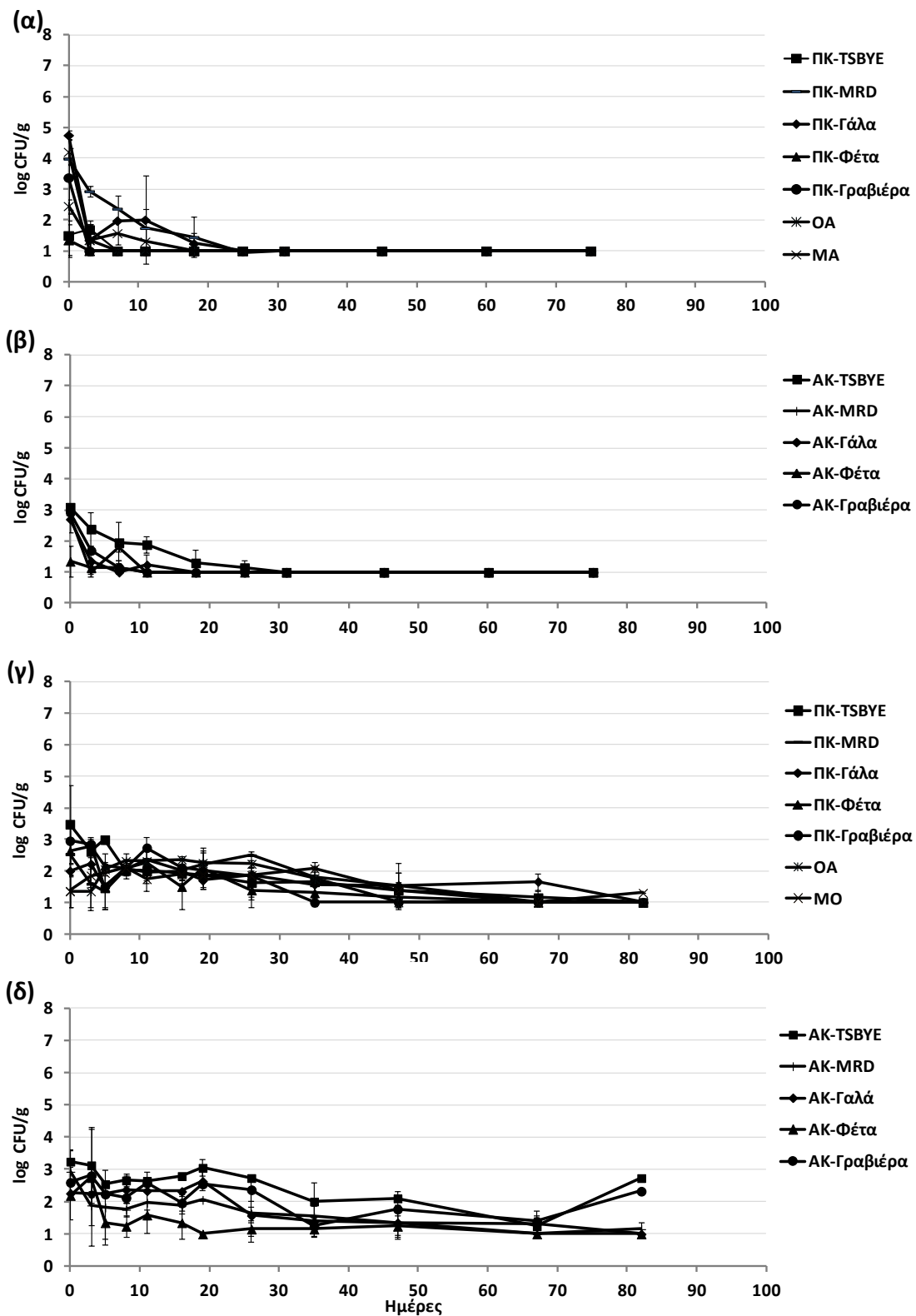
Στα δείγματα Γραβιέρας παρατηρήθηκε ομοιόμορφη συμπεριφορά των κυττάρων του μικροοργανισμού, όταν αυτός εμβολιάστηκε στο δεύτερο στάδιο ενοφθαλμισμού (Σχ. 6.4. γ και δ). Αρχικά τα κύτταρα επιβίωσαν στο αρχικό επίπεδο ενοφθαλμισμού, ακολούθησε μια οριακή ανάπτυξη της τάξης των 1-1,5 log CFU/g μέχρι την 7^η ημέρα ωρίμασης, και μετά την μεταφορά τους στους 4°C, οι πληθυσμοί μειώθηκαν σταδιακά σε <10² CFU/g, ενώ ο τελικός πληθυσμός των ΑΚ βρέθηκε <10 CFU/g. Σύμφωνα με τους Ryser και Marth (1987), όταν ο παθογόνος εμβολιαστεί στο γάλα μετά την παστερίωσή του αναμένεται να έχει μια φάση προσαρμογής μέχρι τουλάχιστον την ώρα της αναθέρμανσης, ενώ στη συνέχεια δεν αναμένεται να αυξηθεί λόγω της μείωσης του pH. Η διαφορετική συμπεριφορά της *L. monocytogenes* μεταξύ των δύο σταδίων επιμόλυνσης μπορεί να οφείλεται στο ότι τα κύτταρα που εμβολιάστηκαν στο παστεριωμένο γάλα παρέμειναν σε ιδανική για την αύξησή του παθογόνου θερμοκρασία για 2 περίπου ώρες πριν το στάδιο της αναθέρμανσης, σε αντίθεση με αυτά που εμβολιάστηκαν κατά τον τεμαχισμό του τυροπήγματος και είχαν στην διάθεσή τους περίπου 20 λεπτά για να προσαρμοστούν κι ενδεχομένως να αυξηθούν. Επιπλέον, παρατηρήθηκε διαφορά στην τιμή του pH στην αναθέρμανση πήγματος (1^ο στ-pH:6.8, 2^ο στ-pH:6.0), η οποία ενδεχομένως να οφείλεται στον ανταγωνισμό μεταξύ της *L. monocytogenes* και της οξυγαλακτικής καλλιέργειας, έπειτα από τον σχεδόν ταυτόχρονο ενοφθαλμισμό τους στο παστεριωμένο γάλα. Εντούτοις, η διαφορά αυτή στο pH αν κι ενδέχεται να αυξήσει την φάση προσαρμογής και να μειώσει τον ρυθμό ανάπτυξης (Κεφ. 5), σε καμία περίπτωση δεν αναμένεται να ανακόψει την ανάπτυξη του παθογόνου.

6.3.4. Επιβίωση της *L. monocytogenes* έπειτα από επιμόλυνση στην αρχή της δεύτερης ωρίμασης δειγμάτων Φέτας και Γραβιέρας.

Το πλέον συνηθισμένο στάδιο της παρασκευής ενός τυριού που αναμένεται επιμόλυνσή του από την *L. monocytogenes* είναι η περίοδος της αποθήκευσης για την ολοκλήρωση της ωρίμασης και την πλήρη ανάπτυξη των οργανοληπτικών και φυσικοχημικών του χαρακτηριστικών. Κατά την ωρίμασή τους τα τυριά αποθηκεύονται σε ειδικά αεριζόμενα ψυγεία-θαλάμους (αρχικά στους 16-22 °C και στη συνέχεια στους 4°C), είτε πάνω σε ξύλινα ή μεταλλικά ράφια ή μέσα σε ξύλινα βαρέλια ή μεταλλικά δοχεία, το σύνολο των οποίων μπορεί να αποτελέσει εστία επιμόλυνσης (Jacquet et al.,

1993, Ribeiro et al., 2006). Ταυτόχρονα με τα τυριά προς ωρίμαση, ανάλογα και με το μέγεθος της επιχείρησης, στους θαλάμους ενδέχεται να υπάρχουν παγολεκάνες νωπού γάλακτος, δοχεία με παραπροϊόντα (ορός γάλακτος για παρασκευή μαλακών τυριών), συσκευασίες ή δοχεία με τελικά προϊόντα, καθώς και η επαφή των τυριών με το προσωπικό (αλάτισμα, πλύσιμο, απόξεση κ.α.), αυξάνουν την πιθανότητα μιας διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Το στάδιο της ωρίμασης υπό ψύξη αποτελεί κρίσιμο σημείο ελέγχου κατά την παρασκευή τυροκομικών προϊόντων (Μανγορούλιος και Αρνανιτογιάννης, 1999, Αρνανιτογιάννης και Μανγορούλιος, 1999, Silva et al., 2003), επειδή οι συνθήκες που επικρατούν είναι ικανές να αποτρέψουν την επιβίωση των περισσότερων παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Εντούτοις, το ψυχρότροφο παθογόνο *L. monocytogenes*, έχει την ικανότητα να επιβιώνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε θερμοκρασίες <math>< 7^{\circ}\text{C}</math>, αυξάνοντας την πιθανότητα εμφάνισής του στο τελικό προϊόν, που θα φτάσει στο τραπέζι του καταναλωτή και επομένως την επικινδυνότητα του τροφίμου. Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της διαφορετικής φυσιολογίας (προϊστορίας) των κυττάρων του παθογόνου στην ικανότητά του να επιβιώνει σε χαμηλές θερμοκρασίες, σε συνάρτηση με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δύο τυροκομικών προϊόντων, όπως έχουν διαμορφωθεί κατά την διάρκεια της πρώτης ωρίμασης.

Στα δείγματα Φέτας, τα οποία εμβολιάστηκαν στο τέλος της πρώτης ωρίμασης (15^η ημέρα), με τα παρασκευασμένα εμβόλια *L. monocytogenes*, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση (>2 log CFU/g) του πληθυσμού τόσο των ΠΚ, όσο και των ΑΚ *L. monocytogenes* σε όλα τα είδη εμβολίων από την 3^η ημέρα, ενώ από την 7^η ημέρα συντήρησης στα περισσότερα εμβόλια, ο πληθυσμός των κυττάρων ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (Σχ. 6.6. α, β). Πιο ανθεκτικά εμβόλια εμφανίστηκαν τα ΠΚ από το γάλα, τα βιοϋμένια από το TSBYE και τα ΠΚ από το MRD. Τα δύο πρώτα εμβόλια ήταν κάτω από το όριο αρίθμησης μετά την 11^η ημέρα, ενώ το τρίτο μετά τη 18^η ημέρα. Στο ίδιο χρονικό διάστημα (18 ημέρες), οι Kagli et al. (2009) μέτρησαν 4 λογαρίθμους μείωση του πληθυσμού μίγματος στελεχών *L. monocytogenes* σε Κατίκι Δομοκού (pH=4,5-4,6), ενώ σε σχέση με την θερμοκρασία, για τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία (5°C) συμπεράναν ότι η διαφορά μεταξύ των στελεχών ήταν μη σημαντικές (Kagli et al., 2009). Αντίθετα, αδύναμα αποδείχτηκαν τα ΠΚ από την Γραβιέρα, όπως και τα ΠΚ και ΑΚ από τη Φέτα, τα οποία βρέθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης από την 3^η κιόλας ημέρα της δεύτερης ωρίμασης. Τα κύτταρα του *L. monocytogenes* που ήταν προσαρμοσμένα στις όξινες συνθήκες (OA), παρουσίασαν μικρή διαφορά σε σχέση με τα κύτταρα που δεν ήταν προσαρμοσμένα (MO) και ακολούθησαν την φθίνουσα πορεία των υπόλοιπων ΠΚ (Σχ. 6.6.α, β). Συνολικά στα δείγματα Φέτας, το χαμηλό pH (4.9 Σχ. 6.4.) του τροφίμου από την 10^η ημέρα ωρίμασης σε συνδυασμό με την χαμηλή θερμοκρασία (4°C) αποδείχτηκαν κυρίαρχοι παράγοντες, επιφέροντας τη γρήγορη θανάτωση του παθογόνου ανεξαρτήτως φυσιολογίας.



Σχήμα 6.6. Συμπεριφορά της *L. monocytogenes* (log CFU/ g) κατά την δεύτερη ωρίμανσή (4°C) σε δείγματα Φέτας (**α, β**) και Γραβιέρας (**γ, δ**), έπειτα από ενοφθαλισμό τους με πλαγκτονικά (ΠΚ, **α, γ**) και αποκολλημένα κύτταρα (ΑΚ, **β, δ**) *L. monocytogenes*, προερχόμενα από διαφορετικά υποστρώματα (TSBYE, MRD, γάλα, Φέτα, Γραβιέρα, ΟΑ: προσαρμ. σε όξινες συνθήκες, ΜΟ: μη προσαρμ. σε όξινες συνθήκες).

Στα δείγματα Γραβιέρας, που εμβολιάστηκαν στο τέλος της πρώτης ωρίμασης (7^η ημέρα) με τα κύτταρα της *L. monocytogenes*, που προϋπήρχαν σε TSBYE, TSBYE-G, TSBYE+G, MRD, γάλα, Φέτα και Γραβιέρα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση (>1 log CFU/g) του πληθυσμού των ΠΚ σε όλα τα είδη εμβολίων από την 3^η ημέρα αποθήκευσης (Σχ. 6.6.γ). Η αντίστοιχη μείωση των ΑΚ (βιοϋμένια) παρατηρήθηκε την 5^η ημέρα (Σχ. 6.6.δ). Πιο ανθεκτικά εμβόλια αποδείχτηκαν τα ΑΚ από τη Γραβιέρα (μείωση 0,5 log CFU /g) και το TSBYE (μείωση 0,9 log CFU /g), ενώ πιο αδύναμα τα ΑΚ από τη Φέτα, τα οποία μειώθηκαν κατά 3 log CFU /g στις πρώτες οχτώ ημέρες της ωρίμασης στους 4°C. Αντίστοιχα με τα δείγματα Φέτας, στα δείγματα Γραβιέρας, τα προσαρμοσμένα ή μη στην οξύτητα κύτταρα *L. monocytogenes* ακολούθησαν την πορεία των υπόλοιπων εμβολίων, χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (Σχ. 6.6.γ). Όλα τα εμβόλια, πλην των ΑΚ κυττάρων της Γραβιέρας και του TSBYE, βρέθηκαν στο τέλος της ωρίμασης κάτω από το όριο της αρίθμησης (1 log CFU/g, Σχ. 6.6.γ και δ). Οι Samelis et al. (2009) παρατήρησαν μικρότερη μείωση του *Listeria innocua* (1.1 log CFU/g) κατά την 60^η ημέρα ωρίμασης Γραβιέρας, με υψηλότερο ωστόσο τελικό πληθυσμό επιβίωσης (1.48±0.31 log CFU/g). Συνολικά στα δείγματα Γραβιέρας, τα σχετικά ευνοϊκά για τον παθογόνο φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (a_w :0.94, pH:5.8), επέτρεψαν τη βραδύτερη μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* και τον διαχωρισμό ορισμένων από τα εμβόλια σε ανθεκτικότερα ή μη.

6.3.5. Συγκριτική θεώρηση της επίδρασης του σταδίου επιμόλυνσης και της φυσιολογίας των κυττάρων του παθογόνου *L. monocytogenes* στην συμπεριφορά του κατά την τυροκόμηση και ωρίμαση Φέτας και Γραβιέρας

Τα κύρια κρίσιμα σημεία ελέγχου στη τεχνολογία της Φέτας και της Γραβιέρας αρχίζουν στη μονάδα του γαλακτοπαραγωγού – συλλογή, συντήρηση (ψύξη) και μεταφορά, συνεχίζουν με την παραλαβή του νωπού γάλακτος, το φιλτράρισμα, την συντήρηση σε σιλό (ψύξη), την παστερίωση και την μετέπειτα αυτής ψύξη, την προσθήκη εναρκτηρίας καλλιέργειας και πυτιάς, το ξηρό αλάτισμα, την πίεση στην Γραβιέρα, την ωρίμαση, τη συσκευασία και την αποθήκευση υπό ψύξη (Mauropoulos and Arvanitogiannis, 1999, Arvanitogiannis and Mauropoulos, 2000, EL-Hofi et al., 2008). Από αυτά ξεχωρίζει αρχικά το στάδιο της παστερίωσης, καθώς επιβίωση των μικροοργανισμών μπορεί να υπάρξει, ύστερα από ελλιπή παστερίωση, λόγω υπερβολικής ποσότητας γάλακτος στον παστεριωτήρα, κακής ανάδευσης, ύπαρξης βιοϋμενίου το οποίο εμποδίζει τη μεταφορά της θερμότητας, ενώ και μετά την παστερίωση, η επιμόλυνση αποτελεί πιθανό ενδεχόμενο από σωλήνες ή σκεύη (Kells et al., 2003). Στην περίπτωση αυτή, το μη ανταγωνιστικό παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes* βρίσκει εύφορο έδαφος να πολλαπλασιαστεί εξαιτίας του ευνοϊκού περιβάλλοντος και της απουσίας ανταγωνιστικής χλωρίδας. Στη συνέχεια, κατά το στάδιο της πήξης, επιμόλυνση μπορεί να υπάρξει είτε από τα χέρια και τις ποδιές των

εργαζομένων (Kells et al., 2003), ή από τον εξοπλισμό (μαχαίρια, κόφτες). Μια επιμόλυνση στο στάδιο αυτό, ενδέχεται να οδηγήσει σε επιβίωση ή ανάπτυξη του παθογόνου, δεδομένου ότι τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τυριών βρίσκονται ακόμα μέσα στα επιτρεπτά όρια για την ανάπτυξη ή επιβίωση του παθογόνου. Τέλος, κατά την μεταφορά των προϊόντων τον χώρο της ωρίμασης, ενδέχεται να υπάρξει διασταυρούμενη επιμόλυνση του ενδιάμεσου προϊόντος στα ράφια (Γραβιέρα) λόγω πλημμελούς εξυγίανσης ή φυσιολογίας (ξύλινα), όπως και στα δοχεία (Φέτα) για τους ίδιους λόγους (Guillier et al., 2008). Στο τελευταίο στάδιο αναμένεται παρατεταμένη επιβίωση ή θανάτωση της *L. monocytogenes*, ανάλογα με τα τελικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τροφίμου, το αρχικό επίπεδο επιμόλυνσης, τη φυσιολογία του παθογόνου, καθώς και την τήρηση των απαιτούμενων συνθηκών αποθήκευσης.

Το στάδιο ενοφθαλμισμού των στελεχών *L. monocytogenes* κατά την διαδικασία παρασκευής των δύο τυριών αποτέλεσε τον πλέον καθοριστικό παράγοντα, οποίος σε συνδυασμό με την τεχνολογία καθόρισαν την συμπεριφορά του μικροοργανισμού. Κατά το πρώτο στάδιο ενοφθαλμισμού στο γάλα παρατηρήθηκε σημαντική ανάπτυξη σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις των εμβολίων στην Φέτα. Αντίθετα, στο δεύτερο στάδιο ενοφθαλμισμού παρατηρήθηκε διακύμανση στην συμπεριφορά του παθογόνου, ανάλογη την προέλευση του εμβολίου. Μεγαλύτερη ανάπτυξη παρατηρήθηκε στα εμβόλια που προέρχονταν από ευνοϊκά υποστρώματα, ενώ τα πλαγκτονικά μειώθηκαν με πιο αργούς ρυθμούς από τα βιοϋμενικά, κατά τη διάρκεια των 90 ημερών ωρίμασης. Συγκεκριμένα, τα πλαγκτονικά κύτταρα του TSBYE που εμβολιάστηκαν και στα δύο πρώτα στάδια, μετρήθηκαν > 100 CFU/g την 90^η ημέρα αποθήκευσης. Τα βιοϋμενικά κύτταρα τα οποία εμβολιάστηκαν στη Φέτα, ασχέτως με το στάδιο ενοφθαλμισμού, μειώθηκαν στα αποδεκτά όρια της νομοθεσίας, από τις πρώτες κιόλας ημέρες της τυροκόμησης. Σύμφωνα με τους Parageorgiou και Marth (1989), η αρχική ανάπτυξη που παρατηρήθηκε στη Φέτα οφείλεται στις ανεπαρκώς ανασταλτικές συνθήκες που επικρατούν κατά τις πρώτες μέρες της ωρίμασης του τροφίμου. Εντούτοις, δεν σημείωσαν διαφορές στην ανάπτυξη μεταξύ των δύο στελεχών που μελέτησαν, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, στην οποία η κινητική (αρχικά ανάπτυξης και στη συνέχεια μείωσης) του πληθυσμού του *L. monocytogenes* φάνηκε να επηρεάζεται άμεσα από την προϊστορία των κυττάρων του.

Η επίδραση του σταδίου ενοφθαλμισμού στην Γραβιέρα ήταν περισσότερο εμφανής, λόγω του συνδυασμού της με την αναθέρμανση του πηγμάτος, όπως προβλέπεται από την παραγωγική διαδικασία. Η μειωμένη συγκριτικά με την Φέτα ανάπτυξη στην Γραβιέρα, στο πρώτο στάδιο ενοφθαλμισμού, κατά την ημέρα της τυροκόμησης θα μπορούσε να αποδοθεί και στην συμπύκνωση του τροφίμου κατά το $\frac{1}{4}$ περίπου, με δεδομένο ότι το παθογόνο εμβολιάστηκε σε 2 λίτρα γάλακτος από το οποίο παρασκευάστηκαν περίπου 500g τυρί (3κεφάλια x175g, Schwartzman

et al., 2011). Ωστόσο, κατά την διάρκεια της πρώτης ωρίμασης το παθογόνο αυξήθηκε σε πληθυσμούς αντίστοιχους με την Φέτα. Κατά τον ενοφθαλμισμό στο γάλα, παρατηρήθηκε ανάπτυξη σχεδόν του συνόλου των εμβολίων, οι πληθυσμοί των οποίων διατηρήθηκαν στα ίδια περίπου επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμασης, ξεπερνώντας κατά πολύ αποδεκτά όρια της νομοθεσίας για την *L. monocytogenes*. Αντιθέτως, κατά τον ενοφθαλμισμό στο τυρόπηγμα, μετά την οριακή αρχική ανάπτυξη που πραγματοποιήθηκε στις επτά πρώτες μέρες ωρίμασης, παρατηρήθηκε μείωση των εμβολίων και επιβίωση σε χαμηλά επίπεδα κάτω από το όριο της νομοθεσίας.

Κατά τον ενοφθαλμισμό μετά το πέρας της πρώτης και πριν την έναρξη της δεύτερης ωρίμασης παρατηρήθηκε μείωση στα αποδεκτά επίπεδα τόσο στη Φέτα όσο και στη Γραβιέρα, από τις πρώτες ημέρες της ωρίμασης. Στα δείγματα της Φέτας η μείωση ήταν γρηγορότερη, ενώ η προέλευση των εμβολίων στη συγκεκριμένη περίπτωση δε φάνηκε να παίζει σημαντικό ρόλο. Μία από τις πιθανές αιτίες της απότομης μείωσης και κατά περιπτώσεις θανάτωσης των εμβολίων κατά τον ενοφθαλμισμό τους στο τρίτο στάδιο, σε αντίθεση με την συμπεριφορά του παθογόνου έπειτα από τα δύο πρώτα στάδια ενοφθαλμισμού, στα οποία παρατηρήθηκε παρατεταμένη επιβίωση, ενδέχεται να είναι το διαφορετικό περιβάλλον που αντιμετωπίζει το παθογόνο στην επιφάνεια και το εσωτερικό των κεφαλιών των τυριών (Morgan et al., 2001, Schwartzman et al., 2011). Ανάλογα με την τεχνολογία παρασκευής και την ενδογενή ή αλλοιογόνο χλωρίδα των τυριών, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ή τον ανταγωνισμό που θα συναντήσει η *L. monocytogenes* στην επιφάνεια ενός κεφαλιού ενδέχεται να δημιουργεί ένα περισσότερο ευνοϊκό (ή αφιλόξενο) περιβάλλον σε σχέση με το εσωτερικό του τυριού (core). Οι Giannou et al. (2009) έδειξαν την μείωση της *L. monocytogenes* μετά από επιφανειακή επιμόλυνση πλήρως ωριμασμένων κεφαλιών Γραβιέρας, η οποία ήταν ανεξάρτητη της συσκευασίας. Εντούτοις, η ίδια ομάδα στην συνέχεια εξέτασε την περίπτωση επιμόλυνσης των τυριών από τα πρώτα στάδια της τυροκόμησης, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τον καταμερισμό και την ενσωμάτωση των κυττάρων του παθογόνου σε όλη τη μάζα του τυριού και κατέληξε σε αντίστοιχες μειώσεις κατά την διάρκεια των 90 ημερών ωρίμασης (Samelis et al., 2009).

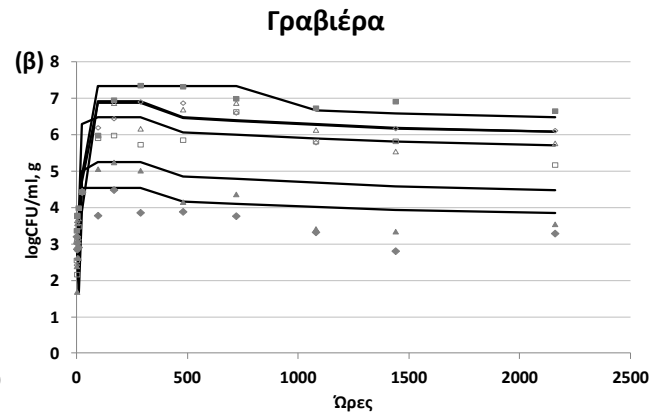
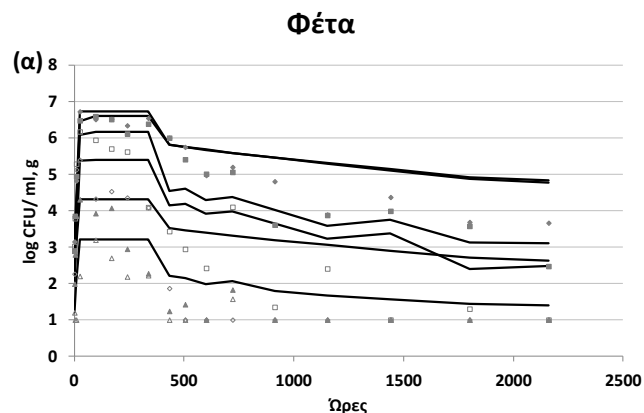
Η μοντελοποίηση των αποτελεσμάτων της μελέτης έγινε με την χρήση ενός δυναμικού ενοποιημένου (integrated) μοντέλου, από το πρόγραμμα GroPIN (Psomas και Skandamis, 2013, <http://www.aua.gr/psomas/gropin/>), το οποίο αρχικά εξέτασε την πιθανότητα ανάπτυξης της *L. monocytogenes* με βάση τις πειραματικές συνθήκες (T , pH , a_w) και στη συνέχεια χρησιμοποίησε μοντέλα ανάπτυξης ή θανάτωσης για να περιγράψει την συμπεριφορά του. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν περιέγραψαν ικανοποιητικά τόσο την πιθανότητα ανάπτυξης του μικροοργανισμού, ανάλογα με τις συνθήκες, όσο και την κινητική ανάπτυξης στις περιπτώσεις που την επέτρεψαν (Σχ. 6.7). Εντούτοις, παρατηρήθηκε απόκλιση μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και των καμπύλων κατά τη θανάτωση του παθογόνου, η οποία μπορεί να αποδοθεί στο ότι το

μοντέλο θανάτωσης που χρησιμοποιήθηκε, είχε αναπτυχθεί από δεδομένα σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (BHIB, Buchanan et al., 1997), σε αντίθεση με το μοντέλο ανάπτυξης που είχε βασιστεί σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Gamma concept model, Mejlholm et al., 2010). Για ακόμα μια φορά μέσα στη διατριβή γίνεται φανερό, ότι τα μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί από δεδομένα υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων, αδυνατούν να συμπεριλάβουν την πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων της *L. monocytogenes* με την ενδογενή χλωρίδα των τυριών και τα προϊόντα της και υπερεκτιμούν την ικανότητα επιβίωσής του στα τρόφιμα (Xanthiakos et al., 2006, Schwartzman et al., 2010, 2011, Ferrier et al., 2013).

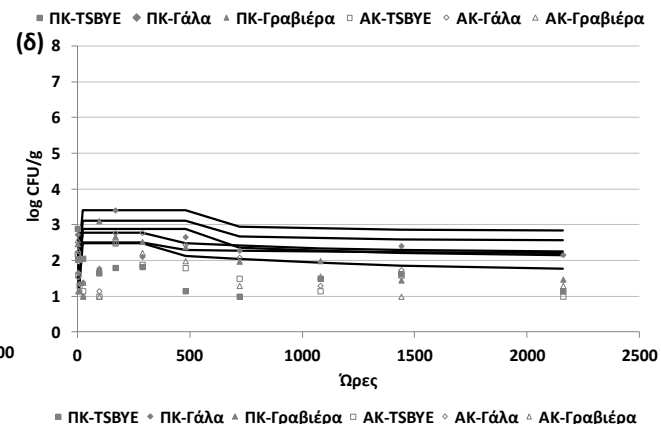
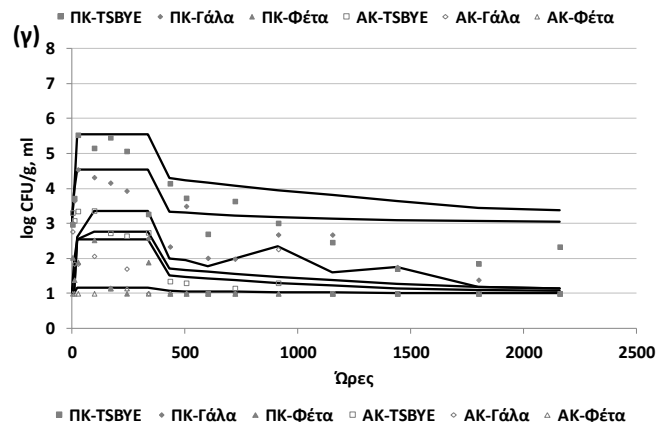
Η ύπαρξη του παθογόνου από τα πρώτα κιόλας στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, εκτός από την καλύτερη διάχυσή του (στο γάλα) και στην συνέχεια την ενσωμάτωσή του στο πήγμα, βοηθά στην σταδιακή προσαρμογή του έναντι των καταπονήσεων. Η σταδιακή μείωση του pH από την τυροκόμηση και κατά τις πρώτες της ωρίμασης, καθώς και η σταδιακή προσθήκη αλατιού στα τυριά δίνει την δυνατότητα στη *L. monocytogenes* να αντιμετωπίσει ευκολότερα τις αλλαγές που πραγματοποιούνται στο περιβάλλον, επομένως έχει την δυνατότητα, ανάλογα με την φυσιολογία του, να αναπτύξει ανθεκτικότητα έναντι αυτών ή να θανατωθεί. Επιπλέον, η αύξηση της ανθεκτικότητας ενός μικροοργανισμού έναντι μιας καταπόνησης μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι άλλων καταπονήσεων (cross-tolerance, Faleiro et al. 2003). Συγκεκριμένα, οι Skandamis et al. (2009) έδειξαν ότι η παρατεταμένη έκθεση σε 3,5% NaCl για περίοδο 12 ωρών και στη συνέχεια έκθεση σε pH 5,04 δημιουργεί μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε κύτταρα της *L. monocytogenes* κατά την έκθεσή του σε υγρό θρεπτικό μέσο με pH 3,5 (όξινη καταπόνηση), εν συγκρίσει με την παρατεταμένη έκθεση σε μέσα μηδενικής αλατότητας, ενώ στην ίδια μελέτη τονίστηκε και η σημασία της διαδοχής των καταπονήσεων. Συνεισφορά στην αυξημένη ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού έναντι των μη ευνοϊκών pH και a_w των τυριών ενδέχεται να έχει και στάδιο της αναθέρμανσης, κατά το οποίο το παθογόνο εκτίθεται στην σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας στους 52°C. Οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται για την αντιμετώπιση της θερμοκρασιακής καταπόνησης (stress resistance mechanisms) συχνά κωδικοποιούν ειδικές πρωτεΐνες (HSPs), καθώς και τον γενικό μεταγραφικό παράγοντα σ^B , που βοηθούν και στην αντιμετώπιση της όξινης ή ωσμωτικής καταπόνησης (Lin και Chou, 2004, Gandhi και Chikindas, 2007, Sergelidis και Abraham, 2009).

Η αυξημένη παραλλακτικότητα των αρχικών εμβολίων στα ΠΚ που εμβολιάστηκαν κατά την δεύτερη ωρίμαση τόσο της Φέτας όσο και της Γραβιέρας, οφειλόταν ενδεχομένως στον επιφανειακό ενοφθαλμισμό των δειγμάτων. Πιθανώς σε ορισμένα από τα εμβόλια ποσοστό των κυττάρων δεν πρόλαβε να ενσωματωθεί στα δείγματα και μέχρι την ώρα της δειγματοληψίας, η οποία ακολουθούσε τον ενοφθαλμισμό και να ελήφθησαν περιοχές αυξημένης συγκέντρωσης πληθυσμού.

Επιμόλυνση στο παστεριωμένο γάλα (1^ο στάδιο)



Επιμόλυνση κατά τον τεμαχισμό του τυροπήγματος (2^ο στάδιο)



Σχήμα 6.7. Συγκεντρική απεικόνιση της συμπεριφοράς της *L. monocytogenes* κατά την παραγωγή και ωρίμαση δειγμάτων Φέτας (**α, γ**) και Γραβιέρας (**β, δ**) συγκριτικά με τις καμπύλες πρόβλεψης ενός δυναμικού ενοποιημένου (integrated) μοντέλου, μετά από προσαρμογή τους σε αυτό με την βοήθεια του προγράμματος GroPIN (<http://www.aua.gr/psomas/gropin/>). Τα δείγματα παρασκευάστηκαν έπειτα από ενοφθαλμισμό με το παθογόνο στο στάδιο ψύξης του παστεριωμένου γάλακτος (**α, β**) και στο στάδιο τεμαχισμού του τυροπήγματος (**γ, δ**). Τα κύτταρα της *L. monocytogenes* είχαν προηγουμένως εξοικειωθεί (πλαγκτονικά κύτταρα ή **PK**, κλειστά σύμβολα) ή σχηματίσει βιοϋμένια (αποκολλημένα κύτταρα ή **AK**, ανοιχτά σύμβολα) σε TSBYE (■), γάλα (◆), Φέτα (▲), Γραβιέρα (▴). Σε όλες τις περιπτώσεις σαν χρόνος "0" λαμβάνεται η ημέρα της τυροκόμησης.

Προηγούμενες μελέτες πάνω στην επίδραση των διαφορετικών επιπέδων ενοφθαλμισμού στην συμπεριφορά της *L. monocytogenes* κατά την τυροκόμηση, σημείωσαν ότι ο τελικός πληθυσμός του παθογόνου εξαρτάται και από το επίπεδο ενοφθαλμισμού (Rogga et al., 2005, Pinto et al., 2009, Angelidis et al., 2010). Οι Morgan et al. (2001), παρατήρησαν επιβίωση του παθογόνου κατά την διάρκεια της ωρίμασης (42 ημέρες), ακόμα και στο χαμηλό αρχικό εμβόλιο των 100 CFU/g. Στη παρούσα μελέτη ωστόσο, η παραλλακτικότητα των διαφορετικών εμβολίων μειώθηκε σημαντικά από την δεύτερη δειγματοληψία (3^η ημέρα), ενώ η τελική επιβίωση των εμβολίων δεν φάνηκε να έχει κάποιον συσχετισμό με το αρχικό επίπεδο ενοφθαλμισμού.

Η επίδραση της προέλευσης (προϊστορίας) των κυττάρων της *L. monocytogenes* στην συμπεριφορά του κρίθηκε δευτερεύουσα σε σχέση με αντίστοιχες του σταδίου ενοφθαλμισμού και της τεχνολογίας παραγωγής του κάθε τυριού. Εντούτοις, στις περιπτώσεις τις οποίες ο μικροοργανισμός εμφάνισε μια ολοκληρωμένη κινητική αρχικά ανάπτυξης και στη συνέχεια μείωσης (Φέτα- 1^ο και 2^ο στάδιο, Γραβιέρα-1^ο στάδιο), παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των εμβολίων. Σε γενικές γραμμές τα εμβόλια που προέρχονταν από ευνοϊκά υποστρώματα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, όπως ήταν αυτά του TSBYE και του γάλακτος εμφάνισαν καλύτερη κινητική και μεγαλύτερη ικανότητα επιβίωσης σε σχέση με τα εμβόλια που προέρχονταν από πιο αφιλόξενα για τον παθογόνο υποστρώματα. Τα βιοϋμενικά κύτταρα (AK) παρουσίασαν μειωμένους υψηλότερους πληθυσμούς και χρόνους επιβίωσης και αυξημένους ρυθμούς θανάτωσης σε σχέση με τα πλαγκτονικά κύτταρα. Ιδιαίτερη μνεία έχει γίνει για τα AK από την Φέτα, τα οποία παρουσίασαν την μικρότερη ανάπτυξη (1^ο στάδιο) και ταχύτερη μείωση από όλα τα εμβόλια. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι τα κύτταρα των στελεχών της *L. monocytogenes* που σχημάτισαν βιοϋμένιο παρουσία της Φέτας, πέρα από την υψηλή οξύτητα του τροφίμου και την υψηλή θερμοκρασία επώασης (20°C), κλήθηκαν να ανταγωνιστούν στο σχηματισμό των βιοϋμενίων και την κατανάλωση των θρεπτικών συστατικών την ενδογενή χλωρίδα της Φέτας, γεγονός που τα κατέβαλε (Guillier et al., 2008).

Συνοπτικά μπορεί να ειπωθεί ότι τα τελικά προϊόντα μπορούν να χαρακτηριστούν με μεγαλύτερη επικινδυνότητα όταν η επιμόλυνση συμβαίνει κατά τα αρχικά στάδια της τυροκόμησης και κυρίως στο γάλα μετά την παστερίωση. Η συγκεκριμένη παρατήρηση τονίζει την σημασία της συγκριτικής μελέτης της συμπεριφοράς της *L. monocytogenes* σε σχέση με τα στάδια της τυροκόμησης που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Οι περισσότερες μελέτες που εξετάζουν την ικανότητα των φυσικοχημικών παραμέτρων των τυριών να ελέγχουν τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* κατά την διάρκεια της ωρίμασης κι εμπορίας, συνήθως επιλέγουν από το δεύτερο στάδιο επιμόλυνσης και μετά ή σε τυριά που έχουν ολοκληρώσει την ωρίμασή τους (Giannou et al., 2009, Samelis et al., 2009). Επομένως, καταλήγουν σε παρόμοια συμπεράσματα με

την παρούσα μελέτη, ότι η διαμόρφωση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του τροφίμου που έχει προηγηθεί, το καθιστά αποδεκτό από τη νομοθεσία, μειώνοντας τον πληθυσμό του παθογόνου σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα. Στην περίπτωση όμως ενσωμάτωσης του παθογόνου στα τυριά από τα πρώτα στάδια της τυροκόμησης, ο πληθυσμός του δύναται να αυξηθεί σημαντικά, έτσι ώστε ακόμα και αν το τρόφιμο αφεθεί να ωριμάσει για ολόκληρο το υποχρεωτικό χρονικό διάστημα που ορίζεται από την Ελληνική νομοθεσία, να έχει τη δυνατότητα να επιβιώσει σε επίπεδα ανώτερα του ορίου των 100 κυττάρων/g. Τέλος, με δεδομένο ότι η δεύτερη ωρίμαση πραγματοποιείται στους 4°C, κρίνεται πιθανό η *L. monocytogenes* να διατηρηθεί στα ίδια επίπεδα στα τελικά προϊόντα κατά τη διάρκεια της εμπορίας τους και μέχρι αυτά να καταναλωθούν.

6.4 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, το στάδιο στο οποίο πραγματοποιείται η επιμόλυνση ενός τυροκομικού προϊόντος από το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes*, μέσω άλλων τροφίμων ή του ανθρώπου είτε μέσω του εξοπλισμού, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κινητική και την επιβίωση του παθογόνου κι ενδέχεται να την επιμηκύνει. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν τη σπουδαιότητα της υγιεινής των εγκαταστάσεων ενός τυροκομείου και την προσοχή που απαιτείται κατά τα πρώτα κυρίως στάδια της παραγωγής τυροκομικών προϊόντων, όπου επιμόλυνση με *L. monocytogenes* ενδέχεται να οδηγήσει σε ανάπτυξη του παθογόνου κι επιβίωσή του στο τρόφιμο για μεγαλύτερα διαστήματα από μια αντίστοιχη επιμόλυνση κατά την δεύτερη ωρίμαση, στην οποία έχει αποκτήσει τις κατάλληλες φυσικοχημικές ιδιότητες που το καθιστούν περισσότερο ασφαλές. Επιπλέον, ανθεκτικότερα εμβόλια αποδείχτηκαν εκείνα που προέρχονταν από ιδανικά περιβάλλοντα για την ανάπτυξη του παθογόνου, όπως ήταν το TSBYE και το γάλα. Η επίδραση της φυσιολογίας του παθογόνου στην επιβίωσή του μειώνεται προς το τέλος της ωρίμασης των προϊόντων, καθώς ολοκληρώνεται η διαμόρφωση των τελικών φυσικοχημικών παραμέτρων του προϊόντος. Ωστόσο, η επιμόλυνση του προϊόντος σε αρχικά στάδια εγκυμονεί κίνδυνο ανάπτυξης του παθογόνου σε τόσο υψηλά επίπεδα, που οι μετέπειτα ενδογενείς συνθήκες του προϊόντος, όπως αυτές διαμορφώνονται κατά την ωρίμαση δεν επαρκούν να τα μειώσουν σε αποδεκτά για τη νομοθεσία επίπεδα. Στο περιβάλλον ενός τυροκομείου, όπου ακόμα και το νωπό γάλα (μη παστεριωμένο) ενδέχεται να βρεθεί στους περισσότερους από τους χώρους της παραγωγής κι της αποθήκευσης, χρειάζεται ενδεδειγμένη καθαριότητα, έτσι ώστε να μειωθούν σημαντικά οι εστίες επιμόλυνσης των παραγόμενων προϊόντων. Σύμφωνα με τα παραπάνω κρίνεται αναγκαίος ο έλεγχος σημείων κατά την παραγωγή τυροκομικών προϊόντων, στα οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί επιμόλυνση από κύτταρα *L. monocytogenes*, όπου ανάλογα με τις συνθήκες ωρίμασης και αποθήκευσης ενδέχεται να πολλαπλασιαστεί ή να επιβιώσει, καθιστώντας τα τρόφιμα επικίνδυνα για κατανάλωση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ύπαρξη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων αποτελεί ένα πάγιο πρόβλημα της βιομηχανίας τροφίμων σε παγκόσμιο επίπεδο. Οι συνεχείς εμφανίσεις κρουσμάτων λιστερίωσης υποδηλώνουν ότι παρά την βελτίωση των μέτρων αντιμετώπισης της *L. monocytogenes* και την συνεχή έρευνα πάνω στις ιδιότητες και την συμπεριφορά του, υπάρχουν πολλές ακόμα ανεξερεύνητες περιοχές, οι οποίες ενδέχεται να προσδώσουν τα στοιχεία εκείνα που χρειάζονται για τον βέλτιστο δυνατό έλεγχο του. Επιμόλυνση ενός τροφίμου από τον παθογόνο μπορεί να προκύψει από πολλές πηγές κατά την διάρκεια παραγωγής, αποθήκευσης κι εμπορίας των τροφίμων, όπως την πρώτη ύλη, τα ενδιάμεσα προϊόντα ή τα πρόσθετα, τις επιφάνειες επεξεργασίας και τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται, τα παραπροϊόντα, το προσωπικό, κ.α., η καθεμία από τις οποίες αναμένεται να επιδράσει διαφορετικά στη φυσιολογία του μικροοργανισμού. Η φυσιολογία των κυττάρων της *L. monocytogenes* με τη σειρά της, επηρεάζει την συμπεριφορά και την κινητική του, ανάλογα και με το περιβάλλον που βρίσκεται. Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε σαν στόχο να μελετήσει το πώς δύνανται να συμπεριφερθούν τα στελέχη της *L. monocytogenes*, προερχόμενα από διαφορετικά περιβάλλοντα και με διαφορετική προϊστορία, σε καταστάσεις που προκύπτουν κατά την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς και στο περιβάλλον ενός τυροκομείου.

Σαν πρώτο βήμα επιλέχτηκε η δειγματοληπτική έρευνα (survey) των επιφανειών παραγωγής και των προϊόντων από Ελληνικές γαλακτοκομικές επιχειρήσεις (τυροκομεία) μεσαία κλίμακας, κατά τα έτη 2007-2009, για τον προσδιορισμό της υγιεινολογικής τους κατάστασης και του επιπολασμού της *L. monocytogenes* σε αυτά, καθώς και για την απομόνωση στελεχών του (**Κεφάλαιο 2**). Η ανίχνευση των παθογόνων έγινε αφενός μεν από σημεία που έρχονται σε άμεση επαφή με τα τρόφιμα (πιεστήριο, παγολεκάνη, πάγκους εργασίας), αλλά και από δάπεδα, τοίχους, απόβλητα, ποδιές εργαζομένων κ.α. Ο επιπολασμός των παθογόνων μετρήθηκε σε χαμηλά ποσοστά σε σχέση με τη βιβλιογραφία. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα σε γενικές γραμμές έχουν χαμηλότερα ποσοστά επιπολασμού παθογόνων σε σχέση με προϊόντα όπως το κρέας και τα κρεατοσκευάσματα, τα λαχανικά, τα ιχθυρά κ.α. Οι χαμηλές τιμές επιπολασμού μπορεί να οφείλονται στην καλή κατάσταση των τυροκομείων που εξετάστηκαν ή στην μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε. Μελλοντικές έρευνες οι οποίες θα χρησιμοποιήσουν μοριακές μεθόδους ή/και δειγματοληψία μεγαλύτερων επιφανειών μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικά αποτελέσματα. Η γενικότερη μικροβιολογική κατάσταση των επιφανειών επεξεργασίας και των τροφίμων βρέθηκε αρκετά επιβαρυσμένη, με υψηλούς πληθυσμούς κολοβακτηρίων, εντεροβακτηρίων, ΟΜΧ, ζυμών και μυκήτων, ακόμα και σε ευπαθή προϊόντα όπως το νωπό γάλα και τα μαλακά τυριά ορού. Η ύπαρξη των ομάδων της

εντερικής οδού και των ζυμών και μυκήτων σε προϊόντα παστεριωμένου γάλακτος υποδηλώνει διασταυρούμενη επιμόλυνση από το περιβάλλον των τυροκομείων, τις επιφάνειες παραγωγής, το προσωπικό ή άλλα προϊόντα. Για το λόγο αυτό, οι υπεύθυνοι της κάθε επιχείρησης θα πρέπει να μεριμνούν για την τήρηση των ορθών κανόνων υγιεινής και των προτύπων από όλο το προσωπικό, καθώς και για την επιμελή καθαριότητα και εξυγίανση των επιφανειών σε όλη την εγκατάσταση του τυροκομείου, είτε αυτές έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα ή όχι.

Θεωρώντας σημαντικό παράγοντα επιμόλυνσης των τροφίμων με τον παθογόνο τα βιοϋμένια που σχηματίζονται στις επιφάνειες επεξεργασίας τους, κρίθηκε απαραίτητη η αξιολόγηση της ικανότητας κυττάρων της *L. monocytogenes* να σχηματίζουν βιοϋμένια σε κουπόνια (επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα, εν συγκρίσει με την φυσιολογία τους (αποκολλημένα ή πλαγκτονικά), την θερμοκρασία περιβάλλοντος και το υπόστρωμα σχηματισμού (**Κεφάλαιο 3**). Τα σχηματισμένα βιοϋμένια αποκολλήθηκαν μηχανικά και μελετήθηκε η κινητική αύξησής τους σε γάλα. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε η ακούσια (αβίαστη) αποκόλληση κυττάρων, έπειτα από προσκόλλησή τους στο δυσμενές περιβάλλον του γιαουρτιού και η αύξησή τους σε γάλα και κρέμα του εμπορίου. Παράλληλα, σχηματίστηκαν βιοϋμένια σε διαφορετικές συνθήκες οξύτητας, αλατότητας και θερμοκρασίας σχετικές με αυτές ενός τυροκομείου, με σκοπό την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας διαφόρων διαδικασιών θερμικής επεξεργασίας ή χημικής απολύμανσης στην εξάλειψή τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσκόλληση των βακτηρίων στα κουπόνια και ο πολλαπλασιασμός στους σε διαφορετικά υποστρώματα τροφίμων ήταν περισσότερο εμφανής στους 20°C από ότι τους 5°C, ενώ στους 20°C, σημαντικά υψηλότεροι πληθυσμοί προσκολλημένων κυττάρων ανακτήθηκαν από κουπόνια που είχαν τοποθετηθεί σε κρέμα, σε σχέση με αυτά που είχαν τοποθετηθεί σε γάλα. Τα υπολείμματα τροφίμων, σαν μέρος της οικολογικής προϊστορίας, επηρέασαν την ανάπτυξη και την συμπεριφορά της *L. monocytogenes*, επίδραση που διέφερε μεταξύ της πλαγκτονικής και βιοϋμενικής ανάπτυξης. Σχετικά με την αύξηση των αποκολλημένων κυττάρων της *L. monocytogenes* σε γάλα, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μπορούν να αποδοθούν στην θερμοκρασία, την κατάσταση (π.χ. υγρό ή στερεό) και την σύνθεση του τροφίμου. Μπορεί επομένως να ειπωθεί ότι σε περίπτωση επιμόλυνσης, ο κίνδυνος ανάπτυξης της *L. monocytogenes* ενδέχεται να είναι υψηλότερος όταν τα βακτήρια προέρχονται από βιοϋμένια αντί από υγρά τρόφιμα ή υπολείμματα. Συνεπώς, μελέτες που αξιολογούν την επίδραση των διαδικασιών συντήρησης ή περιγράφουν μαθηματικά τις αποκρίσεις των μικροβίων θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τους την διαφορετική συμπεριφορά των κυττάρων όταν αυτά αποκολλούνται από τον σχηματισμό του βιοϋμενίου. Σαν μελλοντικός στόχος θα μπορούσε να τεθεί η εκτίμηση παρόμοιων σεναρίων επιμόλυνσης με πολλαπλά στελέχη της *L. monocytogenes*, όπως και η αξιολόγηση των γονοτυπικών μεταβολών λόγω της προσκόλλησης και της αποκόλλησης του βακτηρίου. Επιπλέον,

από την μελέτη της συμπεριφοράς των βιοϋμενικών κυττάρων έναντι της απολύμανσης, προέκυψε ότι τα βιοϋμένια της *L. monocytogenes* έχουν την δυνατότητα να επιβιώνουν για μακρά περίοδο ενάντια στην θερμική επεξεργασία και την χημική απολύμανση, ανάλογα με την θερμοκρασία περιβάλλοντος, το είδος, τη συγκέντρωση και τον χρόνο εφαρμογής του απολυμαντικού και την φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων. Η παρακολούθηση και καταγραφή των αποτελεσμάτων του καθαρισμού και της απολύμανσης σε τακτά διαστήματα είναι σημαντική, λόγω της δυνατότητας βελτιστοποίησης της διαδικασίας. Περαιτέρω έρευνα στους παράγοντες που μπορούν να μειώσουν την ανθεκτικότητα του βιοϋμενίου της *L. monocytogenes* έναντι της απολύμανσης, μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση του φαινομένου και να διευκολύνει τον σχηματισμό καινούριων στρατηγικών καθαρισμού και απολύμανσης, αυξάνοντας έτσι την ασφάλεια των τροφίμων.

Επόμενος στόχος ήταν ο προσδιορισμός του συνόλου των συνθηκών που απαιτούνται για να ξεκινήσει η ανάπτυξη του παθογόνου όταν βρεθεί σε ένα τρόφιμο. Αρχικά, εξετάστηκε η ικανότητα ανάπτυξης ή μη της *L. monocytogenes*, σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (TSBYE) σε σχέση με την φυσιολογία των κυττάρων του (βιοϋμένια, αποκολλημένα και πλαγκτονικά κύτταρα) και της αρχικής του συγκέντρωσης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση των ορίων ανάπτυξης της *L. monocytogenes* (από μεμονωμένα κύτταρα μέχρι και υψηλούς πληθυσμούς) σε TSBYE, γάλα και κατά τα πρώτα στάδια μιας τυροκόμησης, συναρτήσει της οξύτητας και της αλατοπεριεκτικότητας του υποστρώματος (**Κεφάλαιο 4**). Από τα αποτελέσματα της πιθανότητας ανάπτυξης των διαφορετικών ειδών κυττάρων της *L. monocytogenes*, μπορεί να εξαχθεί ότι εφόσον υψηλοί πληθυσμοί βιοϋμενικών κυττάρων αποκολληθούν από επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων και επιμολύνουν ένα προϊόν, συμπεριφέρονται παρόμοια με τα αντίστοιχα πλαγκτονικά κύτταρα, τα οποία προέρχονται είτε από υγρά τρόφιμα είτε από σημεία στην γραμμή παραγωγής που υπάρχουν υπολείμματα σε υγρή μορφή. Αντίθετα, μικροί πληθυσμοί κυττάρων προερχόμενοι από υγρά τρόφιμα, μπορούν να αυξηθούν σε περισσότερα τρόφιμα και σε πιο δυσμενείς για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού συνθήκες, σε σχέση με αντίστοιχους πληθυσμούς κυττάρων που προέρχονται από τις επιφάνειες. Η γνώση αυτή βοηθά στον συσχετισμό του πληθυσμού του παθογόνου και της συμπεριφοράς του, με ένα συγκεκριμένο σημείο του εξοπλισμού επεξεργασίας στο οποίο ενδέχεται να βρίσκεται ως βιοϋμένιο και να επιμολύνει τα διερχόμενα προϊόντα (π.χ., λερωμένες κοιλότητες έναντι υπολειμμάτων υγρών τροφίμων), βοηθώντας έτσι στη βιοϊχνηλασιμότητα. Επιπλέον, φάνηκε ότι κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου σε διαφορετικά περιβάλλοντα μειώνεται η ποικιλότητα των στελεχών του παθογόνου και επικρατούν αυτά που έχουν τη δυνατότητα να κυριαρχούν έναντι άλλων στον αποικισμό των επιφανειών. Τα πλαγκτονικά κύτταρα τείνουν να πολλαπλασιάζονται ταχύτερα από τα αποκολλημένα, και πολύ περισσότερο από τα προσκολλημένα, ειδικότερα σε δυσμενείς συνθήκες και χαμηλά επίπεδα επιμόλυνσης. Οι διαφορές μεταξύ των τύπων κυττάρων

αμβλύνονται σε υψηλά επίπεδα επιμόλυνσης και σε συνθήκες που πλησιάζουν τις άριστες. Τα δεδομένα της συγκριτικής μελέτης των ορίων ανάπτυξης της *L. monocytogenes* σε τρία υποστρώματα έδειξαν ότι με δεδομένες τις συνθήκες της οξύτητας ενός τροφίμου (π.χ. ενός τυριού), για να καλυφθούν τα μικροβιολογικά κριτήρια σχετικά με τις συνθήκες που εξασφαλίζουν την μη ανάπτυξη του παθογόνου, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων άλατος, γεγονός που αντιτίθεται στις νέες τάσεις για ήπια επεξεργασμένα τρόφιμα. Σε διαφορετική περίπτωση, υπάρχει υψηλή πιθανότητα έναρξης της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* και αντίστοιχη αύξηση της επικινδυνότητας του τροφίμου. Τα μοντέλα που προέκυψαν από την μελέτη συνδράμουν στην γνώση της συμπεριφοράς των κυττάρων *L. monocytogenes* σε συνάρτηση με τις μεταβολές των συνθηκών του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται. Εντούτοις, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα καθότι οι προβλέψεις των μαθηματικών μοντέλων που βασίζονται σε δεδομένα από εργαστηριακά υποστρώματα, δεν αντικατοπτρίζουν πλήρως τις εσωτερικές συνθήκες ενός τροφίμου, οι οποίες αυξάνουν την παραλλακτικότητα της συμπεριφοράς του μικροοργανισμού. Μελλοντικό στόχο μπορεί να αποτελέσει η εξαγωγή περισσότερων πειραματικών δεδομένων σε τρόφιμα ή συστήματα τροφίμων για την παραγωγή μαθηματικών μοντέλων, καθώς και την επικύρωση των υπαρχόντων με σκοπό την επίτευξη πιο ρεαλιστικών προβλέψεων, τον καλύτερο έλεγχο των διαδικασιών και την παραγωγή ασφαλέστερων προϊόντων.

Τον καθορισμό των συνθηκών που ο παθογόνος έχει την δυνατότητα να αυξηθεί ακολούθησε η μελέτη της κινητικής αύξησής του σε ποικίλες συνθήκες ρυθμισμένης οξύτητας ή αλατότητας, καθώς και σε συνθήκες προσομοίωσης μιας διασταυρούμενης επιμόλυνσης στο περιβάλλον ενός τυροκομείου, μέσω της μεταφοράς του μικροοργανισμού σε υποστρώματα με διαφορετικές τιμές pH ή a_w (**Κεφάλαιο 5**). Στην συγκεκριμένη μελέτη επιχειρήθηκε η ποσοτικοποίηση της φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων (Q), η οποία υπολογίστηκε ανά περίπτωση από το αντίστοιχο έργο προσαρμογής, το οποίο με την σειρά του εξαρτάται από τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (μ_{max}) και τον χρόνο προσαρμογής (lag ή λ). Για τον μ_{max} του παθογόνου βρέθηκε ότι σε προσομοιώσεις ανάπτυξης, κάτω από δυναμικές συνθήκες οξύτητας και αλατότητας, προσαρμόζεται άμεσα στο νέο περιβάλλον. Η φάση προσαρμογής των κυττάρων στις μεταβολές αλατότητας επηρεάστηκε τόσο από την διεύθυνση όσο και από το εύρος τους, σε αντίθεση με τις μεταβολές οξύτητας, όπου παρατηρήθηκε διαφοροποίηση (σημαντική αύξηση) του χρόνου προσαρμογής κυρίως σε μεταβολές κοντά στις τιμές pH που περιορίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου. Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η τροποποίηση του κλασικού μοντέλου Baranyi, ώστε να συμπεριλαμβάνει τόσο την μεταβολή της φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων (Q) σε καταστάσεις μη ανάπτυξης, όσο και το έργο προσαρμογής τους στο νέο περιβάλλον, σε περίπτωση που μεταφερθούν σε συνθήκες ανάπτυξης. Παρατηρήθηκε ότι η παραμονή της *L. monocytogenes* σε συνθήκες μη ανάπτυξης, όπως στην

περίπτωση προϊόντων με $pH < 4.4$ ή $a_w < 0.92$ ή τον συνδυασμό $pH 5.0$ και $a_w 0.94$ δεν είναι μια περίοδος κατά την οποία ο παθογόνος απλά επιβιώνει. Στην πραγματικότητα, τέτοιου είδους συνθήκες μπορούν να πυροδοτήσουν φαινόμενα προσαρμογής ή εξασθένησης, τα οποία μπορούν να ενισχύσουν ή να μειώσουν την ανάπτυξη του βακτηρίου, αντίστοιχα, όταν αυτό μεταφερθεί σε πιο ευνοϊκά περιβάλλοντα (διασταυρούμενη επιμόλυνση). Συνεπώς, οι προβλέψεις μοντέλων της μικροβιακής απόκρισης κοντά στα όρια ανάπτυξης του παθογόνου θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με προσοχή και πιθανώς με κατάλληλες τροποποιήσεις, που θα συμπεριλαμβάνουν τα φαινόμενα προσαρμογής ή τραυματισμού που περιγράφηκαν στο Κεφ. 5 της διατριβής. Για τον λόγο αυτό, η ικανότητα του μαθηματικού μοντέλου να προβλέπει με ακρίβεια την συμπεριφορά του παθογόνου κατά την διάρκεια δυναμικών συνθηκών οξύτητας ή αλατότητας στο γάλα, επιβεβαίωσε την χρησιμότητα των τροποποιήσεων που πραγματοποιήθηκαν. Η ταυτόχρονη εφαρμογή των μεταβολών της a_w και του pH , η χρήση μικτής καλλιέργειας στελεχών της *L. monocytogenes*, καθώς και η χρήση στερεού υποστρώματος ή συστήματος τροφίμου για την μελέτη επίδρασης των δυναμικών συνθηκών στην ενδιάμεση φάση προσαρμογής και την μετέπειτα ανάπτυξη της *L. monocytogenes* στον νέο περιβάλλον, αναμένεται να μειώσουν την αβεβαιότητα που υπάρχει κατά τη μοντελοποίηση της δυναμικής ανάπτυξης του μικροοργανισμού και να αυξήσουν την εγκυρότητα του μοντέλου και της θεωρητικής του βάσης και κατά συνέπεια την αποτελεσματική χρήση του σε τρόφιμα.

Για την ολοκλήρωση της διατριβής, αξιολογήθηκε η ταυτόχρονη επίδραση της πλειοψηφίας των παραγόντων που εξετάστηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια, όπως είναι η φυσιολογία των κυττάρων, οι δυναμικές συνθήκες οξύτητας και αλατότητας, η θερμοκρασία περιβάλλοντος, στην πιθανότητα και την κινητική ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, σε πραγματικές συνθήκες τυροκόμησης δύο δημοφιλών Ελληνικών τυριών, της Φέτας και της Γραβιέρας (**Κεφάλαιο 6**). Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η επίδραση της τεχνολογίας παραγωγής, η οποία μεταξύ των δύο τυριών έχει σημαντικές διαφορές που καθορίζουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, του σταδίου επιμόλυνσης του προϊόντος στις δύο τεχνολογίες και της φυσιολογίας του παθογόνου σε κάθε στάδιο ενοφθαλμισμού, στη μετέπειτα επιβίωσή του. Από τους εξεταζόμενους παράγοντες, περισσότερο καθοριστικός βρέθηκε το στάδιο ενοφθαλμισμού των στελεχών *L. monocytogenes* κατά την διαδικασία παρασκευής των δύο τυριών και σε συνδυασμό με την τεχνολογία τους, καθόρισαν την συμπεριφορά του μικροοργανισμού. Ιδιαίτερα στην τυροκόμηση της Γραβιέρας, οι διαφορές μεταξύ των τριών σταδίων ενοφθαλμισμού ήταν περισσότερο εμφανείς, λόγω του σταδίου αναθέρμανσης του πήγματος, το οποίο καθορίζει εκτός από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τροφίμου και την πιθανότητα ανάπτυξης του παθογόνου. Όσον αφορά την φυσιολογία του παθογόνου προέκυψε ότι τα εμβόλια που προέρχονταν από ευνοϊκά υποστρώματα,

όπως ήταν αυτά του υγρού θρεπτικού υποστρώματος (TSBYE) και του γάλακτος, εμφάνισαν καλύτερη κινητική και μεγαλύτερη ικανότητα επιβίωσης, κατά την τυροκόμηση και ωρίμαση, σε σχέση με τα εμβόλια που προέρχονταν από πιο αφιλόξενα για τον παθογόνο υποστρώματα (ιδιαίτερα της Φέτας). Τα βιοϋμενικά κύτταρα παρουσίασαν χαμηλότερους πληθυσμούς και χρόνους επιβίωσης και αυξημένους ρυθμούς θανάτωσης σε σχέση με τα πλαγκτονικά κύτταρα. Σε περίπτωση που η επιμόλυνση προκύψει κατά την ωρίμανση, αφού δηλαδή έχουν ήδη διαμόρφωθεί τα τελικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τυριών, οι διαφορές μεταξύ στελεχών με διαφορετική προέλευση είναι μικρές. Θα πρέπει να τονιστεί ωστόσο, πως τυχόν επιμόλυνση του προϊόντος στα αρχικά στάδια της τυροκόμησης, ενδέχεται να οδηγήσει σε ανάπτυξη του παθογόνου σε υψηλούς πληθυσμούς, ώστε το μετέπειτα δυσμενές περιβάλλον του προϊόντος, να μην επαρκεί να τους μειώσει σε αποδεκτά για τη νομοθεσία επίπεδα. Για ακόμα μια φορά διαφαίνεται η σημασία της τήρησης των κανόνων ορθής πρακτικής στις εγκαταστάσεις ενός τυροκομείου, ώστε η υγιεινολογική του κατάσταση να μην ευνοεί την επιμόλυνση των παραγόμενων προϊόντων, καθώς και η προσοχή που απαιτείται από το προσωπικό κατά τα πρώτα κυρίως στάδια της παραγωγής τυροκομικών προϊόντων, τα οποία έχουν την μεγαλύτερη επικινδυνότητα. Το ενοποιημένο δυναμικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την περιγραφή των αποτελεσμάτων, περιέγραψε ικανοποιητικά την ανάπτυξη, ωστόσο υπερεκτίμησε την ικανότητα επιβίωσης του παθογόνου στο περιβάλλον των τυριών, επειδή βασίστηκε σε δεδομένα από θρεπτικά υποστρώματα. Σε μελλοντικές μελέτες, θα μπορούσαν να εξεταστούν διαφορετικά στελέχη του μικροοργανισμού ταυτόχρονα και να προσδιοριστεί η ύπαρξή τους στα τελικά προϊόντα με μοριακές μεθόδους για την εύρεση των επιζώντων (στις περιπτώσεις επιβίωσης), καθώς και να χρησιμοποιηθεί ο ορός που προκύπτει κατά την στράγγιση, για την παρασκευή ενός μαλακού τυριού με σκοπό την μελέτη της συμπεριφοράς της *L. monocytogenes* στις πραγματικές συνθήκες ενός Ελληνικού τυροκομείου.

Αν και ο αριθμός των περιπτώσεων λιστερίωσης που κοινοποιούνται παγκοσμίως είναι σημαντικά μικρότερος από τον αντίστοιχο των υπολοίπων τροφιμογενώς μεταδιδόμενων παθογόνων μικροοργανισμών, η σοβαρότητα της νόσου και η υψηλή θνητότητά της έχει σαν αποτέλεσμα την θέσπιση πιο αυστηρών κριτηρίων για την παρουσία της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα, ιδιαίτερα στα έτοιμα προς κατανάλωση. Προς αυτήν την κατεύθυνση κινήθηκε η παρούσα διδακτορική διατριβή, με απώτερο σκοπό να μελετήσει τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά στελεχών της *L. monocytogenes* που είχαν απομονωθεί από επιφάνειες και προϊόντα γαλακτοκομικών επιχειρήσεων και να βοηθήσει στις μετέπειτα εκτιμήσεις επικινδυνότητας για τον παθογόνο σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Ιδιαίτερη βαρύτητα δόθηκε στην μελέτη της συμπεριφοράς της *L. monocytogenes* στην μορφή του βιοϋμενίου ή των αποκολλημένων από αυτό κυττάρων καθώς η ύπαρξή τους μπορεί εν μέρει να εξηγήσει την παρουσία του μικροοργανισμού στο περιβάλλον

επεξεργασίας τροφίμων και τα τρόφιμα. Επιπλέον, τα όρια ανάπτυξης του βακτηρίου στα τρόφιμα, συναρτήσει της φυσιολογίας τους και των περιβαλλοντικών παραγόντων, αποτελούν μια σημαντική πληροφορία για την βιομηχανία τροφίμων, καθώς οι Ευρωπαϊκοί κανονισμοί που ισχύουν διαφοροποιούνται ανάλογα με το αν το τελικό προϊόν είναι ή όχι ικανό να υποστηρίξει την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*. Πέρα των προαναφερθέντων, η καινοτομία της μελέτης έγκειται στο γεγονός ότι η επικύρωση των μοντέλων και η συνολική συγκριτική μελέτη των παραγόντων, που επηρεάζουν την συμπεριφορά του μικροοργανισμού, πραγματοποιήθηκαν σε τρόφιμο και στις συνθήκες τυροκόμησης και ωρίμασης των τυριών. Επιπλέον, η έρευνα πάνω στην υγιεινολογική κατάσταση των Ελληνικών τυροκομείων δύναται να βοηθήσει τις αρχές με την γνώση των πραγματικών ελλείψεων και των προβλημάτων που υπάρχουν. Άμεση εφαρμογή της γνώσης που εξήχθη από την διατριβή μπορεί να πραγματοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων σε σενάρια επιμόλυνσης των προϊόντων από επιφάνειες και το αντίστροφο, ή μεταξύ προϊόντων με διαφορετικές φυσικοχημικές παραμέτρους, συνεισφέροντας στην ανάπτυξη ρεαλιστικών μοντέλων βιοϊχνηλασιμότητας, καθώς με αυτά τα σενάρια μπορούμε να διερευνήσουμε την πηγή του προβλήματος σε μια επιδημιολογική μελέτη ή κατά την ανάλυση των εξάρσεων τροφικής δηλητηρίασης. Συγκεκριμένα, μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς της *L. monocytogenes* κατά μήκος της εφοδιαστικής αλυσίδας και στην εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την αποτελεσματικότητα των μεθόδων μείωσης ή διαχείρισης της επικινδυνότητας. Αυτό όμως προϋποθέτει πρωταρχικά συστηματική αποτίμηση της επικινδυνότητας των τροφίμων και διασύνδεση της παρουσίας της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα ή στο περιβάλλον επεξεργασίας με την προϊστορία των κυττάρων και την προσαρμοστική τους συμπεριφορά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aarnisalo, K., Lunden, J., Korkeala, H., Wirtanen, G., 2007. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. *LWT-Food Science and Technology* 40, 1041–1048.
- Aarnisalo, K., Salo, S., Miettinen, H., Suihko, M.-L., Wirtanen, G., Autio, T., Lunden, J., Korkeala, H., Sjoberg, A.-M., 2000. Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Safety* 20, 237–250.
- Adams, M.R. and Moss, M.O, 2000. *Food Microbiology*. Royal Society of Chemistry, U. K.
- Adams, M.R., Little, C.L., Easter, M.C., 1991. Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 65–71.
- Adda, J., J. C. Gripon, L. Vassal. 1982. The chemistry of flavour and texture generation in cheese. *Food Chemistry*, 9, 115-29.
- Adrião, A., Vieira, M., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., Tenreiro, R. P., Chambel, L., 2008. Marked intra-strain variation in response of *Listeria monocytogenes* dairy isolates to acid or salt stress and the effect of acid or salt adaptation on adherence to abiotic surfaces, *International Journal of Food Microbiology*, 123, 142–150.
- Aertsen, A., and Michiels, C. W., 2004. Stress and How Bacteria Cope with Death and Survival, *Critical Reviews in Microbiology*, 30, 263–273.
- Alavi, S.H., V.M. Puri, S.J. Knabel, R.H. Mohtar, R.H. Whiting, 1999. Development and validation of a dynamic growth model for *Listeria monocytogenes* in fluid whole milk. *Journal of Food Protection*, 62, 170-176.
- Alessandria, V., Rantsiou, K., Dolci, P., Cocolin, L., 2010. Molecular methods to assess *Listeria monocytogenes* route of contamination in a dairy processing plant, *International Journal of Food Microbiology*, 141, 156–162.
- Angelidis, A.S. and G.M. Smith, 2003. Three transporters mediate uptake of Glycine Betaine and Carnitine by *Listeria monocytogenes* to hyperosmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2): 1013-1022.
- Angelidis, A.S., Boutsouki, P., Papageorgiou, D. K., 2010. Loss of viability of *Listeria monocytogenes* in contaminated processed cheese during storage at 4 , 12 and 22°C. *Food Microbiology*, 27(6), 809–818.
- Angelidis, A.S., E.N. Chronis, D.K. Papageorgiou, I.I. Kazakis, K.C. Arsenoglou, G.A. Stathopoulos, 2006. Non-lactic acid, contaminating microbial flora in ready-to-eat foods: A potential food-quality index, *Food Microbiology*, 23, 95–100.

- Angelidis, A.S., L.T. Smith, L.M. Hoffman, and G.M. Smith, 2002. Identification of OpuC as a Chill-Activated and Osmotically Activated Carnitine Transporter in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6): 2644–50.
- Angelidis, A.S., S.S. Georgiadou, V. Zafeiropoulou, E.N. Velonakis, D.K. Papageorgiou and A. Vatopoulos, 2011. A survey of soft cheeses in Greek retail outlets highlights a low prevalence of *Listeria* spp. *Dairy Science and Technology*
- Anonymous 2005, Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs Official Journal of the European Communities (2005) 7/12/2007 (inclusive EU Regulation 1441/2007).
- Antwi, M., Bernaerts, K., Van Impe, J.F. and Geeraerd, A.H., 2007. Modelling the combined effects of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono- and coculture. *International Journal of Food Microbiology* 120, 71–84.
- Arslan, S. and F. Ozdemir, 2008. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese. *Food Control*, 19, 360–363.
- Arvanitoyannis, I.S., and Mavropoulos, A.A., 2000. Implementation of the hazard analysis critical control point (HACCP) system to Kasserli/Kefalotyri and Anevato cheese production lines *Food Control*, 11, 31-40.
- Asséré, A., N. Oulahal, B. Carpentier. 2008. Comparative evaluation of methods for counting surviving biofilm cells adhering to a polyvinyl chloride surface exposed to chlorine or drying. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1692-1702.
- Augustin, J. C., L. Rosso, V. Carlier, 2000. A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 169-181.
- Augustin, J.-C., Carlier, V., 2000. Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 53–70.
- Augustin, J.C., Zuliani, V., Cornu, M., Guillier, L., 2005. Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1019–1042.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., 2003. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries — analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 239–250.
- Baranyi, J. and Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predict ing bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277–294.

- Baranyi, J., T.P. Robinson, A. Kaloti, B.M. Mackey, 1995. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 27, 61-75.
- Barker G.C., Gomez N., Smid J., 2009. An introduction to biotracing in food chain systems. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 220-226.
- Belessi, C.A., Papanikolaou, S., Drosinos, E.H. and P.N. Skandamis, 2008. Survival and Acid Resistance of *Listeria innocua* in Feta Cheese and Yogurt, in the Presence or Absence of Fungi, *Journal of Food Protection*, 71(4), 742–749.
- Beresford, M.R., P.W. Andrew, G. Shama, 2001. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology* 90, 1000-1005.
- Bolton, L.F., and J.F. Frank, 1999. Defining the growth/no-growth interface for *Listeria monocytogenes* in Mexican-style cheese based on salt, pH, and moisture content. *Journal of Food Protection*, 62, 601-9.
- Booth, I.R, 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiology Reviews* 49, 359-378.
- Borucki, M.K., Gay, C.C., Reynolds, J., Mcelwain, K.L., Kim, S.H., Call, D.R., Knowles, D.P., 2005. Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* Strains from a High-Prevalence Dairy Farm. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 5893–5899.
- Borucki, M.K., Peppin, J.D., White, D., Loge, F., Call, D.R., 2003. Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7336–42.
- Boulangé-Petermann, L. 1996. Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. *Biofouling*, 10, 275–300.
- Bower, C.K., Daeschel, M.A., 1999. Resistance responses of microorganisms in food environments. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 33–44.
- Boziaris, I.S., P.N. Skandamis, M. Anastasiadi, G.J. Nychas, 2007. Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 796-805.
- Bremer, P.J., I. Monk, C.M. Osborne, 2001. Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. *Journal of Food Protection*, 64, 1369-1376.
- Bremer, P.J., Monk, I., Butler, R., 2002. Inactivation of *Listeria monocytogenes* /*Flavobacterium* spp. biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 321–325.
- Briandet, R., T. Meylheuc, C. Maher, M. N. Bellon-Fontaine, 1999. *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under

- different environmental growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5328-5333.
- Brien, M.O., Hunt, K., Mcsweeney, S., Jordan, K., 2009. Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese. *Food Microbiology*, 26(8), 910–914.
- Buchanan R.L., and Edelson, S.G., 1996. Culturing enterohemorrhagic *E. coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4009-4013.
- Buchanan, R. L., and L. A. Klawitter, 1991. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 235-246.
- Buchanan, R., Damert, W., Whiting, R. and van Schothorst, M., 1997. Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose–response relationship for *L. monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. *Journal of Food Protection*, 60, 918–922.
- Buchanan, R.L., Golden, M.H., Whiting, R.C., Phillips, J.G., Smith, J.L., 1994. Non thermal inactivation models for *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science* 59, 179-188.
- Calicioglu, M., Sofos, J.N., Kendall, P.A., 2003. Influence of marinades on survival during storage of acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* inoculated post-drying on beef jerky. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 283-292.
- Calicioglu, M., Sofos, J.N., Samelis, J., Kendall, P.A., Smith, G.C., 2002. Destruction of acid- and non-adapted *Listeria monocytogenes* during storage of beef jerky. *Food Microbiology*, 19, 545-559.
- Carlos, V.-S., R.-S. Oscar, Q.-R. Elsa Irma, 2001. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city, *Food Microbiology*, 218,177–181.
- Carpentier, B., and D. Chassaing. 2004. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 111-122.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012(a). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012(b). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Imported Frescolina Marte Brand Ricotta Salata Cheese (Final Update) <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-09-12/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Crave Brothers Farmstead Cheeses (Final Update) <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-07-13/index.html>

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National *Listeria* Surveillance Annual Summary, 2011. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2013.
- Chaitiemwong, N., Hazeleger, W.C., Beumer, R.R., 2010. Survival of *Listeria monocytogenes* on a conveyor belt material with or without antimicrobial additives. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 260-263.
- Chambel, L., Sol, M., Fernandes, I., Barbosa, M., Zilhão, I., Barata, B., Jordan, S., 2007. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle, *International Journal of Food Microbiology*, 116, 52–63.
- Chavant, P., Gaillard-martinie, B., Michel, H., 2004. Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase, *FEMS Microbiology Letters* 236, 241–248.
- Chavant, P., B. Martinie, T. Meylheuc, M.N. Bellon-Fontaine, M. Hebraud, 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 728-737.
- Cheroutre-Vialette, M., and A. Lebert, 2000. Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in dynamic conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 201-207.
- Chorianopoulos N., E. Giaouris, I. Grigoraki, P. Skandamis, G.-J. Nychas, 2011. Effect of acid tolerance response (ATR) on attachment of *Listeria monocytogenes* Scott A to stainless steel under extended exposure to acid or/and salt stress and resistance of sessile cells to subsequent strong acid challenge. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 400–406
- Chorianopoulos, N.G., Giaouris, E.D., Skandamis, P.N., Haroutounian, S.A., Nychas, G.-J.E. 2008. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: Bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1586-1596.
- Clapp, P.A., Davies, M.J., French, M.S., Gilbert B.C., 1994. The bactericidal action of peroxides- an E.P.R. spin-trapping study. *Free Radical Research*, 21, 147-167.
- Cloete, T.E., 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 277 – 282.
- Cocolin L, Rantsiou K, Iacumin L, Cantoni C, Comi G. Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 6273–82.

- Colak, H., Hampikyan, H., Bingol, E. B., Ulusoy, B., 2007. Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella spp.* in Tulum cheese, *Food Control*, 18, 576–579.
- Combase, 2009. Combase Browser accessed in October 2009 at <http://combase.arserrc.gov/BrowserHome/SearchOptions/Search.aspx>Contact.aspx>. Accessed in October 2008.
- D’Agostino, M., Wagner, M., Vazquez-Boland, J., Kuchta, T., Karpiskova, R., Hoorfar, J., Novella, S., 2004. A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model—towards an international standard. *Journal of food protection*, 67(8), 1646–55.
- Dalgaard P, Buch P, Silberg S., 2002. Seafood Spoilage Predictor—development and distribution of a product specific application software, *International Journal of Food Microbiology*, 73(3), 343-9.
- Dalgaard, P. 1995. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 305–317
- Daughtry, B.J., Davey, K.R., Thomas, C.J., Verbyla, A.P., 1997. Food processing: a new model for the thermal destruction of contaminating bacteria. *International Association for Engineering and Food, Proceedings of the 7th International Congress on Engineering and Food, Brighton, England, 13-17 April 1997, Vol. 1, pp. A113-A116.*
- Davey, K.R., 1993. Linear–Arrhenius models for bacterial growth and death and vitamin denaturations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 12, 172–179.
- Davis, M.J., P.J. Coote, P. O’Byrne. 1996. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology*, 142, 2975-2982.
- De Buyser, M.-L., B. Dufour, M. Maire, V. Lafarge. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 1-17.
- Delignette-Muller, M.L., F. Baty, M. Cornu, H. Bergis, 2005. Modelling the effect of a temperature shift on the lag phase duration of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 100, 77-84.
- Delignette-Muller, M.L., Rosso, L., Flandrois, J.P., 1995. Accuracy of microbial growth predictions with square root and polynomial models. *International Journal of Food Microbiology* 27, 139–146.
- Den Aantrekker, E.D., Boom, R.M., Zwietering, M.H., van Schothorst, M., 2003. Quantifying recontamination through factory environments—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 117–130.
- Destro, M.T., A. De Melo Serrano, D.Y. Kabuki, 1991. Preliminary Isolation of *Listeria* Species from Some Brazilian Meat and Dairy Products. *Food Control*, 2(2), 110-112.

- Di Bonaventura, G., R. Piccolomini, D. Paludi, V. D’Orio, A. Vergara, M. Conter, and A. Ianieri. 2008. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1552-1561.
- Dictionary. Com <http://dictionary.reference.com/>
- Dillon, R., T. Patel, S. Ratnam, 1994. Occurrence of *Listeria* in hot and cold smoked seafood products. *International Journal of Food Microbiology*, 22, 73-77.
- Djordjevic, D., M. Wiedmann, L.A. McLandsborough, 2003. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2950-2958.
- Doyle, M.E., Mazzotta, A.S., Wang, T., Wiseman, D.W., Scott, V.N., 2001. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 64(3), 410-429.
- Driscoll, B. O., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (1996). Adaptive Acid Tolerance Response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an Acid-Tolerant Mutant Which Demonstrates Increased Virulence, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1693–1698.
- DRMI, 2007. *Listeria* model from Danish Meat Research Institute (DMRI). Available from <http://1.test.dezone.dk/> (username: matmodel and password: listeria).
- Dufrenne, J., E. Delfgou, W. Ritmeester, S. Notermans. 1997. The effect of previous growth conditions on the lag phase time of some foodborne pathogenic micro-organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 34, 89-94.
- EFSA, 2013. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011, Part A *Listeria monocytogenes* prevalence estimates (scientific report), *EFSA journal* 11(6): 3241.
- El-Hofi, M. El-S., EL-Tanboly and A. Ismail, (2008). Implementation of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System to UF White Cheese Production Line, *International Journal of Food Safety* 10, 1–8.
- Elotmani, F., Assobhei, O., Millie, J., Jadida, E., Poincare, H., & Nancy, I. (2002). Characterization of Anti-*Listeria monocytogenes* Bacteriocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus lactis* Strains Isolated from Raïb, a Moroccan Traditional Fermented Milk, *Current Microbiology* 44, 10–17.
- EN ISO 11290-1:1998. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*—Part 1: Detection Method. (Amd 1: 2004).

- EN ISO 11290-2:1998. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*—Part 2: Enumeration Method. (Amd 1: 2004).
- EN ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria -- Colony-count technique at 30 degrees C.
- EN ISO 18593:2004. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs — Horizontal Methods for Sampling Techniques from Surfaces Using Contact Plates and Swabs.
- EN ISO 21527-1:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds -- Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95
- EN ISO 21528-2:2004. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Detection and Enumeration of Enterobacteriaceae — Part 2: Colony-count Method.
- EN ISO 4832:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique. Geneva, Switzerland.
- EN ISO 4833:2003. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms—Colony Count Technique at 30 °C.
- EN ISO 6579:2002. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Detection of Salmonella spp.
- EN ISO 6888-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the enumeration of coagulase positive *Staphylococcus aureus* and other species—Part 1: technique using Baird–Parker agar medium. Amendment 1: Inclusion of precision data (Amd.1:2003).
- Erkmen, O., 2000. Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in Turkish White cheese during the ripening period, *Journal of Food Engineering*, 46, 127–131.
- European Center for Disease Prevention and Control (ECDC), 2011. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe. http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf
- European Food Safety Authority, 2013. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 2013, 11(4): 3129-3379.
- European-Commission. 2005. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs Official Journal. L-338:1-26.

- European-Commission. 2007. Commission Regulation (EC) No 1441/2007 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal. L-322:12–29.
- Eustace, I., Midgley, I., Giarrusso, C., Laurent, C., Jenson, I., Summer, J., 2007. An alternative process for cleaning knives used on meat slaughter floors. *International Journal of Food Microbiology* 113, 23-27.
- Faleiro, M.L., Andrew, P.W., Power, D., 2003. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 207-216.
- Farber, J. M., and P. I. Peterkin, 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews* 55:476–511.
- Farber, J.M., M.A. Johnston, U. Purvis, A. Loit, 1987. Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria* spp., *International Journal of Food Microbiology*, 5:157–163.
- Fatemi, P., and Frank, J.F., 1999. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *Journal of Food Protection*, 62(7), 761-765.
- FDA/CFSAN (Food and Drug Administration/Center for Food Safety and Applied Nutrition), 2003. Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected food categories of ready-to-eat foods. <http://www.fsis.usda.gov/OA/news/2003/rtedata.htm>
- Fernandez, P.S., S.M. George, C.C. Sills, M.W. Peck, 1997. Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 37–45.
- Fleming, H.P., Romick, T.L., McFeeters, R.F., 1996. Aerobic and Anaerobic Metabolism of *Listeria monocytogenes* in Defined Glucose Medium, *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 304-307.
- Fox F., L. H. P. McSweeney, T. M. Cogan, T. P. Guinee (eds). 2004, *Cheese, chemistry, physics and microbiology*, 3rd Ed, Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA. Vol 1, 20,49
- Fox, E., Hunt, K., Brien, M. O., Jordan, K., 2011. *Listeria monocytogenes* in Irish Farmhouse cheese processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 145, S39–S45.
- Fox, E., T. O'Mahony, M. Clancy, R. Dempsey, M. O'Brien and K. Jordan, 2009, *Listeria monocytogenes* in the Irish Dairy Farm Environment, *Journal of Food Protection*, 72 (7), 1450–1456.
- Frank, J.F., and Koffi, R.A., 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*, 53, 550-554.

- Gameiro, N., Ferreira-Dias, S., Ferreira, M. Brito, L., 2007. Evolution of *Listeria monocytogenes* populations during the ripening of naturally contaminated raw ewe's milk cheese. *Food Control*, 18(10), 1258–1262.
- Gandhi, M., and Chikindas, M.L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 1–15.
- Garcı, T., Martı, M., Lucas, R., Ga, A., Omar, N. Ben., 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 161–170.
- Garrett, T.R., M. Bhakoo, Z. Zhang, 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces, *Progress in Natural Science*, 18, 1049–1056.
- Gaulin, C., D. Ramsay, S. Bekal, 2012. Widespread Listeriosis Outbreak Attributable to Pasteurized Cheese, Which Led to Extensive Cross-Contamination Affecting Cheese Retailers, Quebec, Canada, 2008. *Journal of Food Protection*, 75(1), 71–78.
- Gay, M., O. Cerf, K. R. Davey, 1996. Significance of pre-incubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of *Listeria monocytogenes* at 14°C. *Journal of Applied Microbiology*, 81, 433-438.
- Gaya, P., C. Saralegui, M. Medina, M. Nunez, 1996. Occurrence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in raw caprine milk. *Journal of Dairy Science*, 79, 1936-41.
- Geeraerd, H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F., 2005. GInaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 102(1), 95–105.
- Geornaras, I., P.N. Skandamis, K.E. Belk, J.A. Scanga, P.A. Kendall, G.C. Smith, J.N. Sofos. 2006a. Post-processing application of chemical solutions for control of *Listeria monocytogenes*, cultured under different conditions, on commercial smoked sausage formulated with and without potassium lactate-sodium diacetate. *Food Microbiology*, 23, 762-771.
- Geornaras, I., P.N. Skandamis, K.E. Belk, J.A. Scanga, P.A. Kendall, G.C. Smith, J.N. Sofos. 2006b. Postprocess control of *Listeria monocytogenes* on commercial frankfurters formulated with and without antimicrobials and stored at 10°C. *Journal of Food Protection*, 69, 53-61.
- Giannou, E., Kakouri, A., Bogovic, B., Pogelj, I, Samelis, J., 2009. Fate of *Listeria monocytogenes* on Fully Ripened Greek Graviera Cheese Stored at 4 , 12 , or 25oC in Air or Vacuum Packages: In Situ PCR Detection of a Cocktail of Bacteriocins Potentially Contributing to Pathogen Inhibition, *Journal of Food Protection*, 72(3), 531–538.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J.E., 2005. Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on stainless steel surfaces as

- indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. *Journal of Food Protection*, 68, 2149-2154.
- Gilbreth, S.E., J.E. Call, F.M. Wallace, V.N. Scott, Y. Chen, J.B. Luchansky, 2005. Relatedness of *Listeria monocytogenes* Isolates Recovered from Selected Ready-To-Eat Foods and Listeriosis Patients in the United State, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8115–8122.
- Gobbetti, M., Angelis, M. De, Cagno, R. Di, Minervini, F., Limitone, A., 2007. Cell – cell communication in food related bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 120, 34–45.
- Goodson, M., and R.J., Rowbury, 1989. Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sub-lethal acid pH value. *Letters of Applied Microbiology*, 8, 77-79.
- Gougouli, M., Angelidis, A.S., Koutsoumanis, K., 2008. A study on the kinetic behavior of *Listeria monocytogenes* in ice cream stored under static and dynamic chilling and freezing conditions. *Journal of dairy science*, 91(2), 523–30.
- Goulter, R.M., Dykes, G.A., Small, A., 2008. Decontamination of knives used in meat industry: effect of different water temperature and treatment time combinations on reduction of bacterial numbers on knife surfaces. *Journal of Food Protection* 71(7), 1338-1342.
- Gounadaki, A.S., P.N. Skandamis, E. H. Drosinos, G.-J. E. Nychas, 2008. Microbial ecology of food contact surfaces and products of small-scale facilities producing traditional sausages, *Food Microbiology*, 25, 313–323.
- Gram, L., D. Bagge-Ravn, Y. Y. Ng, P. Gyomoese, B. F. Vogel, 2007. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 1165-1171.
- Graves, L.M., and Swaminathan, B., 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 55–62.
- Greenacre, E.J., and Brocklehurst, T.F., 2006. The acetic acid tolerance response induces cross-protection to salt stress in *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 62-65.
- Guerra, M.M., J. McLauchlin, F. A. Bernardo, 2001. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. *Food Microbiology*, 18, 423-429.
- Guerrieri, E., Niederhäusern, S. De, Messi, P., Sabia, C., Iseppi, R., Anacarso, I., 2009. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. *Food Control*, 20(9), 861–865.

- Guillier, L., Stahl, V., Hezard, B., Notz, E., Briandet, R., 2008. Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *International journal of food microbiology*, 128(1), 51–57.
- Gyseman, K.P.M., K. Bernaerts, A. Vermeulen, A.H. Geeraerd, J. Debevere, F. Devlieghere, Van Impe, J.F., 2007. Exploring the performance of logistic regression model types on growth/no growth data of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 316–331.
- Hain, T., Chatterjee, S.S., Ghai, R., Tobias, C., Steinweg, C., Domann, E., Ka, U., 2007. Pathogenomics of *Listeria* spp., *International Journal of Medical Microbiology*, 297, 541–557.
- Hain, T., Steinweg, C., Chakraborty, T., 2006. Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. *Journal of Biotechnology*, 126(1), 37–51.
- Harakeh, S., Saleh, I., Zouhairi, O., Baydoun, E., Barbour, E., Alwan, N., 2009. Science of the Total Environment Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. *Science of the Total Environment*, 407(13), 4022–4027.
- Harvey, J., and A. Gilmour. 1992. Occurrence of *Listeria* species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland. *Journal of Applied Microbiology*, 72, 119-25.
- Herrera, J.J.R., M.L. Cabo, A. Gonzalez, I. Pazos, L. Pastoriza, 2007. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food Microbiology*, 24, 585-591.
- Hill, C., P.D. Cotter, R.D. Sleator, C.G.M. Gahan. 2002. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *International Dairy Journal*, 12, 273-283.
- Hof, H., 2003. History and epidemiology of listeriosis, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35, 199-202.
- Holah, J.T., J.H. Taylor, D.J. Dawson, K.E. Hall. 2002. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Symposium series (Society for Applied Microbiology)*, 111S-20S.
- Hood, S.K., and Zottola, E.A., 1997. Isolation and identification of adherent gram-negative microorganisms from four meat processing facilities. *Journal of Food Protection*, 60, 1135–138.
- Hunt, S.M., E.M. Werner, B. Huang, M.A. Hamilton, and P.S. Stewart. 2004. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7418-7425.
- Hwang, C.-A. 2009. The probability of growth of *Listeria monocytogenes* in cooked salmon and tryptic soy broth as affected by salt, smoke compound, and storage temperature. *Food Microbiology*, 26, 253-8.

- IDF. 1982. Cheese & processed cheese. Determination of the total solid content. Standard 4A. Brussels. International Dairy Federation.
- IDF. 1985. Milk and milk products. Guidance on sampling. Standard 50B. Brussels. International Dairy Federation.
- IDF. 1987. Milk, cream & evaporated milk. Determination of total solids content. Standard 21B. Brussels. International Dairy Federation.
- IDF. 1992. Milk and milk products: preparation of samples and dilutions for microbiological examination. Standard 122B. Brussels. International Dairy Federation.
- Irlinger, F. and J. Mounier, 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety, *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 142–148.
- Irlinger, F., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci, *International Journal of Food Microbiology*, 126, 302–310.
- Jacquet, C., Rocourt J., A. Reynaud, 1993. Study of *Listeria monocytogenes* contamination in a dairy plant and characterization of the strains isolated, *International Journal of Food Microbiology*, 20, 13–22.
- Jacxsens L., J. Kussaga, P.A. Luning, M. Van der Spiegel, F. Devlieghere, M. Uyttendaele, 2009. A Microbial Assessment Scheme to measure microbial performance of Food Safety Management Systems, *International Journal of Food Microbiology*, 134, 113–125.
- Jakobsen R.A., Heggebø, R., Bekvik, E., Skjervheim, M., 2011. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. *Food Microbiology*, 28(3), 492–496.
- Jamali, H., B. Radmehr, K.L. Thong, 2013. Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks, *Food Control*, 34, 121-125.
- Jones, J.E., and Walker, S.J., 1993. Advances in modeling microbial growth. *Journal of Industrial Microbiology*, 12, 200-205.
- Jullien, C., T. Benezech, C.L. Gentil, L. Boulange-Petermann, L., P.E. Dubois, J.P. Tissier, M. Traisnel, C. Faille, 2008. Physico-chemical and hygienic property modifications of stainless steel surfaces induced by conditioning with food and detergent. *Biofouling* 24, 163-172.
- Kadam, S. R., den Besten, H. M. W., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *International journal of food microbiology*, 165(3), 259–264.

- Kagkli, D.M., Iliopoulos, V., Stergiou, V., Lazaridou, A., Nychas, G.J., 2009. Differential *Listeria monocytogenes* Strain survival and growth in katiki, a traditional greek soft cheese, at different storage temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 3621-3626.
- Kathariou, S., 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity , a food safety prespective, *Journal of Food Protection*, 65(11), 1811–1829.
- Katsikogianni, M., and Y.F. Missirlis. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur. Cells Materials*, 8, 37-57.
- Kells, J., and Gilmour, A., 2004. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation, *International Journal of Food Microbiology*, 91, 167–174.
- Keskinen, L.A., Todd, E.C.D., Ryser, E.T., 2008. Impact of bacterial stress and biofilm-forming ability on transfer of surface-dried *Listeria monocytogenes* during slicing of delicatessen meats. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 298-304.
- Kjelleberg, S., Molin, S., 2002. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Current Opinion in Microbiology*, 5, 254-258.
- Ko, R., L.T. Smith, G.M. Smith, 1994. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 176, 426-431.
- Koseki, S., 2009. Microbial Responses Viewer (MRV): a new ComBase-derived database of microbial responses to food environments. *International journal of food microbiology*, 134(1-2), 75–82.
- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., Drosinos, E. H., 2010. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, 21(6), 805–815.
- Koutsoumanis K.P., 2008. A study on the variability in the growth limits of individual cells and its effect on the behavior of microbial populations. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 116-121.
- Koutsoumanis K.P., and Sofos J.N., 2005. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and a_w limits of growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 83-91.
- Koutsoumanis K.P., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2004. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and a_w when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology*, 21, 415-422.
- Koutsoumanis, K., Pavlis, A., Nychas, G.-J. E., Xanthiakos, K., 2010. Probabilistic model for *Listeria monocytogenes* growth during distribution, retail storage, and domestic storage of pasteurized milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2181–91.

- Kozak, J., Balmer, T., Byrne, R., Fisher, K., 1996. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products, *Food Control*, 415, 215–221.
- Kraiss, J.B.R., 2008. *Listeria* regulations in the FDA and USDA: Implications for dual-jurisdiction facilities, found at: http://www.iflr.msu.edu/uploads/files/109/Student%20Papers/Janet%20B.%20Rowat%20Kraiss_ListeriaRegulationsFDAandUSDA.pdf
- Kroll, R.G., and R.A. Patchett, 1992. Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Letters of Applied Microbiology*, 14, 224-227.
- Kuchma, S.L., and G.A. O'Toole, 2000. Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 429-433.
- Kumar, C.G., and Anand, S.K., 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review, *International Journal of Food Microbiology*, 42, 9–27.
- Langsrud, S., Singh, M., Heir, E., Holck, A.L., 2003. Bacterial disinfectant resistance — a challenge for the food industry. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51, 283–290.
- Latorre, A.A., Kessel, J.A.S. Van, Jeffrey, S., Zurakowski, M.J., Pradhan, A.K., Ruth, N., Boor, K.J., 2009. Molecular Ecology of *Listeria monocytogenes*: Evidence for a Reservoir in Milking Equipment on a Dairy Farm. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1315-1323.
- Le Marc, Y., Skandamis, P.N., Belessi, C.I.A., Merkouri, S.I., George, S.M., Gounadaki, A.S. Schwartzman, S., Jordan, K. Drosinos, E.H., Baranyi, J., 2010. Modeling the effect of abrupt acid and osmotic shifts within the growth region and across the growth boundaries on adaptation and growth of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 6555-6563.
- Le Marc, Y., V. Huchet, C.M. Bourgeois, J.P. Guyonnet, P. Mafart, D. Thuault. 2002. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 219- 237.
- Lebert, I., C. G. Dussap, A. Lebert, 2004. Effect of a_w , controlled by the addition of solutes or by water content, on the growth of *Listeria innocua* in broth and in a gelatine model. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 67-78.
- Ledenbach, L.H., and Marshall, R.T., 2009. Microbiological Spoilage of Dairy Products, in *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*, Food Microbiology and Food Safety, eds W.H. Sperber, M.P. Doyle, p. 41-67, Springer Science & Business Media, LLC 2009, USA

- Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 181–186.
- Leite, P., Rodrigues, R., Ferreira, M.A.S.S., Ribeiro, G., Jacquet, C., Martin, P., Brito, L., 2006. Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 111–121.
- Lemon, K.P., D.E. Higgins, R. Kolter, 2007. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189, 4418-4424.
- Lianou, A., and J.N. Sofos, 2007. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of Food Protection*, 70, 2172-98.
- Lianou, A., Stopforth, J.D., Yoon, Y., Wiedmann, M., Sofos, J.N., 2006. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. *Journal of Food Protection*, 69, 2640–2647.
- Lin, J., M. P. Smith, K. C. Chapin, H. B. Baik, G. N. Bennet, J. W. Foster, 1996. Mechanisms of acid resistance in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3094-3100.
- Lin, Y., and Chou, C., 2004. Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to other environmental stresses. *Food Microbiology*, 21, 605–610.
- Lindblad, M., and Lindqvist, R., 2009. Modelling time to growth of *Escherichia coli* as a function of water activity and undissociated lactic acid. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 308-313.
- Lindsay, D., and A. von Holy, 1997. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiology*, 14, 383-390.
- Litopoulou-Tzanetaki, E., and Tzanetakis, N., 2011. Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 17–32.
- Little, C.L., F.C. Taylor, S.K. Sagoo, I.A. Gillespie, K. Grant, J. McLauchlin, 2007. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetable salads in the UK. *Food Microbiology*, 24, 711-17.
- Little, C.L., Rhoades, J.R., Sagoo, S.K., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K., J. McLauchlin, 2008. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiology*, 25, 304–312.
- Liu, D., 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 645–59.

- Lomonaco, S., Decastelli, L., Nucera, D., Gallina, S., Manila, D., Civera, T., 2009. *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: Subtypes, diversity and persistence over time. *International Journal of Food Microbiology*, 128(3), 516–520.
- Loncarevic, S., M.L. Danielsson-Tham, W. Tham, 1995. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 245-50.
- Lou, Y., and Yousef, A.E., 1997. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1252– 1255.
- Lund B.M., T.C. Baird-Parker, G.W. Gould, 2000. *The microbiological safety and quality of food*. Aspen Publishers Inc, Gaithersberg, Maryland, USA, Vol 1, 164.
- Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S., Korkeala, H., 2003. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *L. monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology* 82, 265-272.
- Lundén, J., R. Tolvanen, H. Korkeala, 2004. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *Journal of Dairy Science* 87, E6-E11.
- Lundén, J.M., M.K. Miettinen, T.J. Autio, H.J. Korkeala, 2000. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *Journal of Food Protection*, 63, 1204-1207.
- Mai, T.L., and Conner, D.E., 2007. Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 282–286.
- Manios, S.G., Skiadaresis, A.G., Karavasilis, K., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N., 2009. Field Validation of Predictive Models for the Growth of Lactic Acid Bacteria in Acidic Cheese-Based Greek Appetizers. *Journal of Food Protection*, 72(1), 101–110.
- Manolopoulou E., P. Sarantinopoulos, E. Zoidou, A. Aktypis, E. Moschopoulou, I.G. Kandarakis, E.M. Anifantakis, 2003. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 153– 161.
- Marco, M.L., and M.H.J. Wells-Bennik, 2008. Impact of bacterial genomics on determining quality and safety in the dairy production chain, *International Dairy Journal*, 18, 486–495.
- Masana, M.O., and Baranyi, J., 2000. Growth/no growth interface of *Brochothrix thermosphacta* as a function of pH and water activity. *Food Microbiology*, 17, 485-493.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Siana, P., Skandamis, P., Metaxopoulos, I., 2006. Determination of the growth limits and kinetic behavior of *Listeria monocytogenes* in a sliced cooked cured meat

- product: validation of the predictive growth model under constant and dynamic temperature storage conditions. *Journal of Food Protection*, 69, 1312-1321.
- Mavropoulos, A.A. and Arvanitoyannis, I. S., 1999. Implementation of hazard analysis critical control point to Feta and Manouri cheese production lines. *Food Control*, 10, 213-219.
- McClure, P.J., A.L. Beaumont, J.P. Sutherland, T.A. Roberts, 1997. Predictive modelling of growth of *Listeria monocytogenes*. The effects on growth of NaCl, pH, storage temperature and NaNO₂. *International Journal of Food Microbiology*, 34, 221–232.
- McClure, P.J., Baranyi, J., Boogard, E., Kelly, T.M., Roberts, T.A., 1993. A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology*, 19, 161-178.
- McDonald, K., Sun, D.-W., 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 52, 1-27.
- McKellar, R.C., and Lu, X., 2004. Primary models. In: McKellar, R.C., Lu, X. (Eds.) *Modeling Microbial Responses in Foods*, CRC Press, Boca Raton, Chapter 2, 21-62.
- McLauchlin, J., 1987. *Listeria monocytogenes* recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *Journal of Applied Bacteriology*, 63, 1-11.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., Jewell, K., 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 15– 33.
- McMeekin, T.A., and Ross, T., 2002. Predictive microbiology: providing a knowledge based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 133–153.
- McMeekin, T.A., Baranyi, J., Bowman, J., Dalgaard, P., Kirk, M., Ross, T., Schmid, S., Zwietering, M.H., 2006. Information systems in food safety management. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 181–194.
- McMeekin, T.A., Chandler, R.E., Doe, P.E., Garland, C.D., Olley, J., Putro, S., Ratkowsky, D.A., 1987. Model for combined effect of temperature and salt concentration /water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 62, 543–550.
- McMeekin, T.A., K. Presser, D. Ratkowsky, T. Ross, M. Salter, S. Tienungoon, 2000. Quantifying the hurdle concept by modeling the bacterial growth/no growth interface. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 93–98.
- McMeekin, T.A., Olley, J.N., Ross, T., Ratkowsky, D.A., 1993. *Predictive Microbiology*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.
- Mead, P.S., L. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Breese, C. Shapiro, P.M. Griffin, R.V. Tauxe, 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607-625.

- Medrala, D., W. Dabrowski, U. Czekajlo-Kolodziej, E. Daczowska-Kozon, A. Koronkiewicz, E. Augustynowicz, M. Manzano, 2003. Persistence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from products in a Polish fish-processing plant over a 1-year period. *Food Microbiology*, 20, 715-24.
- Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, C., Blom-hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., T. Else, D. Visser, P. Dalgaard, 2010. Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes* — An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 141(3), 137–150.
- Mejlholm, O., and P. Dalgaard, 2007. Modeling and predicting the growth boundary of *Listeria monocytogenes* in lightly preserved seafood. *Journal of Food Protection*, 70, 70-74.
- Meldrum, R. J., C. D. Ribeiro, R. M. M. Smith, A. M. Walker, M. Simmons, D. Worthington, C. Edwards, 2005. Microbiological quality of ready-to-eat foods: Results from a long-term surveillance program (1995 through 2003). *Journal of Food Protection*, 68, 1654–1658.
- Meldrum, R.J., T.F. Brocklehurst, D.R. Wilson, P.D.G. Wilson, 2003. The effects of cell immobilization, pH and sucrose on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at 10°C. *Food Microbiology*, 20, 97–103.
- Mellefont, L.A., and T. Ross, 2003. The effect of abrupt shifts in temperature on the lag phase duration of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 295-305.
- Mellefont, L.A., Mcmeekin, T.A., Ross, T., 2008. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 157–68.
- Mellefont, L.A., T.A. McMeekin, T. Ross, 2004. The effect of abrupt osmotic shifts on the lag phase duration of physiologically distinct populations of *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 111-120.
- Mellefont, L.A., T.A. McMeekin, T. Ross, 2005. Viable count estimates of lag time responses for *Salmonella typhimurium* M48 subjected to abrupt osmotic shifts. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 399-410.
- Mellfont, L.A., T.A. McMeekin, aT. Ross, 2003. The effect of abrupt osmotic shifts on the lag phase duration of foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 281-293.
- Membré, J.-M., T. Ross, T.A. McMeekin, 1998. Behaviour of *Listeria monocytogenes* under combined chilling processes. *Letters of Applied Microbiology*, 28, 216-220.
- Midelet, G., and B. Carpentier, 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4015-4024.

- Miettinen, H., and G. Wirtanen. 2005. Prevalence and location of *Listeria monocytogenes* in farmed rainbow trout. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 135-43.
- Millet, L., M. Saubusse, R. Didié, L. Tessier, M.C. Montel, 2006. Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses, *International Journal of Food Microbiology*, 108, 105 – 114.
- Mitchell, G.A., T.F. Brocklehurst, R. Parker, A.C. Smith, 1994. The effect of transient temperatures on the growth of *Salmonella typhimurium* LT2. I: cycling within the growth region. *Journal of Applied Microbiology*, 77, 113-119.
- Mitchell, G.A., T.F. Brocklehurst, R. Parker, A.C. Smith, 1995. The effect of transient temperatures on the growth of *Salmonella typhimurium* LT2. II: excursions outside the growth region. *Journal of Applied Microbiology*, 79, 128-134.
- Moltz, A.G., and Martin, S.E. 2005. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection*, 68, 92-97.
- Morgan, F., V. Bonnin, M.P. Mallereau, G. Perrin, 2001. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 217–221.
- Morisaki, H., and Tabuchi, H., 2009. Bacterial attachment over a wide range of ionic strengths. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1),51-5.
- Morton, L.H.G., Greenway, D.L.A., Gaylarde, C.C., Surman, S.B., 1998. Consideration of some implications of biocides to the resistance of biofilms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41, 247-259.
- Muñoz-Cuevas, M., P.S. Fernández, S. George, C. Pin, 2010. Modeling the lag period and exponential growth of *Listeria monocytogenes* under conditions of fluctuating temperature and water activity values. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 2908–2915.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, M.B.R., 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp), *Journal Of Pathology And Bacteriology*, 29 (4), 407-439.
- Møretrø, T., and Langsrud, S., 2004. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1, 107–121.
- Naïtali, M., Dubois-Brissonnet, F., Cuvelier, G., Bellon-Fontaine, M.-N., 2009. Effects of pH and oil-in-water emulsions on growth and physicochemical cell surface properties of *Listeria monocytogenes*: Impact on tolerance to the bactericidal activity of disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 101–107.

- Nolan, D.A., D.C. Chamblin, J.A.J Troller, 1991. Minimal water activity for growth of *Listeria monocytogenes* as affected by solute and temperature. *Journal of Food Microbiology*, 14, 333-337.
- Noriega, E., A. Laca, M. Diaz, 2008. Modelling of diffusion-limited growth for food safety in simulated cheeses. *Food and Bioproducts Processing*, 86, 122–129.
- Norwood, D.E., and A. Gilmour, 2001. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Letters of Applied Microbiology*, 33, 320-324.
- Nystrom, T. 2003. Nonculturable bacteria: programmed survival forms or cells at death's door? *BioEssays*, 25, 204–211.
- O.' Brien, M., Hunt, K., Mcsweeney, S., Jordan, K., 2009. Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese. *Food Microbiology*, 26(8), 910–914.
- Okutani, A., Y. Okada, S. Yamamoto, S. Igimi, 2004. Overview of *Listeria monocytogenes* Contamination in Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 131–40.
- Orndorff, P.E., Hamrick, T.S., Washington, I., Havell, E.A., 2006. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis, *Veterinary Microbiology*, 114, 1–15.
- Orsi R.H., H.C. den Bakker, M. Wiedmann, 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics, *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 79–96.
- Pak, S., Spahr, U., Jemmi, T., Salman, M.D., 2002. Risk factors for *L . monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland , 1990 ± 1999, *Preventive Veterinary Medicine*, 53, 55–65.
- Pan, Y., Breidt, Jr., F., Kathariou, S., 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7711–7717.
- Pan, Y., F. Breidt, Jr, Gorski, L., 2010. Synergistic Effects of Sodium Chloride , Glucose , and Temperature on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5): 1433-1441.
- Panagou, E.Z., and G.-J.E. Nychas, 2008. Dynamic Modeling of *Listeria monocytogenes* Growth in Pasteurized Vanilla Cream after Postprocessing Contamination. *Journal of Food Protection*, 71 (9), 1828–1834.
- Panagou, E.Z., G-J.E. Nychas, J.N. Sofos, 2013. Types of traditional Greek foods and their safety, *Food Control*, 29, 32-41.
- Papageorgiou, D. K., E. H. Marth, 1989. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of Feta cheese. *Journal of Food Protection*, 52, 82-87.

- Papageorgiou, D.K., Bori, M., Mantis, A., 1997. Survival of *Listeria monocytogenes* in Frozen Ewe's Milk and Feta Cheese Curd. *Journal of Food Protection*, 60(9), 1041–1045.
- Phan-Thanh, L., Mahouin, F., Alige, S., 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*, *International Journal of Food Microbiology*, 55, 121–126.
- Pin, C. and J. Baranyi, 1998. Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 59–72.
- Pin, C., Baranyi, J., deFernando, G., 2000. Predictive model for the growth of *Yersinia enterocolitica* under modified atmospheres, *Journal of Applied Microbiology*, 88, 521.
- Pine, L., Malcolm G.B., Brooks. J.B., Daneshvar M.I., 1989. Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 35, 245-254.
- Pinto M.S., A.F. de Carvalho, A.C. dos Santos Pires, J.C. J. de Paula, D. Sobral, F.A.R. Magalhaes, 2009. Survival of *Listeria innocua* in Minaw Traditional Serro cheese during ripening, *Food Control*, 20, 1167-1170.
- Poimenidou, S., C.A. Belessi, E.D. Giaouris, A.S. Gounadaki, G.J.E. Nychas, P.N. Skandamis, 2009. *Listeria monocytogenes* attachment to and detachment from stainless steel surfaces in a simulated dairy processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7182-88.
- Poirazi, P., F.Leroy, M.D. Georgalaki, A. Aktypis, L. De Vuyst, E. Tsakalidou, 2007. Use of Artificial Neural Networks and a Gamma-Concept-Based Approach To Model Growth of and Bacteriocin Production by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 under Simulated Conditions of Kasseri Cheese Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (3),768–776.
- Presser, K.A., Ross, T., Ratkowsky, D.A., 1998. Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration and water activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1773–1779.
- Pritchard, T. J., Flanders, K. J., & Donnelly, C. W. (1995). Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 375-384
- Psomas, A., and Skandamis, P., 2013. GroPIN tertiary model (<http://www.aua.gr/psomas/gropin/>).
- PURAC, 2007. Opti.Form *Listeria* control 2007 model. <http://www.purac.com/EN/Food/>
- Ratani, S., S. Siletzky, V. Dutta, S. Yildirim, J.A. Osborne, W. Lin, A.D. Hitchins, T.J. Ward, S. Kathariou, 2012. Heavy Metal and Disinfectant Resistance of *Listeria monocytogenes* from Foods and Food Processing Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19), 6938–6945.
- Ratkowsky, D.A., and T. Ross, 1995. Modelling the bacterial growth/no growth interface. *Letters of Applied Microbiology*, 20, 29-33.

- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A., 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*, 149, 1–5.
- Razavilar, V., and Genigeorgis, C., 1998. Prediction of *Listeria* spp. growth as affected by various levels of chemicals, pH, temperature and storage time in a model broth. *International Journal of Food Microbiology*, 40, 149-157.
- Reij, M.W., and Aantrekker, E.D. Den., 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 1–11.
- Ribeiro, M.H., Manha, S., Brito, L., 2006. The effects of salt and pH stress on the growth rates of persistent strains of *Listeria monocytogenes* collected from specific ecological niches. *Food Research International*, 39, 816–822.
- Rieu, A., Lemaître, J.-P., Guzzo, J., Piveteau, P., 2008. Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 76–82.
- Robinson T.P., M.J. Ocio, A. Kaloti, B.M. Mackey, 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 83-92.
- Robinson, T.P., O.O. Aboaba, A. Kaloti, M.J. Ocio, J. Baranyi, B.N. Mackey, 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 163-173.
- Rocourt, J. and Cossart, P., 1997. *Listeria monocytogenes*. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville, *Food microbiology fundamentals and frontiers* (pp. 352-337). Washington, DC: ASM Press
- Rodriguez, 2011. MicroHibro software, (Unpublished)
- Rogga, K.J., Samelis, J., Kakouri, A., Katsiari, M.C., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G., 2005. Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4 and 12°C. *International Dairy Journal*, 15, 59–67.
- Ross, T. and P. Dalgaard, 2004. Secondary models. In: McKellar, R.C., Lu, X. (ed.), *Modeling Microbial Responses in Foods*. CRC Press, Washington, D.C: 63-150
- Ross, T., and T.A. McMeekin, 1994. Predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 242-264.
- Rosso, L., J.R. Lobry, S. Bajard, J.P. Flandrois, 1995. Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 610–616.
- Ryser, E.T, and E. H. Marth, 1987. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Journal of Food Protection*, 50, 7-13.

- Salaün, F., B. Mietton, F. Gaucheron, 2005. Buffering capacity of dairy products. *International Dairy Journal*, 15, 95–109.
- Samelis, J., and J. Metaxopoulos, 1999. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. *Food Microbiology*, 16, 465-477.
- Samelis, J., Giannou, E., Lianou, A., 2009. Assuring Growth Inhibition of *Listerial* Contamination during Processing and Storage of Traditional Greek Graviera Cheese: Compliance with the New European Union Regulatory Criteria for *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 72(11), 2264–2271.
- Samelis, J., Kendall, P., Smith, G., Sofos, J.N., 2004. Acid tolerance of acid-adapted and nonadapted *Escherichia coli* O157:H7 following habituation (10oC) in fresh beef decontamination runoff fluids of different pH values. *Journal of Food Protection*, 67(4), 638-645.
- Samelis, J., Lianou, A., Kakouri, A., Delbes, C., Rogelj, I., Bogovic-Matijasic, B., Montel, M.C., 2008. Changes in the microbial composition of raw induced milk my thermization treatments applied prior to traditional greek hard cheese processing. *Journal of food protection*, 72, 783-790.
- Sandasi, M., Leonard, C.M., Viljoen, A.M., 2008. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 19, 1070–1075.
- Schlech, W.F., 1991. Listeriosis: epidemiology, virulence and the significance of contaminated foodstuffs-Lowbury lecture. *Journal of Hospital Infection*, 19, 211-224.
- Schoder, D., Skandamis, P., Wagner, M. 2013. Assessing in-house monitoring efficiency by tracing contamination rates in cheese lots recalled during an outbreak of listeriosis in Austria. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 353-358.
- Schoder, D., Melzner, D., Schmalwieser, Al., Zangana, Ab., Winter, P., Wagner, M., 2011. Important vectors for *Listeria monocytogenes* transmittion at farm dairies manufacturing fresh Sheep and goat cheese from raw milk , *Journal of Food Protection*, 74(6), 919-924.
- Schvartzman, M.S., Maffre, A., Tenenhaus-aziza, F., Sana, M., Butler, F., Jordan, K., 2011. Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurised or raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 145, S31–S38.
- Schvartzman, M.S., X. Belessi, F. Butler, P. Skandamis, K. Jordan, 2010. Comparison of growth limits of *Listeria monocytogenes* in milk, broth and cheese, *Journal of Applied Microbiology* 109, 1790–1799
- SCVMPH, 2001. European Commission document: opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health. The cleaning and disinfection of knives in the meat and

- poultry industry. Adopted on 20 to 21 June 2001. Available at: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out43_en.pdf. Accessed 10 July 2010.
- Sergelidis, D. and A. Abraham, 2009. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety, *Food Control*, 20, 1–10.
- Shabala, L., Budde, B., Ross, T., Siegumfeldt, H., McMeekin, T., 2002. Responses of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability monitored by measurements of intracellular pH and viable counts. *International Journal of Food Microbiology*, 75 (1–2), 89–97.
- Shabala, L., S.H. Lee, P. Cannesson, T. Ross, 2008. Acid and NaCl limits of growth of *Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levels on inactivation kinetics. *Journal of Food Protection*, 71, 1169-1177.
- Shank, F.R., Elliot, E.L., Wachsmuth, I.K., Losikoff, M.E., 1996. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Control*, 7, 229–234.
- Sharma, M., & Anand, S. K. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food / dairy processing industry – a case, *Food Control* 13: 469–477.
- Shi X. and X. Zhu, 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, xx, 1-7.
- Shimoni, E. and Labuza, T.P., Modeling pathogen growth in meat products: future challenges, *Trends in Food Science & Technology*, 11, 394, 2000.
- Siafaras, G., Hatzikamari, M., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., 2008. Antibacterial activities of the surface microflora of Kefalograviera cheese. *Food Control*, 19(9), 898–905.
- Silva, I.M.M., Almeida, R.C.C., Alves, M.A.O., Almeida, P.F., 2003. Occurrence of *Listeria spp.* in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 241– 248.
- Silva, S., P. Teixeira, R. Oliveira, J. Azeredo. 2008. Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 71, 1379-1385.
- Simpson, C.A., Geornaras, I., Yoon, Y., Scanga, J.A., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2008. Effect of inoculum preparation procedure and storage time and temperature on the fate of *Listeria monocytogenes* on inoculated salami. *Journal of Food Protection*, 71, 494-501.
- Skandamis, P.N., Stopforth, J.D., Ashton, L.V., Geornaras, I., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2009. *Escherichia coli* O157:H7 survival, biofilm formation and acid tolerance under simulated slaughter plant moist and dry conditions. *Food Microbiology*, 26, 12–119.
- Skandamis, P.N., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., Belk, K.E., Scanga, J.A., Smith, G.C., Sofos, J.N., 2007. Modeling the effect of inoculums size and acid adaptation on growth/no growth interface of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 237-249.

- Skandamis, P.N., Stopforth, J.D., Yoon, Y., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2009. Heat and Acid Tolerance Responses of *Listeria monocytogenes* as Affected by Sequential Exposure to Hurdles during Growth, *Journal of Food Protection* , 72(7), 1412–1418.
- Skandamis, P.N., Yoon, Y., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses, *Food Microbiology* 25, 294–303.
- Sofos, J.N., and Geornaras, I., 2010. Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157: H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat , meat products. *Meat Science*, 86(1), 2–14.
- Somers, E.B., and Lee Wong, A.C., 2004. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of Ready-to-Eat meat residue. *Journal of Food Protection*, 67(10), 2218–2229.
- Soultos, N., P. Koidis, and R.H. Madden, 2003. Presence of *Listeria* and *Salmonella* spp. in retail chicken in Northern Ireland. *Letters of Applied Microbiology*, 37, 421-3.
- SSSP, 2009. Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP) software version 3.1 from august 2009, <http://sssp.dtuqua.dk> accessed in October 2009.
- Standard, BS 770 (Part 2), 1976. Methods for chemical analysis of cheese. Determination of pH.
- Stopforth J.D., Samelis J., Sofos J.N., Kendall P.A., Smith G.C., 2002. Biofilm formation by acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* in fresh beef decontamination washings and its subsequent inactivation with sanitizers. *Journal of Food Protection*, 65, 1717-1727.
- Stopforth, J.D., Yoon, Y., Barmpalia, I.M., Samelis, J., Skandamis, P.N., Sofos, J.N., 2005. Reduction of *Listeria monocytogenes* populations during exposure to a simulated gastric fluid following storage of inoculated frankfurters formulated and treated with preservatives. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 309– 319.
- Sulzer, G., and Busse, M., 1991. Growth inhibition of *Listeria* spp. on camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. *International Journal of Food Microbiology*, 14, 287–296.
- Sutherland, J.P., Bayliss, A.J., Braxton, D.S., 1995. Predictive modelling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology*, 25, 29–49.
- Sutherland, J.P., Bayliss, A.J., Braxton, D.S., Beaumont, A.L., 1997. Predictive modelling of *Escherichia coli* O157-H7-inclusion of carbon dioxide as a fourth factor in a pre-existing model. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 113–120.
- Swaminathan, B., and P. Gerner-Smidt, 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infection*, 9, 1236-43.

- Swinnen I.A.M., K. Bernaerts, K. Gysemans, J.F. Van Impe, 2005. Quantifying microbial lag phenomena due to a sudden rise in temperature: a systematic macroscopic study. *International Journal of Food Microbiology*, 100, 85-96.
- Swinnen, I.A.M., K. Bernaerts, J.F. Van Impe, 2006. Modelling the work to be done by *Escherichia coli* to adapt to sudden temperature upshifts. *Letters of Applied Microbiology*, 42, 507-513.
- Taormina, P.J., and Dorsa, W.J., 2007. Evaluation of hot-water and sanitizer dip treatments of knives contaminated with bacteria and meat residue. *Journal of Food Protection*, 70(3), 648–654.
- Thévenot, D., M. L. Delignette-Muller, S. Christieans, C. Verzozy-Rozand. 2005. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 85-94.
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A., McMeekin, T.A., Ross, T., 2000. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4979–4987.
- Tiganitas A., Zeaki N., Gounadaki A.S., Drosinos E.H., Skandamis, P.N., 2009. Study of the effect of lethal & sublethal pH and a_w stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology* 134, 104-112.
- Todhanakasem, T., and G.M. Young, 2008. Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. *Journal of Bacteriology*, 190, 6030–6034.
- Tremoulet, F., O. Duche, A. Namane, B. Martinie, The European *Listeria* genome consortium, J.C. Labadie, 2002. Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 210, 25-31.
- Tresse, O., K. Shanon, A. Pinon, P. Malle, M. Vialette, G. Midelet-Bourdin, 2007. Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food-processing facilities and clinical cases to inert surfaces. *Journal of Food Protection*, 70, 1569-1578.
- Trystram G., 2012. Modelling of food and food processes. *Journal of Food Engineering*, 110, 269-277.
- U.S. Food and Drug Administrator (FDA)/U.S. Department of Agriculture (USDA)/Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2003. Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Available from: <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>.
- USDA, 2003. Pathogen Modelling Program, Version 7.0. U.S. Dept. of Agriculture, A.R.S., Eastern Regional research Center.
- Uyen, H.M., Van Der Mei, H.C., Weerkamp, A.H., Busscher, H.J., 1988. Comparison between the adhesion to solid substrata of *Streptococcus mitis* and that of polystyrene particles. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(3), 837-838 .

- Waak, E., and Tham, W., 2002. Prevalence and Fingerprinting of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Raw Whole Milk in Farm Bulk Tanks and in Dairy Plant Receiving Tanks. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (7), 3366–3370
- Valero A., E. Carrasco, R. Pérez-Rodríguez, R.M. García-Gimeno, G. Zurera. 2006. Growth/no growth model of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, citric acid and ascorbic acid. *European Food Res Technology*, 224, 91-100
- Walls, I., and Buchanan, R.L., 2005. Use of food safety objectives as a tool for reducing foodborne listeriosis. *Food Control*, 16, 795–799.
- Van der Veen, S, Moezelaar, R., Abee, T., Wells-Bennik, M.H.J., 2008. The growth limits of a large number of *Listeria monocytogenes* strains at combinations of stress show serotype-and niche-specific traits. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1246-1258.
- Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Martens, T., De Baerdemaeker, J., Vandewalle, J., 1992. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2901–2909.
- Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C.E.R., Rees, C.E.D., Waites W.M., 2000. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 860-863.
- Vermeulen A., Gysemans K.P.M., Bermaerts K., Geeraerd A.H., Van Impe J.F., Debevere J., Devlieghere, F., 2007b. Influence of pH, water activity and acetic acid concentration on *Listeria monocytogenes* at 7°C: Data collection for the development of a growth/no growth model. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 332-341.
- Vermeulen, A., Devlieghere, F., Bernaerts, K., Van Impe, J., and Debevere, J., 2007a. Growth/no growth models describing the influence of pH, lactic and acetic acid on lactic acid bacteria developed to determine the stability of acidified sources. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 258-269.
- Whiting, R.C., and Buchanan, R.L., 1993. A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiology*, 10, 175–177.
- Whiting, R.C., and L.G. Bagi. 2002. Modelling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 291-295.
- Whiting, R.C., and Oriente, J.C., 1997. Time-to-turbidity model for non-proteolytic type B *Clostridium botulinum*. *International Journal of Food Microbiology*, 35, 49-60.
- Wijtzes, T., Rombouts, F.M., Kant-Muermans, M.L.T., Van't Riet, K., Zwietering, M.H., 2001. Development and validation of a combined temperature, water activity, pH model for bacterial growth rate of *Lactobacillus curvatus*. *International Journal of Food Microbiology*, 63, 57-64.

- Vilar, M.J., E. Yus, M.L. Sanjuan, F.J. Dieguez, J.L. Rodriguez-Otero, 2007. Prevalence of and Risk Factors for *Listeria* Species on Dairy Farms. *Journal of Dairy Science*, 90, 5083–5088.
- Wilks, S.A., Michels, H.T., Keevil, C.W., 2006. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: Implications for cross-contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 93–98.
- Wong, H.C., and P. Wang. 2004. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 359–366.
- Xanthiakos, K., Simos, D., Angelidis, A. S., Nychas, G. J., Koutsoumanis, K., 2006. Dynamic modeling of *Listeria monocytogenes* growth in pasteurized milk. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1289–1298.
- Yousef, A.E. and P.D. Courtney, 2003. Basics in Stress Adaptation and Implications in New-Generation Food in *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*, edit. Yousef A.E. and V.K. Juneja, CRC Press, Boca Raton, FL, USA
- Zhao, T., M. P. Doyle, P. Zhao, 2004. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3996-4003.
- Zuliani, V., I. Lebert, J.-C. Augustin, P.Garry, J.-L. Vendeuvre, A. Lebert, 2007. Modeling the behaviour of *Listeria monocytogenes* in ground pork as a function of pH, water activity, nature and concentration of organic acid salts. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 536-550.
- Zwietering, M.H., J.C. De Wit, H.G.A.M. Cuppers, K. Van't Riet, 1994. Modeling of bacterial growth with shifts in temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 204-213.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K., 1990. Modelling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1875–1881.
- Zwietering, M.H., Rombouts, F.M., Van't Riet, K., 1993. Some aspects of modelling microbial quality of food. *Food Control*, 4, 89–96.
- Zwietering, M.H., Wijtzes, T., De Wit, J.C., Van't Riet, K., 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection*, 55, 973–979.
- Ανυφαντάκης, Ε.Μ., 1993. Τυροκομία, Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα-Πειραιάς
- Γκιαούρης, Ε.Δ., 2008, Μελέτη των παραγόντων που επιδρούν στο σχηματισμό των βιοϋμενίων από μικροοργανισμούς των τροφίμων, Διδακτορική Μελέτη, Εργ. Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- ΕΚ 1441/2007, Κανονισμός (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, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, L 322/12.

ΕΦΕΤ (Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων). Γενικός Οδηγός για την Εφαρμογή Συστήματος Βάσει των Αρχών του HACCP σε Μικρές Γαλακτοκομικές Επιχειρήσεις, Αθήνα, 2012

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 852/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29ης Απριλίου 2004 για την υγιεινή των τροφίμων.

Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων, 2012. <http://www2.keelrno.gr/blog/?p=3058>

Κώδικας τροφίμων και ποτών και αντικειμένων κοινής χρήσης, 1998, Τυροκομικά προϊόντα σελ. 559 (Φέτα σελ. 621 και Γραβιέρα Κρήτης σελ. 586), Μέρος Α, τόμος 2, Γενικό Χημείο του Κράτους, Εθνικό Τυπογραφείο, Αθήνα, Ελλάδα.

Σαμούρης Γ. 2008. Οδηγίες υγιεινής ενός μικρού τυροκομείου. ΕΘΙΑΓΕ, Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης (Πρόγραμμα INTEREG IIIB, ARCHIMED) Εκδόσεις ΕΘΙΑΓΕ, 34: 20-25

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Δημοσιεύσεις:

1. **Belessi**, C. I. A., S. Papanikolaou, E. H. Drosinos, P. N. Skandamis, **2008**.
Survival and acid resistance of *Listeria innocua* in feta cheese and yoghurt, in the presence or absence of fungi. *Journal of Food Protection* 71, 742–749.
2. Poimenidou, S., **Belessi**, C.A., Giaouris, E.D., Gounadaki, A.S., Nychas, G.-J.E., Skandamis, P.N., **2009**.
Listeria monocytogenes attachment to and detachment from stainless steel surfaces in a simulated dairy processing environment. *Applied and Environmental Microbiology* 75(22), 7182–7188.
3. Schwartzman MS, **Belessi** X, Butler F, Skandamis P, Jordan K., **2010**.
Comparison of growth limits of *Listeria monocytogenes* in milk, broth and cheese. *Journal of Applied Microbiology* 109(5), 1790-9
4. Le Marc Y, Skandamis PN, **Belessi** CI, Merkouri SI, George SM, Gounadaki AS, Schwartzman S, Jordan K, Drosinos EH, Baranyi J. **2010**.
Modeling the effect of abrupt acid and osmotic shifts within the growth region and across growth boundaries on adaptation and growth of *Listeria monocytogenes*. *Applied Environmental Microbiology* 76(19), 6555-6563.
5. **Belessi** CI, Le Marc Y, Merkouri SI, Gounadaki AS, Schwartzman S, Jordan K, Drosinos EH, Skandamis PN, **2011**.
Adaptive growth responses of *Listeria monocytogenes* to acid and osmotic shifts above and across the growth boundaries. *Journal of Food Protection*, 74(1), 78-85.
6. **Belessi** CE, A.S. Gounadaki, A. Psomas, P.N. Skandamis, **2011**.
Efficiency of different disinfection methods on *Listeria monocytogenes* biofilm formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 546-52.
7. **Belessi** CE, Gounadaki AS, Schwartzman S, Jordan K, Skandamis PN, **2011**.
Evaluation of growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* growing on stainless steel surfaces, detached from biofilms or in suspension, in response to pH and NaCl. *International Journal of Food Microbiology* 145, 553-60
8. Schwartzman MS, **Belessi** C, Butler F, Skandamis PN, Jordan KN. **2011**
Effect of pH and water activity on the growth limits of *Listeria monocytogenes* in a cheese matrix at two contamination levels. *Journal of Food Protection*, 74(11), 1805-13.

Ανακοινώσεις και Αναρτήσεις σε Ελληνικά Συνέδρια:

1. **Μπέλεση** Χ.-Ε., Δροσινός Ε.Χ., Σκανδάμης Π.Ν., Μελέτη και πρόβλεψη της επιβίωσης-ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Listeria innocua* σε μυζήθρα, Φέτα, και γιαούρτι σε συνδυασμό με την παρουσία μυκήτων, **1^{ος} Διεθνής Διαγωνισμός Ιδρύματος Αριστείδης Δασκαλόπουλος, 2006** (Ανακοίνωση)- **5^η θέση**
2. Π. Ν. Σκανδάμης, Χ-Ε **Μπέλεση**, Σ. Ποιμενίδου, Γ.-Γ. Ε. Νυχάς, Μελέτη της προσκόλλησης, σχηματισμού και αποκόλλησης των βιοϋμενίων *L. monocytogenes* και της αποτελεσματικότητας των απολυμαντικών στην απομάκρυνσή τους από επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα υπό διαφορετικές συνθήκες βιομηχανικής πρακτικής, **2^{ος} Διεθνής Διαγωνισμός Ιδρύματος Αριστείδης Δασκαλόπουλος, 2008** (Ανάρτηση)
3. **Μπέλεση** Χαραλαμπία-Ειρήνη, Σοφία Πούχα, Έλενα Σταυροπούλου και Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης, Έλεγχος της μικροβιακής κατάστασης των Ελληνικών τυροκομείων μεσαίας κλίμακας, **3^ο Συνέδριο Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Ρέθυμνο, 2009** (Ανακοίνωση)
4. **Μπέλεση** Χαραλαμπία-Ειρήνη, Σοφία Μερκούρη, Αντωνία Σ. Γουναδάκη, Sol Schwartzman, Kieran Jordan, Ελευθέριος Χ. Δροσινός και Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης, Μοντελοποίηση της επίδρασης μεταφοράς στο διαστήμα προσαρμογής και την ταχύτητα αύξησης του παθογόνου *Listeria monocytogenes* κατά τη μεταφορά του από συνθηκές αύξησης, σε συνθηκές μη αύξησης και το αντίθετο, **3^ο Συνέδριο Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Ρέθυμνο, 2009** (Ανάρτηση)
5. Αραπάκη Σόνια, Χαραλαμπία-Ειρήνη **Μπέλεση**, Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης, Επίδραση της φυσιολογίας του παθογόνου *Listeria monocytogenes* στη συμπεριφορά του κατά την παραγωγή και ωρίμαση Φέτας και Γραβιέρας, **ΔΕΔΥΤ 2010** (Ανάρτηση)
6. **Μπέλεση** Χαραλαμπία-Ειρήνη, Σοφία Μερκούρη, Αντωνία Σ. Γουναδάκη, Sol Schwartzman, Kieran Jordan, Ελευθέριος Χ. Δροσινός και Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης, Μοντελοποίηση της κατεύθυνσης και του εύρους μεταβολών στην οξύτητα και την ενεργότητα ύδατος εντός και εκτός της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης του παθογόνου *Listeria monocytogenes* στην προσαρμοστικότητα και μετέπειτα ανάπτυξη αυτού, **ΔΕΔΥΤ 2010** (Ανακοίνωση)-**1^η θέση στο διαγωνισμό των ανακοινώσεων**

Ανακοινώσεις και Αναρτήσεις σε Διεθνή Συνέδρια:

1. **Belessi H.**, Drosinos E.H., Skandamis P.N., Predictive modeling of the survival-growth of *Listeria innocua* on Myzithra, Feta and yoghurt in the presence of fungi. **Food Micro, 2006** (Ανάρτηση)
2. Schwartzman M.S., **Belessi X.**, Butler F., Skandamis P. and Jordan K., Modelling the Effect of pH, Water Activity and Contamination Levels on the Probability of Growth of *Listeria monocytogenes* at the early stages of Cheesemaking **Food Micro 2008** (Ανάρτηση)
3. S. Poimenidou, V. Satmari, C. **Belessi**, E.H. Drosinos and P.N. Skandamis, Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on food soiled stainless steel surfaces and resistance to sanitizers under conditions simulating food processing, **Food Micro 2008** (Ανακοίνωση)
4. C.-I. A. **Belessi**, Y. Le Marc, S. I. Merkouri, A. S. Gounadaki, S. Schwartzman, K. Jordan, E. H. Drosinos, and P.N. Skandamis, Studies on the effect of osmotic up or down shifts on the lag phase and growth rate of *L. monocytogenes* **6th International Conference on Predictive Modelling of Foods, 2009** (Ανακοίνωση)
5. C. **Belessi**, A. Gounadaki, S.Schwartzman, K. Jordan, and P.N. Skandamis, Comparative evaluation of growth/no growth interface of *L. monocytogenes* growing on stainless steel surfaces or in suspension, in response to pH and NaCl, **6th International Conference on Predictive Modelling of Foods 2009** (Ανακοίνωση)
6. Charalampia-Irini A. **Belessi**, Antonia S. Gounadaki, Sonia Arapaki, Sol Schwartzman, Kieran Jordan, and Panagiotis N. Skandamis, Comparative evaluation of two types of *Listeria monocytogenes* inocula: suspended or detached from stainless steel surfaces on its growth/no growth interface or survival during cheese manufacturing **International Symposium On Problems Of Listeriosis, 2010** (Ανάρτηση)
7. Charalambia-Irini A. **Belessi**, Sonia Arapaki and Panagiotis N. Skandamis Effect of Inoculum History on the Survival and Growth of *Listeria monocytogenes* in Soft, Semi-hard and Hard Cheese, **Food Micro, 2010** (Ανάρτηση)
8. Παρουσιάσεις των παραδοτέων στα General Meetings του Ευρωπαϊκού προγράμματος **BIOTRACER: Improved bio-traceability of unintended microorganisms and their substances in food and feed chains, 2007-2010**

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ- ΟΡΟΛΟΓΙΑ

HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points-Ανάλυση επικινδυνότητας και κρίσιμων σημείων ελέγχου
QMRA	Quantitative Microbiological Risk Assessment-Ποσοτική μικροβιολογία εκτίμησης κινδύνου
ISO	International Standardization Organization-Διεθνής οργανισμός τυποποίησης
PCR	Polymerase chain reaction- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis-Ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
OMX	Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα
a_w	Ενεργότητας Ύδατος
A/MA	Αυξηση/Μη Αυξηση (μεσεπιφάνεια)
BK	Βιουμενικά Κύτταρα
AK	Αποκολλημένα Κύτταρα
PK	Πλαγκτονικά Κύτταρα
AX	Ανοξειδωτος Χάλυβας
Κουπόνια	Επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα
ANOVA	Analysis of Variance-Ανάλυση παραμέτρων
VBNC	Viable But NonCulturable-Βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα
EPS	Εξωπολυσακχαρίτης
QAC	Quaternary Ammonium Compound-Τεταρτοταγείς ενώσεις του αμμωνίου
PAA	Peracetic acid-Υπεροξικού οξέος
OA	Οξεοανθεκτικά Κύτταρα
MO	Μη Οξεοανθεκτικά Κύτταρα
Cl ⁻	Ιόντα Χλωρίου
HCl	Hydrochloric acid-Υδροχλωρικό οξύ
NaCl	Sodium Chloride-Χλωριούχο Νάτριο
NaOH	Sodium Hydroxide-Καυστικό Νάτριο
OLRM	Ordinary Logistic Regression Model-πολυωνυμικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης
NLRM	Nonlinear Logistic Regression Model-μη γραμμικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης
P_{in}	Πιθανότητα έναρξης ανάπτυξης ενός κυττάρου
CN	Αριθμός των απαιτούμενων κυττάρων για την έναρξης ανάπτυξης

P_{max}	υψηλότερη πιθανότητα της έναρξης ανάπτυξης ενός κυττάρου
t_{aw}	χρόνος για πιθανότητα ανάπτυξης ίση με $P_{max}/2$
MPN	Most Probable Number-Πιο πιθανοί αριθμοί
gdw	gram of dry weight-γραμμάρια επί ξηρό
μ_{max}	Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης
Lag ή λ	Φάση προσαρμογής
t_{lag}	Χρόνος προσαρμογής
y_o	Κατώτερη ασύμπτωτη
y_{end}	Ανώτερη ασύμπτωτη
Q	Ποσοτικοποίηση της φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων
h_o	Εργο προσαρμογής
ν	Ταχύτητα προσαρμογής
Δa_w	Μεταβολή της ενεργότητας ύδατος
ΔpH	Μεταβολή του pH
CPM	Cardinal Parameters Model-Μοντέλο θεμελιωδών παραμέτρων
TSBYE	Tryptic Soy Broth Yeast Extract
TSAYE	Tryptic Soy Agar Yeast Extract
MRD	Maximum Recovery Diluent
ALOA	<i>Listeria</i> Agar acc to Ottaviani and Agosti
BPW	Buffered Peptone Water
PCA	Plate Count Agar
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe
VRBG	Violet Red Bile Glucose Agar
YGC	Yeast Glucose Chloramphenicol
BP	Baird–Parker agar
CCA	Chromocult Coliform Agar