



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΠΟΤΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΚΛΑΣΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ
ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΠΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΛΥΣΙΔΑ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΡΕΑΤΟΣ

ΔΗΜΗΤΡΑ Π. ΤΣΟΥΡΕΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ Χ. ΔΡΟΣΙΝΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2015



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΠΟΤΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΚΛΑΣΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ
ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΠΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΛΥΣΙΔΑ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΡΕΑΤΟΣ

ΔΗΜΗΤΡΑ Π. ΤΣΟΥΡΕΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ Χ. ΔΡΟΣΙΝΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2015

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΚΛΑΣΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ
ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΠΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΛΥΣΙΔΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΡΕΑΤΟΣ**

ΔΗΜΗΤΡΑ Π. ΤΣΟΥΡΕΚΗ

Γεωπόνος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών, B.Sc. & M.Sc.

Υπότροφος του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ Χ. ΔΡΟΣΙΝΟΣ, Ph.D., Αναπληρωτής Καθηγητής

Συστημάτων Διασφάλισης Ποιότητας και Υγιεινής Τροφίμων

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων & Ποτών

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ Χ. ΔΡΟΣΙΝΟΣ, Ph.D., Αναπληρωτής Καθηγητής

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων & Ποτών

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ Ζ. ΠΑΝΑΓΟΥ, Ph.D., Επίκουρος Καθηγητής

Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ Ν. ΣΚΑΝΔΑΜΗΣ, Ph.D., Επίκουρος Καθηγητής

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων & Ποτών

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

στους δικούς μου ξένους,

τους αγαπημένους,

amici italiani.

«Δε ζυγιάζω, δε μετρώ, δε βολεύομαι! Ακολουθώ το βαθύ μου χτυποκάρδι.» Νίκος Καζαντζάκης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΚΛΑΣΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΠΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΛΥΣΙΔΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΡΕΑΤΟΣ

Η ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί εδώ και δεκαετίες θέμα μείζονος σημασίας, καθώς σχετίζεται άμεσα με την υγεία του ανθρώπου. Οι ασθένειες που προκαλούνται από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων εξακολουθούν να έχουν μεγάλο αντίκτυπο στην οικονομία και στη δημόσια υγεία, παγκοσμίως. Αυτό συμβαίνει διότι ανά διαστήματα εμφανίζονται διατροφικά σκάνδαλα στην αλυσίδα τροφίμων, όπως τα μπιφτέκια από αλογίσιο κρέας, η μελαμίνη στο γάλα, η διοξίνες στο κρέας κ.ά. Η βιομηχανία τροφίμων δίδει ιδιαίτερη έμφαση στην υγιεινή προκειμένου να παράγει ασφαλή τρόφιμα με υψηλή ποιότητα. Τα πρότυπα και οι κανονισμοί που εφαρμόζονται σε παγκόσμιο επίπεδο βοηθάνε στην επίτευξη αυτού του στόχου.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακή διατριβής ήταν να προσδιορίσει ποιοτικά το μικροβιακό προφίλ τριών επιχειρήσεων επεξεργασίας τροφίμων κρέατος, ούτως ώστε να εκτιμηθούν οι συνθήκες υγιεινής που επικρατούν. Για το σκοπό αυτό, δειγματοληψίες πενήντα οκτώ (58) επιφανειών έλαβαν χώρα, μετά από την εξυγίανση, σε τρεις επιχειρήσεις επεξεργασίας τροφίμων κρέατος της Βορείου Ιταλίας, μία βιομηχανία τεμαχισμού – σφαγείο (Κ1), μία επιχείρηση παραγωγής αλλαντικών (Κ2) και μία βιομηχανία τεμαχισμού κρέατος και παρασκευής hamburger (Κ3).

Μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν για τη μελέτη της υπάρχουσας ολικής χλωρίδας και τον προσδιορισμό των παθογόνων μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* spp. Εφαρμόστηκαν τόσο κλασσικές τεχνικές - που έδειξαν σε γενικές γραμμές μία σχετικά καλή κατάσταση υγιεινής στους χώρους επεξεργασίας των τροφίμων κρέατος – με κάποια περιθώρια βελτίωσης, όσο και μοριακές τεχνικές, σε επίπεδο DNA. Η μοριακή τεχνική PCR – DGGE, σχημάτισε το μικροβιακό προφίλ της κάθε επιχείρησης, που συνέβαλε στην ποιοτική ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που τις απαρτίζουν.

Λέξεις κλειδιά: αλυσίδα τροφίμων κρέατος, υγιεινή, PCR – DGGE

ABSTRACT

TRADITIONAL AND MOLECULAR TECHNIQUES IN ORDER TO ASSESS HYGIENE CONDITIONS IN THE MEAT FOOD CHAIN

For decades Food Safety is a major issue, as it is directly related to human health. Illnesses caused by the consumption of contaminated foods have a high impact on the economy and public health worldwide. This happens because of the food scandals that appear periodically in the food chain, such as the burgers from horse meat, the melamine inside the milk, the dioxins in meat products etc. Food industry particular emphasize on hygiene, in order to produce safe food with high quality. The standards and regulations that applied worldwide, helps to achieve that objective.

The aim of the present master thesis was to qualitatively determine the microbial profile of the three meat processing plants, in order to assess the hygiene conditions. For that reason, fifty eight surface sampling took place, after sanitation, at three meat processing plants of Northern Italy, a cutting plant and slaughter – house (K1), a fermented sausages processing plant (K2) and a cutting plant with a production of hamburger (K3).

Microbiological analyzes were performed for the study of the existing total microbiota and the determination of pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. They applied both traditional techniques – which showed in general a relatively good state of hygiene in the meat processing areas of meat, with some margins of improvement – and molecular techniques, at a DNA level. The molecular technique of PCR – DGGE gave the microbial profile of each plant, which contributed to the qualitative identification of microorganisms.

Key words: meat food chain, hygiene, PCR - DGGE

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με αφορμή το πέρας της μεταπτυχιακής μου μελέτης και έχοντας αισίως φτάσει στην ολοκλήρωση ενός ακόμα κύκλου σπουδών μου, θεωρώ υποχρέωσή μου να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους τους ανθρώπους, οι οποίοι από τη δική τους θέση και ο καθένας βάζοντας το δικό του λιθαράκι, συνέβαλαν στην πραγματοποίηση τούτου του εγχειρήματος.

Πρωτίστως, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντά μου κ. Ελευθέριο Δροσινό, Αναπληρωτή Καθηγητή τους τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, ο οποίος έδειξε αμέριστη εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου, επιτρέποντάς μου να ανοίξω τα φτερά μου παραπάνω από όσο πίστευα ότι μπορούσα. Ήταν αυτός που με καθοδήγησε και πίστεψε σε μένα όταν ακόμη αναρωτιόμουν κατά πόσο μπορώ να ανταπεξέλθω σε ένα μεταπτυχιακό. Καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος, το ενδιαφέρον του ήταν αμείωτο και η καθοδήγησή του πολύτιμη, προσφέροντας τόσο σε μένα όσο και στους συμφοιτητές μου πλήθος γνώσεων και οπτικών, με το δικό του μοναδικό τρόπο. Επιπρόσθετα, όταν ήλθε η στιγμή της διεξαγωγής της παρούσας μελέτης, αφού μου προσέφερε όλα τα εφόδια που χρειαζόμουν, μου έδωσε την ευκαιρία – με κάθε ελευθερία – να υπάρξω σε ένα περιβάλλον εργαστηρίου πέραν των ορίων της Ελλάδος, καλλιεργώντας δεξιότητες και αποκομίζοντας πλήθος εμπειριών.

Θερμά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κυρίους Ευστάθιο Πανάγου και Παναγιώτη Σκανδάμη, Επίκουρους Καθηγητές του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν ώστε να μελετήσουν την εργασία μου και να προσθέσουν εύστοχες υποδείξεις. Οι δύο αυτοί κύριοι αποτέλεσαν πρότυπα διδασκάλων δίδοντας σε κάθε τους μάθημα εναύσματα για περαιτέρω εξερεύνηση των θεμάτων που αφορούν τον τομέα των τροφίμων. Η διδακτική τους συμβολή αποτελεί αξία ανεκτίμητη.

Επιπλέον, δε θα μπορούσαν να μην ευχαριστήσω τους ανθρώπους του DISAFA στο Πανεπιστήμιο του Τορίνο, όπου για πέντε μήνες υπό την σκέπη τους μπόρεσα να διακρίνω και να βελτιστοποιήσω τις δεξιότητές μου, διευρύνοντας παράλληλα τους ορίζοντές μου. Θερμά ευχαριστώ λοιπόν τον δόκτωρ Luca Simone Cocolin, ο οποίος με δέχτηκε στο εργαστήριό του και μου επέτρεψε να κινούμαι αυτοβούλως, εξερευνώντας πέραν από το αντικείμενο της μελέτης μου και πλήθος άλλων αντικειμένων που έτρεχαν εκείνη την περίοδο στο εργαστήριο. Αμέτρητα ευχαριστώ επίσης οφείλω στην κα Καλλιόπη Ράντσιου, η οποία αποτέλεσε για μένα μία ευχάριστη προσωπικότητα ενός πετυχημένου Έλληνα στο εξωτερικό, δημιουργώντας μου τις αντίστοιχες προσδοκίες. Επιπρόσθετα, όλα τα ευχαριστώ είναι λίγα για την κα Valentina Alessandria, η οποία από την πρώτη στιγμή της συνεργασίας μας, πίστεψε σε μένα, δίδοντάς μου την αυτονομία που χρειαζόμουν για να εξελιχθώ ως επιστήμονας. Δεν δύναται να ξεχάσω τη στήριξη που μου παρείχε,

καθώς και την καθοδήγηση και τις διδασκαλίες της, που ήταν μείζονος σημασίας για την επίτευξη του παρόντος πονήματος.

Επίσης, ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον κ. Σπυρίδων Παραμυθιώτη (ΕΔΙΠ) και στην Αγνή Χατζηλουκά (Ph.D.) για την πολύτιμη βοήθειά τους και τη συμβολή τους στις γνώσεις μου γύρω από τις μοριακές τεχνικές. Ευχαριστώ την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Αντιγόνη Τασιοπούλου για τη συνεργασία μας κατά την πειραματική περίοδο και την κα Αγγελική Ρούσσου, η οποία με στήριξε με το δικό της τρόπο καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για την υποτροφία που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, επιτρέποντάς μου χωρίς καμία ανησυχία να επικεντρωθώ στο στόχο μου και τελικά να επιτύχω. Εδώ να αναφέρω πως η ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας συγχρηματοδοτήθηκε μέσω της Πράξης Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ για Μεταπτυχιακές Σπουδές Πρώτου Κύκλου (Μάστερ) – Οριζόντια Πράξη, από πόρους του ΕΠ «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) του ΕΣΠΑ, 2007 – 2013».

Κλείνοντας, θα ήθελα να κάνω ιδιαίτερη μνεία στους διδασκάλους της μέχρι τούδε πορείας μου, των οποίων οι διδαχές και οι συμβουλές θαρρώ πως θα με συντροφεύουν στο σύνολο της ζωής μου, καθώς είναι αυτοί που με νουθέτησαν ώστε να μην εφησυχάζω, μα να παιδεύω το μυαλό μου μέχρι να φτάσω σε αυτά που επιθυμώ. Είναι αυτοί που κατάφεραν να μεταλαμπαδεύσουν πέραν των γνώσεων πλήθους αντικειμένων, ήθος και αξίες, συμβάλλοντας στο ποσοστό που τους αναλογεί στη διαμόρφωση της Δήμητρας του σήμερα. Μία Δήμητρα που δε φοβάται να παλεύει να κατακτήσει ότι ονειρεύεται, πέρα από κάθε δυσκολία έχοντας πλέον γνωρίσει την αμέτρητη αξία της κατάκτησης έναντι των πραγμάτων που μπορείς να λάβεις απλόχερα.

Θα ήταν αχαριστία από μέρους μου να μην εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου, οι οποίοι δείχνουν υπομονή και κατανόηση στις όποιες υποχρεώσεις φέρω κατά καιρούς. Τέλος, πως θα μπορούσα να ξεχάσω τους γονείς μου και τους αδερφούς μου, στους οποίους θέλω να εκφράσω την εκ βάθους καρδιάς ευγνωμοσύνη μου για τις θυσίες, την υπομονή, τις παροτρύνσεις, τις συμβουλές και την αγάπη, που μου προσφέρουν ακατάπαυστα, αποτελώντας το στήριγμά μου και γεμίζοντας την ψυχή μου με θάρρος και δύναμη ώστε να ακολουθώ τη δική μου διαδρομή στη ζωή.

Δήμητρα Π. Τσουρέκη

Αθήνα, Ιούλιος 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iv
ABSTRACT	v
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	vi
Θεωρητικό Μέρος	1
1. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	2
1.1 Γενικά Στοιχεία - Εισαγωγή	2
1.1.1 Νομοθεσία.....	3
1.2 Κρέας	4
1.2.1 Χημική Σύσταση του Κρέατος	4
1.2.2 Μικροβιακή Χλωρίδα του Κρέατος	6
1.2.2.1 Αλλοιωγόνους Μικροοργανισμούς	7
1.2.2.2 Παθογόνους Μικροοργανισμούς	8
1.2.2.2.1 <i>Salmonella spp.</i>	9
1.2.2.2.2 <i>Listeria spp.- Listeria monocytogenes</i>	11
1.2.2.2.3 <i>Escherichia coli</i>	13
1.3 Ανακλήσεις προϊόντων Κρέατος	15
1.4 Μέτρα Υγιεινής στις Επιχειρήσεις Τροφίμων	21
1.4.1 Κανόνες Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής	21
1.4.2 Κανόνες Ορθής Υγιεινής Πρακτικής	23
1.4.2.1 Τεχνικές Καθαρισμού και Εξυγίανσης.....	23
1.4.3 Γενικές Απαιτήσεις Υγιεινής για τους Χώρους Τροφίμων.....	26
1.4.4 Ειδικές Απαιτήσεις Υγιεινής για τους Χώρους Παρασκευής, Επεξεργασίας ή Μεταποίησης Τροφίμων	27
1.4.5 Μεταφορά	28
1.4.6 Απαιτήσεις Εξοπλισμού.....	28
1.4.7 Απορρίμματα Τροφίμων	29
1.4.8 Παροχή Νερού	29
2. Βιοϋμένια (<i>Biofilms</i>)	30
2.1 Ιστορική Αναδρομή	31
2.2 Δομή και Σχηματισμός Βιοϋμενίων	33
2.2.1 Δομή του Βιοϋμενίου	33
2.2.2 Σημαντικοί Παράγοντες για την Κυτταρική Προσκόλληση	34
2.2.2.1 Επιφάνεια Προσκόλλησης.....	35

2.2.2.2 Υδατικό Μέσο.....	37
2.2.2.3 Μικροβιακά Κύτταρα	39
2.2.2.3.1 Εξωκυτταρική Πολυμερής Ουσία (EPS) – Γλυκοκάλυκας.....	40
2.2.3 Σχηματισμός του Βιοϋμενίου	41
2.2.3.1 Στάδια Σχηματισμού του Βιοϋμενίου	41
2.2.3.2 Περιγραφή Μηχανισμού Σχηματισμού.....	42
2.2.3.3 Δομή Όριμου Βιοϋμενίου.....	46
2.3 Ιδιότητες Βιοϋμενίων	47
Πειραματικό Μέρος	50
3. Σκοπός του Πειράματος	51
4. Υλικά και Μέθοδοι	52
4.1 Δειγματοληψία.....	52
4.2 Μικροβιολογικές Αναλύσεις	53
4.2.1 Απαρίθμηση Μικροοργανισμών	53
4.2.1.1 Θρεπτικά Υποστρώματα Ανάπτυξης	53
4.2.1.2 Εμπλουτισμός Δειγμάτων	55
4.2.2 Καταμέτρηση Αποικιών (<i>Colony Count</i>)	56
4.2.3 Δοκιμή Συγκόλληση.....	58
4.3 Μοριακές Τεχνικές	58
4.3.1 Απομόνωση DNA (<i>DNA extraction</i>) «Ύποπτων» Μικροοργανισμών	58
4.3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για Ανίχνευση της <i>Salmonella</i> spp... ..	59
4.3.3 Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Αγαρόζης.....	62
4.3.4 Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (<i>Quantitative PCR – qPCR</i>) για Ανίχνευση της <i>Listeria monocytogenes</i>	62
4.3.5 DNA Extraction Δειγμάτων.....	64
4.3.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για το DGGE	65
4.3.7 Ηλεκτροφόρηση Βαθμιδωτής Αποδιάταξης (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – DGGE)	66
4.4 Καθαρισμός και Αλληλούχιση του DNA.....	68
4.4.1 Καθαρισμός (<i>Purifying</i>) DNA	70
5. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	71
5.1 Απαρίθμηση Μικροβιακού Πληθυσμού	71
5.2 Μοριακές Τεχνικές Ταυτοποίησης.....	81
5.2.1 PCR Ανίχνευσης των <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Salmonella</i> spp.....	81

5.2.2 Ηλεκτροφόρηση Βαθμιδωτής Αποδιάταξης (DGGE).....	82
5.2.2.1 Cluster Analysis.....	89
Βιβλιογραφία	92

Θεωρητικό Μέρος

1. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

1.1 Γενικά Στοιχεία - Εισαγωγή

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (*World Health Organization, WHO*) εκτιμάται ότι οι τροφικές διαρροϊκές ασθένειες αποτελούν την αιτία θανάτου για περίπου 2,2 εκατομμύρια ανθρώπων σε ετήσια βάση, οι περισσότεροι εκ των οποίων είναι παιδιά. Η διάρροια είναι το οξύ και πιο κοινό σύμπτωμα των τροφιμογενών νοσημάτων, όπου στις αναπτυσσόμενες χώρες τα τρόφιμα αποτελούν τον κύριο αγωγό μετάδοσης παθογόνων, πρόκλησης ασθενειών και θανάτων. Ακόμη, στις ανεπτυγμένες χώρες υπολογίζεται ένα ποσοστό της τάξεως του 10 – 15% του πληθυσμού με εμφάνιση διαταραχών της υγείας, κάθε έτος (*Kaferstein, 2003*).

Επιπρόσθετα, τα τροφιμογενή νοσήματα είναι εξαιρετικά δαπανηρά για την κοινωνία, καθώς εμπειρογνώμονες υγείας – από τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (*Centers for Disease Control and Prevention, CDC*) των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής – εκτιμούν ότι το ετήσιο κόστος κυμαίνεται στα 5 – 6 δισεκατομμύρια δολάρια σε άμεσες ιατρικές δαπάνες και σε απώλεια παραγωγικότητας. Εξίσου τεράστιο είναι το κόστος για τη βιομηχανία τροφίμων, όπου αποσύρονται σημαντικές ποσότητες προϊόντων και αυξάνονται υπερβολικά οι δαπάνες για πρόστιμα και πρόσθετους εργαστηριακούς ελέγχους, με μείζον αντίκτυπο στις παγκόσμιες αγορές.

Εκ των ανωτέρω διαφαίνεται σαφώς η σοβαρότητα και η υπευθυνότητα που πρέπει να διέπει τις επιχειρήσεις τροφίμων, οι οποίες φέρουν τεράστια ευθύνη για την εξασφάλιση όλων εκείνων των κριτηρίων που πληρούν τις απαιτήσεις της νομοθεσίας και συμβάλλουν στην διασφάλιση της παραγωγής ασφαλών τροφίμων, από το αγρόκτημα στο πιρούνι (*from farm to fork*). Για τον σκοπό αυτό οι βιομηχανίες τροφίμων εφαρμόζουν την «Πολιτική Ασφάλειας Τροφίμων» η οποία περιλαμβάνει την εφαρμογή του συστήματος διαχείρισης της ασφάλειας που βασίζεται στις αρχές της Ανάλυσης Κινδύνου και των Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (*Hazard Analysis Critical Control Points – HACCP*), σε όλους τους χώρους παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων.

1.1.1 Νομοθεσία

Σε παγκόσμιο επίπεδο έχει τεθεί ως στόχος η διασφάλιση ενός υψηλού επιπέδου προστασίας της ανθρώπινης υγείας (με μείωση των τροφιμογενών νόσων και των ζωνοδόσων) και των συμφερόντων των καταναλωτών (European Commission, 2014). Προς αυτή τη κατεύθυνση και με στόχο την ολιστική προσέγγιση της ασφάλειας τροφίμων, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει εκδώσει μια σειρά κανονισμών και οδηγιών. Σε αυτούς περιλαμβάνονται:

- ο οριζόντιος **Κανονισμός 178/2002**: περιλαμβάνει τις γενικές αρχές και απαιτήσεις της Νομοθεσίας Τροφίμων.
- η **Δέσμη Υγιεινής (Hygiene Package)**: περιλαμβάνει
 - τον οριζόντιο **Κανονισμό (ΕΚ) 852/2004** – αποτελεί τον Κανονισμό Υγιεινής Τροφίμων,
 - τον κάθετο **Κανονισμό (ΕΚ) 853/2004** – αποτελεί Κανονισμό που καθορίζει τους ειδικούς Κανόνες Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης,
 - τον κάθετο **Κανονισμό (ΕΚ) 854/2004** – αποτελεί τον Κανονισμό για τον Επίσημο Έλεγχο Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης.
- ο κάθετος **Κανονισμός (ΕΚ) 882/2004** – αποτελεί τον Κανονισμό για τους Επίσημους Ελέγχους Συμμόρφωσης προς τη Νομοθεσία.
- ο **Κανονισμός 2073/2005**- αποτελεί τον Κανονισμό που περιλαμβάνει τα Μικροβιολογικά Κριτήρια για τα Τρόφιμα.
- ο **Κανονισμός 1774/2002** – αποτελεί τον Κανονισμό για τον καθορισμό των Υγειονομικών Κανόνων σχετικά με τα Ζωικά Υποπροϊόντα.

οι οποίοι είναι υποχρεωτικοί σε όλα τα Κράτη Μέλη, για τις βιομηχανίες παραγωγής, μεταποίησης και διανομής τροφίμων. Αξίζει επιπλέον να σημειωθεί ότι τα μέτρα που ορίζει το νομοθετικό πλαίσιο ακολουθούνται από μετέπειτα πράξεις τροποποίησης, μα πάντα βασίζονται στις αρχές της HACCP και του Codex Alimentarius (EFET, European Union).

1.2 Κρέας

Το κρέας και τα προϊόντα του ανήκουν στις κύριες κατηγορίες τροφίμων, με υψηλό ποσοστό στις διατροφικές προτιμήσεις των καταναλωτών. Ανήκουν ωστόσο και στα τρόφιμα, που είναι υπεύθυνα για την πρόκληση τροφιογενών ασθενειών, καθώς η σύστασή τους τα καθιστά εξαιρετικά «κατάλληλα» ως υποστρώματα για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών, δια τούτο χρήζουν ιδιαίτερης σημασίας όσον αφορά την υγιεινή και την ασφάλεια και εντάσσονται στα ευπαθή και ευαλλοίωτα προϊόντα, υψηλής επικινδυνότητας (Nychas et al., 2007; Argyri, 2010).

Σύμφωνα με το άρθρο 88 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (2009) ο όρος «νωπό κρέας» αποδίδεται στα τμήματα των σφαγίων των θερμόαιμων ζώων και πτηνών, που είναι κατάλληλα για τη διατροφή του ανθρώπου, σύμφωνα με τις εκάστοτε ισχύουσες διατάξεις και τα οποία διατίθενται στην κατανάλωση ως έχουν χωρίς καμία επεξεργασία, εκτός από τον τεμαχισμό και την ψύξη.

1.2.1 Χημική Σύσταση του Κρέατος

Το κρέας αποτελείται από νερό, πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες (Πίνακας 1.2.1.1). Οι πρωτεΐνες του θεωρούνται υψηλής βιολογικής αξίας λόγω της ικανοποιητικής περιεκτικότητάς τους σε απαραίτητα αμινοξέα (Πίνακας 1.2.1.2). Η πλούσια αυτή σύσταση τους προσδίδει τον χαρακτηρισμό της σχεδόν πλήρους τροφής (Georgakis et al., 2002).

Πίνακας 1.2.1.1 Χημική Σύσταση Άπαχου Μυϊκού Ιστού (Varnam and Sutherland, 1999)

Παράμετροι	Είδος Κρέατος			
	Ορνίθιο	Χοιρινό	Βόειο	Πρόβειο
Νερό (%)	73 – 76	68 – 70	70 – 73	73
Πρωτεΐνες (%)	20 – 23	19 – 20	20 – 22	20
Λιπίδια (%)	4.7	9 – 11	4.8	5 – 6
Τέφρα (%)	1	1.4	1	1.4

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 1.2.1.1 η χημική σύσταση του κρέατος ποικίλει και εξαρτάται από το είδος, το φύλο, την ηλικία, τη διατροφή και τη μεταχείριση του ζώου πριν και μετά τη σφαγή, καθώς και από τις συνθήκες συντήρησής του. Επιπλέον, το κρέας χαρακτηρίζεται από μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία που αντιστοιχεί σε υψηλή ενεργότητα ύδατος (a_w), της τάξεως του 0,99.

Πίνακας 1.2.1.2 Περιεκτικότητα Διαφόρων Ειδών Κρέατος σε Αμινοξέα
(Paul et al., 1980)

Αμινοξέα (g / 100g)	Είδος Κρέατος			
	Ορνίθιο	Χοιρινό	Βόειο	Πρόβειο
Αργινίνη	12.8	12.2	13.7	12.7
Κυστεΐνη	2.6	2.6	2.6	2.7
Ιστιδίνη[§]	6.2	8.9	7.5	6.7
Ισολευκίνη[§]	9.5	9.2	10.4	9.7
Λευκίνη[§]	15.4	14.5	16.3	15.0
Λυσίνη[§]	18.4	19.7	18.5	20.3
Μεθειονίνη[§]	4.9	5.6	5.5	5.3
Φαινυλαλανίνη[§]	9.2	7.9	9.1	8.0
Θρεονίνη[§]	8.5	8.9	9.4	9.7
Τρυπτοφάνη[§]	2.3	2.3	2.6	2.7
Τυροσίνη	7.2	7.6	7.8	7.3
Βαλίνη[§]	9.8	9.9	10.7	10.0

§ Απαραίτητα Αμινοξέα

Όσον αφορά τα ανόργανα στοιχεία, το κρέας αποτελεί σημαντική πηγή πρόσληψης αφομοιώσιμου σιδήρου (βιοδιαθεσιμότητα 15 - 35%), ψευδαργύρου και φωσφόρου, ενώ μικρή είναι η περιεκτικότητά του σε ασβέστιο και μαγνήσιο (Romans et al., 2001). Επίσης, ο μυϊκός ιστός αποτελεί εξαιρετική πηγή βιταμινών του συμπλέγματος Β (θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, νιασίνη, Β6 και Β12) και βιταμίνης Α από τις λιποδιαλυτές, με τις υπόλοιπες να απαντώνται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Τα επίπεδα της βιταμίνης Ε είναι μεγαλύτερα στο κρέας όταν τα ζώα τρέφονται με τροφή πλούσια σε τοκοφερόλες. Τέλος, η βιταμίνη C βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (Varnam and Sutherland, 1999).

1.2.2 Μικροβιακή Χλωρίδα του Κρέατος

Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι μικροοργανισμοί είναι είτε απόντες, είτε μη ανιχνεύσιμοι, ή ανευρίσκονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στους μυϊκούς ιστούς των υγιών ζώντων ζώων (Paradourouli, 2013). Εν αντιθέσει, το δέρμα και ο γαστρεντερικός σωλήνας των ζώων, αποτελούν πηγές μίανσης κατά τη σφαγή, καθώς είναι πιθανό να φέρουν υψηλό μικροβιακό φορτίο, το οποίο έχει προέλθει είτε κατά τις συνθήκες εκτροφής ή στις συνθήκες που επικρατούν στο σφαγείο, όπου η φυσική κατάσταση των ζώων πριν και κατά τη σφαγή επιδρά σημαντικά (Gill, 1998; Koutsoumanis and Sofos, 2004). Επιπλέον, η μικροβιακή εξάπλωση στους χώρους σφαγής καθιστά δυνατή την ταχύτερη μικροβιακή αλλοίωση στο κρέας, εφόσον η διαδικασία σφαγής δεν λειτουργεί αποτελεσματικά (Nychas et al. 2007).

Το υπόστρωμα που δημιουργεί το κρέας για την ανάπτυξη της μικροχλωρίδας χαρακτηρίζεται ως πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά με μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία ($a_w \approx 0,99$), τιμή pH που κυμαίνεται στο 5,0 - 7,0 και υψηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό στην επιφάνεια (Karamperi, 2010). Ωστόσο, η επεξεργασία του τροφίμου και οι συνθήκες του περιβάλλοντος (θερμοκρασία, σχετική υγρασία) είναι οι παράγοντες που θα καθορίσουν την τελική σύσταση της μικροχλωρίδας, η οποία δρα είτε συνεργιστικά είτε ανταγωνιστικά. Η αρχική μικροχλωρίδα του κρέατος αποτελείται από τη φυσική μικροχλωρίδα και την περιβαλλοντική μόλυνση (παθογόνοι μικροοργανισμοί) κατά το χειρισμό. Μόνο ένα μικρό κλάσμα

της αρχικής μικροχλωρίδα είναι ικανό να αναπτυχθεί και να φτάσει μεγάλους πληθυσμούς και αυτό είναι οι ειδικοί αλλοιωγόνοι οργανισμοί (*specific spoilage organisms, SSO*), που είναι οι υπεύθυνοι για την αλλοίωση του κρέατος (Ercolini et al., 2006; Papadopoulou, 2013).

1.2.2.1 Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί

Η ανάπτυξη των αλλοιογόνων μικροοργανισμών λαμβάνει χώρα στην υδάτινη φάση του κρέατος. Οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί είναι κυρίως αρνητικά κατά Gram βακτήρια, όπως:

- ✿ τα Αερόβια Ψυχρότροφα Είδη
 - *Pseudomonas* spp.
 - *Moraxella* spp.
 - *Acinetobacter* spp.
 - *Aeromonas* spp.
- ✿ και το Προαιρετικό Αναερόβιο Είδος
 - *Shewanella putrefaciens*

αλλά συναντώνται επίσης σε υψηλούς πληθυσμούς και θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως τα Προαιρετικά Αναερόβια:

- ✿ Γαλακτικά – *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Weissella*
- ✿ *Brochothrix thermosphacta*

(Lambert et al. 1991; Adams and Moss, 1995; Borch et al. 1996; Jay, 2000; Nychas et al., 2007; Papadopoulou, 2013). Οι μικροοργανισμοί που αποτελούν συνήθως την κύρια μικροβιακή χλωρίδα στο νωπό κρέας, που διατηρείται υπό ψύξη σε αερόβιες ή συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας είναι οι *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, γαλακτικά βακτήρια και *Shewanella putrefaciens* (García – Lopez et al., 1998; Koutsoumanis and Sofos, 2004; Papadopoulou, 2013).

1.2.2.2 Παθογόνοι Μικροοργανισμοί

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το κρέας πριν τη σφαγή είναι σχεδόν στείρο. Η μικροβιακή επιμόλυνση – από τη στιγμή της σφαγής έως την επεξεργασία και τη διανομή του κρέατος – μπορεί να οφείλεται σε έμμεση επαφή με τον αέρα του χώρου επεξεργασία (Gustavsson and Borch, 1993; den Aantrekker et al., 2003), σε μεταφορά των μικροοργανισμών από τις εξωτερικές επιφάνειες του σφαγίου (δέρμα, τρίχωμα, πόδια) και σε μικροοργανισμούς που απαντώνται στο γαστρεντερικό σωλήνα ή τους λεμφαδένες του ζώου (Legg et al., 1999; Antic et al., 2010). Επιπρόσθετα, μικροβιακή επιμόλυνση μπορεί να επέλθει μέσω του εξοπλισμού και των εργαλείων κοπής και επεξεργασίας του σφαγίου, καθώς και μέσω του προσωπικού που έρχεται σε επαφή με τα σφάγια κατά τον χειρισμό τους (Gill, 1998; Legg et al., 1999; den Aantrekker et al., 2003; Kennedy et al., 2005; Vorst et al., 2006; Nychas et al., 2007; Gounadaki et al., 2008; Fernandes, 2009).

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, υπό συνθήκες ορθής βιομηχανικής και υγιεινής πρακτικής, ανευρίσκονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα συγκριτικά με την μικροχλωρίδα που προκαλεί αλλοιώσεις στο κρέας. Μελέτες σε μονάδες επεξεργασίας κρέατος έχουν αποδείξει την συχνή εύρεση των εξής παθογόνων μικροοργανισμών:

- *Salmonella* spp.
- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- *Campylobacter* spp.

(Berends et al., 1998; Bacon et al., 2002; Arthur et al., 2004; Ghafir et al., 2007; Antic et al., 2010). Τα αρνητικά κατά Gram και προαιρετικά αναερόβια βακτήρια *Salmonella* spp., *Escherichia coli* και το μικροαερόφιλο *Campylobacter* spp. είναι εντερικής προέλευσης, με κύρια πηγή μόλυνσης την πρώτη ύλη. Αντιθέτως, για το θετικό κατά Gram και μικροαερόφιλο παθογόνο *Listeria monocytogenes*, πηγή μόλυνσης αποτελεί το περιβάλλον των εγκαταστάσεων, καθώς είναι περιβαλλοντικός παθογόνος μικροοργανισμός.

Τέλος, οι ακόλουθοι παθογόνοι μικροοργανισμοί συνδέονται με το κρέας:

- *Staphylococcus aureus*
- *Clostridium perfringens*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Aeromonas hydrophila*

οι οποίοι είναι εξίσου σημαντικοί αλλά δεν αφορούν το σκοπό της παρούσας εργασίας, δια τούτο δε θα γίνει περεταίρω αναφορά τους.

1.2.2.2.1 *Salmonella spp.*

Είναι αρνητικά κατά Gram, προαιρετικά αναερόβια, μη σπορογόνα, βακτήρια, με μορφολογία μικρών βακίλων, που ανήκουν στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae* (Πίνακας 1.2.2.2.1). Τα περισσότερα γένη δύνανται κινητικότητας. Έχουν αναφερθεί περίπου 2.400 ορότυποι, που έχουν κατηγοριοποιηθεί σε δύο είδη: τη *Salmonella enterica* και τη *Salmonella bongori* (Sakaridis, 2011). Επιπλέον, από επιδημιολογική άποψη μπορούν να διααιρεθούν σε τρεις ομάδες (Jay et al., 2005):

- 1) Σε ορότυπους που προσβάλλουν μόνο τον άνθρωπο (τυφοειδής και παρατυφοειδής πυρετός – *Salmonella Typhi*),
- 2) Σε ορότυπους που προσαρμόζονται στον ξενιστή (παθογόνοι για τον άνθρωπο και μπορούν να απομονωθούν από τρόφιμα – *Salmonella Dublin* στην αγελάδα),
- 3) Σε μη προσαρμοσμένους ορότυπους (οι παθογόνοι για τον άνθρωπο και τα ζώα που είναι οι κυρίως υπεύθυνοι για τις τροφιμογενείς νόσους – *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*).

Η *Salmonella spp.* είναι ένα από τα πιο κοινά τροφιμογενή νοσήματα, όπου σύμφωνα με στοιχεία των CDC των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής, προκαλεί περίπου 1,2 εκατομμύρια ασθένειες, με 19 χιλιάδες νοσηλείες και 38ο θανάτους. Στοιχεία της Ε.Ε. για το 2013, αναφέρουν περίπου 82,7 χιλιάδες επιβεβαιωμένα κρούσματα σαλμονέλωσης, από 27 Κράτη Μέλη, με τις περιπτώσεις κοινοποίησης να ανέρχονται στο 20,4% ανά 100 χιλιάδες άτομα. Αυτό αντιπροσωπεύει μείωση κατά 7,9% συγκριτικά με το 2012. Επιπλέον, η *Salmonella* παραμένει ο πιο συχνά ανιχνεύσιμος αιτιολογικός

παράγοντας των αναφερόμενων τροφιμογενών κρουσμάτων, κατέχοντας το 22,5% του συνόλου αυτών, ενώ από το 2008 – 2013 ο ετήσιος συνολικός αριθμός των κρουσμάτων εντός της Ε.Ε. μειώθηκε σημαντικά κατά 38,1% (από 1.888 σε 1.168 κρούσματα) (EFSA Journal, 2015).

Πίνακας 1.2.2.2.1 Χαρακτηριστικά της *Salmonella* spp.

<i>Χαρακτηριστικά</i>	<i>Salmonella</i> spp.		
Μορφολογία	Gram (-)	Μικροί βάκιλοι	
Απαιτήσεις σε Οξυγόνο	Προαιρετικά αναερόβιο		
Θερμοκρασία Ανάπτυξης	Max. 45 – 47	Opt. 37	Min. 5,1
Εύρος pH	Max. 9,0	Opt. 6,5 – 7,5	Min. 4 (HCl), 4.4 (lactic), 5,4 (acetic)
Ελάχιστο a_w	0,95		
Ανώτατο Όριο (%) NaCl	8		
Μικροβιολογικά Κριτήρια (όρια)	Απουσία στα 10 ή 25g, ανάλογα με το είδος προϊόντος κρέατος		
Μολυσματική Δόση	μικρή		
Διάρκεια Επώασης	12 - 72 ώρες		
Συμπτώματα	Ναυτία, εμετός, κοιλιακοί πόνοι, πονοκέφαλος, κρυάδες, διάρροια, πυρετός		
Εμπλεκόμενα Τρόφιμα	Νωπό κρέας και πουλερικά, αυγά και νωπό γάλα		
Φυσική Παρουσία	Πουλερικά, κατοικίδια και άγρια ζώα, άνθρωπο, έντομα		

1.2.2.2.2 *Listeria spp.- Listeria monocytogenes*

Είναι θετικό κατά Gram, αερόβιο ή μικροαερόφιλο, μη σπορογόνο βακτήριο, με μορφολογία μικρού βακίλου. Η *Listeria spp.* περιλαμβάνει έξι είδη, εκ των οποίων μόνο τα δύο είναι παθογόνα: η *Listeria monocytogenes* και η *Listeria ivanovii*. Η *Listeria monocytogenes* είναι το παθογόνο με μεγάλη σημασία για τον άνθρωπο, ενώ η *Listeria ivanovii* είναι το παθογόνο των ζώων. Το βακτήριο φέρει βλεφαρίδες που του προσδίδουν κινητικότητα, η οποία παρατηρείται μόνο όταν η καλλιέργεια του μικροοργανισμού γίνεται στους 20 – 25 °C και όχι στους 37 °C (Wagner and McLauchlin, 2008). Στον Πίνακα (1.2.2.2.) φαίνονται τα χαρακτηριστικά του δυνητικού παθογόνου *Listeria monocytogenes*.

Η *Listeria monocytogenes* έχει συνδεθεί με πλήθος ομαδικών κρουσμάτων και με πολλές περιπτώσεις ανάκλησης σημαντικών ποσοτήτων κρεατοσκευασμάτων (Karamperi, 2010). Πιθανή αιτία για την αύξηση των κρουσμάτων, θα μπορούσε να θεωρηθεί η διατροφική τάση αύξησης της κατανάλωσης έτοιμων τροφίμων ήπιας επεξεργασίας, με μεγάλο χρόνο συντήρησης υπό ψύξη, που ευνοεί την διατήρηση και την ανάπτυξη του ψυχρόφιλου παθογόνου.

Σύμφωνα με στοιχεία του CDC, κάθε χρόνο περίπου 1.600 άνθρωποι στις Ηνωμένες Πολιτείες αρρωσταίνουν από μικρόβια της *Listeria*, απαιτείται άμεση νοσοκομειακή περίθαλψη και τελικά περίπου ένα στα πέντε άτομα πεθαίνει. Η *Listeria monocytogenes* χαρακτηρίζεται από υψηλή θνησιμότητα και αποτελεί την τρίτη κύρια αιτία θανάτου από τροφική δηλητηρίαση. Συμπληρωματικά, τουλάχιστον το 90% των ανθρώπων που πλήττονται ανήκουν στους YOPIs (Young, Old, Pregnant, Immune system compromised), ήτοι έγκυες γυναίκες και τα νεογέννητά τους, άτομα 65 ετών και άνω ή άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα.

Το 2013, 27 Κράτη Μέλη ανέφεραν 1.763 κρούσματα λιστερίωσης στον άνθρωπο και 191 θανάτους, με τη Γαλλία να φέρει τον μεγαλύτερο αριθμό των 64 περιπτώσεων. Η δηλούμενη επίπτωση της Ε.Ε. ήταν τα 0,44 κρούσματα ανά 100 χιλιάδες άτομα, που φανερώνει αύξηση της τάξης του 8,6% σε σύγκριση με το 2012. Τα υψηλότερα ποσοστά κοινοποιήσεων κρουσμάτων αφορούσαν την Φινλανδία, την Ισπανία, τη Σουηδία και τη

Δανία, με την πλειοψηφία των περιπτώσεων να αναφέρονται ως εγχώριες. Επιπλέον, συνολικά 13 τροφιμογενή κρούσματα αναφέρθηκαν από επτά Κράτη Μέλη (EFSA Journal, 2015).

Όσον αφορά τα ζώα, τα πιο συχνά κρούσματα λιστερίωσης αποδίδονται στα αιγοπρόβατα, λιγότερο στις αγελάδες και σπάνια στους χοίρους, γεγονός που οφείλεται στις μη ορθά ενσιρωμένες τροφές που αποτελούν πηγές μόλυνσης των ζώων. Επιπρόσθετα, η *Listeria monocytogenes* θεωρείται μικροοργανισμός του εδάφους που δύναται να εισβάλει μέσω διάφορων οδών, με ποικίλη μολυσματική δόση, πλήθος συμπτωμάτων και καταγραφών στους ιστούς του ανθρώπου και των ζώων και με αδιευκρίνιστη και πολυπαραγοντική παθογένεια (Karamperi, 2010).

Πίνακας 1.2.2.2.2 Χαρακτηριστικά της *Listeria monocytogenes*.

Χαρακτηριστικά	<i>Listeria monocytogenes</i>		
Μορφολογία	Gram (+)	Μικροί βάκιλοι	
Απαιτήσεις σε Οξυγόνο	Αερόβιο ή μικροαερόφιλο		
Θερμοκρασία Ανάπτυξης	Max. 45	Opt. 25 – 30	Min. 0
Εύρος pH	Max. 9,0	Opt. 7 – 7,5	Min. 4,4 (30 °C), 5,0 (4 °C)
Ελάχιστο a _w	0,92		
Ανώτατο Όριο (%) NaCl	10		
Μικροβιολογικά Κριτήρια (όρια)	100 cfu/g (καθ' όλη τη διάρκεια διατήρησης του τροφίμου) ή απουσία στα 25g (YOPIs)		
Μολυσματική Δόση	Άγνωστη – μάλλον μικρή		
Διάρκεια Επώασης	8 ημέρες – 3 μήνες		
Συμπτώματα	Ελαφρά αδιαθεσία έως μηνιγγίτιδα, αποβολές στις εγκύους		
	Θνησιμότητα 30%		

Εμπλεκόμενα Τρόφιμα	Σαλάτες, νωπό γάλα, μαλακά τυριά, νωπό κρέας, λαχανικά
Φυσική Παρουσία	Έδαφος, βλάστηση, άνθρωπος, λύματα, νερό, ζώα

1.2.2.2.3 *Escherichia coli*

Είναι ένα αρνητικό κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιο, μη σπορογόνο βακτήριο, με μορφολογία βακίλου, που ανήκει στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae* (πίνακας 1.2.2.2.3). Εκατοντάδες στελέχη *E.coli* είναι αβλαβή, συμπεριλαμβανομένων αυτών που ευδοκιμούν στις εντερικές οδούς των ανθρώπων και άλλων θερμόαιμων ζώων. Αυτά τα στελέχη είναι μέρος της προστατευτικής μικροβιακής κοινότητας του εντέρου και είναι απαραίτητα για την υγεία. Ωστόσο, άλλα στελέχη *E.coli* προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις στους ανθρώπους, με την παραγωγή μίας τοξίνης, που καλείται “Shiga” και το βακτήριο που την παράγει ονομάζεται STEC (*Shiga Toxin - producing E.coli*) ή VTEC (*Verotoxin – producing E.coli*).

Ο πιο συχνά προσδιορισμένος ορότυπος του STEC είναι ο O157:H7, σύμφωνα με τα CDC, που εκτιμούν ότι 265 χιλιάδες λοιμώξεις από τον STEC συμβαίνουν κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες, όπου περίπου το 36% αυτών των λοιμώξεων προκαλούνται από τον *E.coli* O157:H7. Οι κύριες πηγές του *E.coli* O157:H7 είναι τα βοοειδή αλλά συναντάται και σε άλλα οικόσιτα ζώα και άγρια θηλαστικά.

Όσον αφορά αντίστοιχα στοιχεία για την Ευρώπη, το 2013 αναφέρθηκαν από 24 Κράτη Μέλη 6.043 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις λοίμωξης προερχόμενες από τον VTEC, με την τελικά δηλούμενη επίπτωση της Ε.Ε. να φτάνει τα 1,59 κρούσματα ανά 100 χιλιάδες άτομα, το οποίο ήταν κατά 5,9% υψηλότερο από αυτό του 2012. Η αύξηση των κρουσμάτων επικεντρώνεται στην Ιρλανδία, την Ολλανδία και τη Σουηδία, όπου στις πλείστες των περιπτώσεων η μόλυνση επήλθε εντός της ίδιας της χώρας. Επιπλέον, 13 θάνατοι καταγράφηκαν και 73 τροφιμογενή κρούσματα προκλήθηκαν από το VTEC, με κύριο όχημα το βόειο κρέας και τα προϊόντα του. Ο πιο συχνά

αναφερόμενος ορότυπος, ο O157, κατέχει το 48,9% των περιπτώσεων (EFSA Journal, 2015).

Εκτός από τον *E.coli* O157:H7 υπάρχουν και άλλοι ορότυποι που ονομάζονται εντεροαιμορραγικά *E.coli* και προκαλούν τις ίδιες σοβαρές λοιμώξεις. Τέλος, υπάρχουν και άλλες μορφές του *E.coli* που προκαλούν διαρροϊκές ασθένειες και περιλαμβάνουν:

- Το Εντεροτοξικό *E.coli* – ETEC, που αποτελεί μία κορυφαία βακτηριακή αιτία διάρροιας στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Σύμφωνα με τον WHO, κάθε χρόνο περίπου 210 εκατομμύρια κρούσματα και 380 χιλιάδες θάνατοι, συμβαίνουν κυρίως σε παιδιά, από τον ETEC. Επιπλέον, είναι η πιο κοινή αιτία της διάρροιας των ταξιδιωτών.
- Το Εντεροπαθογόνο *E.coli* – EPEC, που είναι ένα βακτήριο εξίσου κοινό στις αναπτυσσόμενες χώρες και προκαλεί επίμονη διάρροια που μπορεί να διαρκέσει δύο εβδομάδες ή περισσότερο (National Institute of Allergy and Infectious Diseases - NIAID).

Πίνακας 1.2.2.2.3 Χαρακτηριστικά της *Escherichia coli*.

Χαρακτηριστικά	<i>Escherichia coli</i> O157:H7		
Μορφολογία	Gram (-)		Βάκιλοι
Απαιτήσεις σε Οξυγόνο	Προαιρετικά αναερόβιο		
Θερμοκρασία Ανάπτυξης	Max. 45	Opt. 37	Min. 10
Εύρος pH	Max. 9,5	Opt.	Min. 4,4
Ελάχιστο a_w	0,95		
Ανώτατο Όριο (%) NaCl	6 – 8		
Μικροβιολογικά Κριτήρια (όρια)	50 – 500 cfu/g (ως δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης στο ΜΔΚ και στον κιμά)		
Μολυσματική Δόση	Άγνωστη		

Διάρκεια Επώασης	3 – 9 ημέρες
Συμπτώματα	Οξείς κοιλιακοί πόνοι, διάρροια (αιματηρή) που οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια
	Θανατηφόρο
Εμπλεκόμενα Τρόφιμα	Κρέας, νωπό γάλα, μπιφτέκια
Φυσική Παρουσία	Κρέας, γαλακτοπαραγωγά ζώα, κόπρανα και νωπό γάλα

1.3 Ανακλήσεις προϊόντων Κρέατος

Τα πιο σοβαρά θέματα της ασφάλειας του κρέατος, που οδηγούν σε προβλήματα υγείας των καταναλωτών και σε ανακλήσεις από την αγορά των δυνητικά μολυσμένων προϊόντων, σχετίζονται με μικροβιακά αίτια και ειδικά με τα παθογόνα βακτήρια – *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* spp. Επιπλέον, υπάρχουν και ανακλήσεις λόγω της μη τήρησης των προδιαγραφών της νομοθεσίας, που αφορούν την ετικέτα του προϊόντος και ιδιαίτερα σε ότι αφορά τα συστατικά που περιέχει (όπως αλλεργιογόνα ή πρόσθετα).

Ύστερα από ελέγχους σε προϊόντα από τις Αρμόδιες Αρχές της κάθε χώρας, ζητείται ανάκληση του μη ασφαλούς – επιβλαβούς για την υγεία προϊόντος από την αγορά και γνωστοποιείται το είδος και η ονομασία του προϊόντος, ο κωδικός παρτίδας, οι ημερομηνίες παρασκευής / ανάλωσης και η επωνυμία των εταιρειών παραγωγής και προμήθειας αυτού. Η γνωστοποίηση γίνεται με δελτία τύπου στην ιστοσελίδα της αρμόδιας αρχής της χώρας, στον ΕΦΕΤ για την Ελλάδα, αλλά και στο Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης για τα Τρόφιμα και τις Ζωοτροφές (RASFF) της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Στον πίνακα 1.3.1 που ακολουθεί παρουσιάζονται περιστατικά ανακλήσεων προϊόντων που σχετίζονται με το κρέας, εντός της Ελλάδος σε επίπεδο πενταετίας 2011 – 2015. Παρατηρήθηκε έντονη κινητικότητα το έτος 2013 γύρω από το διατροφικό σκάνδαλο με το κρέας αλόγου, όπου ένα σημαντικό μέρος των ανακλήσεων αφορούσε Ελληνικές εταιρείες παραγωγής.

Πίνακας 1.3.1 Ανακλήσεις Προϊόντων Κρέατος εντός Ελλάδος (ΕΦΕΤ)

Ημερομηνία Ανάκλησης	Χώρα		Αιτία Ανάκλησης
	Προέλευσης	Προϊόντος	
		Είδος Προϊόντος	
22 Ιουνίου 2015	Ελλάδα	Λουκάνικο	<i>Salmonella</i> spp.
10 Ιουνίου 2015	Ολλανδία	Κατεψυγμένο Μπούτι Κοτόπουλου	<i>Salmonella</i> spp.
15 Οκτωβρίου 2014	Ελλάδα	Λουκάνικα	Αλλεργιογόνες ουσίες – μη αναγραφή
26 Ιουνίου 2014	Ελλάδα	Σαλάμι	<i>Listeria monocytogenes</i>
12 Σεπτεμβρίου 2013	Ελλάδα	Αλλαντικό	<i>Salmonella</i> spp.
27 Αυγούστου 2013	Γαλλία	Αλλαντικού	<i>Salmonella</i> spp.
06 Αυγούστου 2013	Ελλάδα	Χοιρινή Ωμοπλάτη Βραστή	Χρωστική (καρμίνιο) - Πρόσθετο
30 Ιουλίου 2013	Ελλάδα	Αλλαντικά	Χρωστική (E 120) - Πρόσθετο
22 Ιουλίου 2013	Ελλάδα	Χοιρινή Ωμοπλάτη	Χρωστική (καρμίνιο) - Πρόσθετο
17 Μαΐου 2013	Ελλάδα	πάριζα	DNA αλόγου (< 1%)
10 Μαΐου 2013	Ελλάδα	παριζάκι	DNA Αλόγου (< 1%)
02 Μαΐου 2013	Ελλάδα	Πάριζα Βραστή	DNA Αλόγου (< 1%)
30 Απριλίου 2013	Ελλάδα	Πάριζα Βραστή από Φρέσκο Χοιρινό Κρέας	DNA Αλόγου (< 1%)
26 Μαρτίου 2013	Λετονία	Σαλάμι	DNA Αλόγου (95,8%)
26 Μαρτίου 2013	Λετονία	Κονσέρβα Βοδινού Κρέατος	DNA Αλόγου (< 1%)
26 Μαρτίου 2013	Γαλλία	Κονσέρβα Μοσχαρίσιου Κρέατος	DNA Αλόγου (> 10%)

21 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Κατεψυγμένο Σουτζουκάκι	DNA Αλόγου (> 25%)
21 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Κατεψυγμένες Κοτομπουκίτσες	DNA Αλόγου (> 10%)
21 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Κατεψυγμένο Σνίτσελ	DNA Αλόγου (< 1%)
21 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Κατεψυγμένο Σουτζουκάκι	DNA Αλόγου (> 50%)
21 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Προψημένα Κατεψυγμένα Μπιφτέκια	DNA Αλόγου (> 50%)
21 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Λουκάνικα Τύπου Φρανκφούρτης	DNA Αλόγου (> 10%)
21 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Παριζάκι Μοσχαρίσιο	DNA Αλόγου (< 20%)
14 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Σαλάμια	DNA Αλόγου
14 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Αλλαντικό	DNA Αλόγου
14 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Λουκάνικα Τύπου Φρανκφούρτης	DNA Αλόγου
14 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Παριζάκι Γίγας	DNA Αλόγου
14 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Κεφτεδάκια Κατεψυγμένα	DNA Αλόγου
14 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Κεμπάπ Κατεψυγμένο	DNA Αλόγου
14 Μαρτίου 2013	Ολλανδία	Λουκάνικο	DNA Αλόγου
14 Μαρτίου 2013	Ρουμανία	Σαλάμι	DNA Αλόγου
08 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Κεμπάπ, Σουτζούκι, Μπιφτέκια	DNA Αλόγου
08 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Κεμπάπ Κατεψυγμένο	DNA Αλόγου
08 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Σουτζούκι	DNA Αλόγου
08 Μαρτίου 2013	Λετονία	Κονσέρβα Μοσχαρίσιου Κρέατος	DNA Αλόγου

06 Μαρτίου 2013	Ελλάδα	Λουκάνικο	DNA Αλόγου
28 Φεβρουαρίου 2013	Ελλάδα	Κεμπάπ Κατεψυγμένο	DNA Αλόγου
28 Φεβρουαρίου 2013	Ολλανδία	Σαλάμι Βοδινό	DNA Αλόγου
11 Φεβρουαρίου 2013	Γαλλία	Κατεψυγμένα Γεύματα Μοσχαρίσιου Κρέατος	DNA Αλόγου
14 Νοεμβρίου 2012	Ελλάδα	Σαλάμι Αέρος	<i>Listeria monocytogenes</i>
20 Απριλίου 2012	Ελλάδα	Λουκάνικα Τύπου Φρανκφούρτης	<i>Listeria monocytogenes</i>
29 Μαρτίου 2012	Γερμανία	Σαλάμι	Ξένο Σώμα (κόκαλο)
10 Ιανουαρίου 2012	Ισπανία	Αλλαντικά	<i>Listeria monocytogenes</i>
15 Σεπτεμβρίου 2011	Ελλάδα	Κατεψυγμένα Μπιφτέκια	<i>Salmonella</i> spp.
23 Αυγούστου 2011	Γερμανία	Κατεψυγμένο Προϊόν Κιμά από Βοδινό Κρέας	<i>Escherichia coli</i> O157
13 Ιουλίου 2011	Γαλλία	Βοδινό Κρέας	<i>E. coli</i> O157:H7
01 Ιουλίου 2011	Γερμανία	Προϊόντα Κιμά από Βοδινό Κρέας	<i>Escherichia coli</i> O157

Η παγκοσμιοποίηση της προσφοράς των τροφίμων, κατέστησε αναγκαία την ανάπτυξη και την επέκταση ενεργητικών προγραμμάτων επιτήρησης, τα οποία θα αποτελούσαν μέρος μιας συνολικής στρατηγικής για τη μείωση της επιβάρυνσης από τροφιμογενή νοσήματα και την προστασία της δημόσιας υγείας. Υπό μια κοινή βάση δεδομένων καθίσταται πιο εύκολος ο εντοπισμός των εκτεταμένων επιδημικών εκρήξεων που αφορούν πολλές χώρες, καθώς και γίνεται δυνατή η ταχεία μετάδοση επειγόντων ζητημάτων, με την ανταλλαγή τεχνικών πληροφοριών και μεθοδολογιών μεταξύ των χωρών (Doyle and Erickson, 2006). Ένα τέτοιο πρόγραμμα αποτελεί το RASFF.

Πίνακας 1.3.2 Ανακλήσεις Προϊόντων Κρέατος Εντός Ε.Ε. (RASFF)

Ημερομηνία Ανάκλησης	Χώρα Προέλευσης Προϊόντος	Είδος Προϊόντος	Αιτία Ανάκλησης
29 Ιουνίου 2015	Πολωνία	Κοτόπουλο και Χοιρινό Κρέας	Ζύμες
26 Ιουνίου 2015	Βραζιλία	Κατεψυγμένο Αποστεωμένο Βόειο Κρέας	<i>E. coli</i> – Shigatoxin
25 Ιουνίου 2015	Αργεντινή	Βόειο Κρέας	<i>E. coli</i> – Shigatoxin
19 Ιουνίου 2015	Γαλλία	Ζαμπόν	<i>Salmonella</i> spp.
19 Ιουνίου 2015	Ισπανία	Νωπό Χοιρινό Κρέας	Θραύσματα Γυαλιού
17 Ιουνίου 2015	Ισπανία	Λουκάνικα	<i>Salmonella</i> spp.
17 Ιουνίου 2015	Δανία	Πατέ Συκωτιού	<i>Listeria monocytogenes</i>
16 Ιουνίου 2015	Βραζιλία	Αποστεωμένο Βόειο Κρέας	<i>E. coli</i> – Shigatoxin
05 Ιουνίου 2015	Ισπανία	Κατεψυγμένα Burger	<i>E. coli</i> – Shigatoxin
03 Ιουνίου 2015	Γερμανία	Κατεψυγμένο Χοιρινό Κρέας	<i>Salmonella</i> spp.
29 Μαΐου 2015	Βέλγιο	Hamburger από Βόειο / Χοιρινό Κρέας	<i>Salmonella</i> spp.
26 Μαΐου 2015	Βραζιλία	Αποστεωμένο Βόειο Κρέας	<i>E. coli</i> – Shigatoxin
21 Μαΐου 2015	Πολωνία	Πατέ Συκωτιού	Πρόσθετο (σόγια)
21 Μαΐου 2015	Λετονία	Καπνιστό Λουκάνικο	<i>E. coli</i> – Shigatoxin
23 Απριλίου 2015	Γερμανία	Κατεψυγμένο Χοιρινό Κρέας	<i>Salmonella</i> spp.
21 Απριλίου 2015	Ρουμανία	Κατεψυγμένα Σουβλάκια Χοιρινού Κρέατος	<i>Listeria monocytogenes</i> & <i>Salmonella</i> spp.

07 Απριλίου 2015	Ισπανία	Χοιρινό Φιλέτο	<i>Salmonella</i> spp.
02 Απριλίου 2015	Ολλανδία	Κρέας Αρνιού	<i>E. coli</i> – Shigatoxin
31 Μαρτίου 2015	Πολωνία	Ζαμπόν	<i>Listeria monocytogenes</i>
27 Μαρτίου 2015	Βέλγιο	Κρέας Αρνιού	<i>E. coli</i> – Shigatoxin
25 Μαρτίου 2015	Ιρλανδία	Κατεψυγμένο Βόειο Κρέας	<i>Salmonella</i> Dublin
17 Μαρτίου 2015	Βέλγιο	Βόειος Κιμάς	<i>Salmonella</i> spp.
11 Μαρτίου 2015	Πολωνία	Βόειος Κιμάς	<i>Salmonella enteritidis</i>
06 Μαρτίου 2015	Γερμανία	Κατεψυγμένο Κρέας Ελαφιού	<i>E. coli</i> – Shigatoxin
02 Μαρτίου 2015	Ισπανία	Λουκάνικο	<i>Salmonella</i> spp.
20 Φεβρουαρίου 2015	Αργεντινή	Βόειο Κρέας	<i>E. coli</i> – Shigatoxin
19 Φεβρουαρίου 2015	Ισπανία	Φέτες Χοιρινού Λουκάνικου (lomo)	<i>Listeria monocytogenes</i>
18 Φεβρουαρίου 2015	Ιρλανδία	Μοσχαρίσιες Μπριζόλες	<i>E. coli</i> – Shigatoxin
16 Φεβρουαρίου 2015	Βραζιλία	Κατεψυγμένο Αποστεωμένο Βόειο Κρέας	<i>E. coli</i> – Shigatoxin
13 Φεβρουαρίου 2015	Νέα Ζηλανδία	Κρέας Αρνιού	<i>E. coli</i> – Shigatoxin
06 Φεβρουαρίου 2015	Πολωνία	Κατεψυγμένο Βόειο Κιμά	<i>Salmonella enteritidis</i>
06 Φεβρουαρίου 2015	Γαλλία	Βραστό Ζαμπόν	<i>Listeria monocytogenes</i>
23 Ιανουαρίου 2015	Ιταλία	Λουκάνικα	<i>Salmonella</i> spp.
02 Ιανουαρίου 2015	Γερμανία	Κομμάτια Χοιρινού	<i>Salmonella</i> spp.

Το σύστημα παρακολούθησης (RASFF) της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τη διακίνηση των προϊόντων κρέατος εντός αυτής, αφορά και προϊόντα που προέρχονται από χώρες εκτός της Ε.Ε. Κατά κύριο λόγο τα προϊόντα εκτός της Ε.Ε. συνήθως δεν πληρούν τις απαιτούμενες προδιαγραφές που

ορίζονται από την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία, καθώς είτε φέρουν απαγορευμένες χημικές ουσίες, είτε το επίπεδο υπολειμμάτων είναι μεγαλύτερο του MRL. Στον Πίνακα 1.3.2 παρουσιάζονται οι «συναγερμοί» (*alert*) και οι ειδοποιήσεις που εξέδιδαν οι Χώρες της Ε.Ε. για τα προϊόντα κρέατος που δεν πληρούσαν τα κριτήρια ασφάλειας, κατά την περίοδο του τρέχοντος έτους (2015). Παρατηρείται η έντονη παρουσία της *E. coli* σε ένα μεγάλο εύρος προϊόντων κρέατος.

1.4 Μέτρα Υγιεινής στις Επιχειρήσεις Τροφίμων

Κάθε βιομηχανική εγκατάσταση που έχει θέσει ως πρωταρχικό της στόχο την παραγωγή ασφαλών τροφίμων οφείλει να δίδει την ανάλογη σημασία στην εφαρμογή των Προαπαιτούμενων Προγραμμάτων, τα οποία αποτελούν το υπόβαθρο στο οποίο θα «δομηθεί» το σχέδιο HACCP. Τα Προαπαιτούμενα προγράμματα (*Prerequisite Programs – PRP's*) φέρουν τις γενικές απαιτήσεις υγιεινής, οι οποίες αφορούν το σύνολο των συνθηκών και ενεργειών για τη διασφάλιση της υγιεινής:

- των πρώτων υλών και συστατικών,
- του περιβάλλοντος εργασίας (οι εγκαταστάσεις της βιομηχανίας και τα μηχανήματα παραγωγής),
- κατά την παραγωγική διαδικασία, την αποθήκευση και τη μεταφορά του προϊόντος,
- του προσωπικού.

Για την επίτευξη αυτών των συνθηκών και τη συμμόρφωση με τη νομοθεσία εφαρμόζονται οι Κανόνες Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής (*GMP's*) και οι Κανόνες Ορθής Υγιεινής Πρακτικής (*GHP's*).

1.4.1 Κανόνες Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής

- **Εγκατάσταση (Τοποθεσία και Σχεδιασμός):** οι χώροι πρέπει να είναι μεγάλοι ώστε να αποφεύγεται η διασταυρούμενη επιμόλυνση και να διαχωρίζονται, όπου διαφορετικοί χώροι θα εξυπηρετούν την αποθήκευση των υλικών συσκευασίας, την παραγωγική διαδικασία,

τον έλεγχο ποιότητας, την εισαγωγή και την αποθήκευση των πρώτων υλών και την αποθήκευση των τελικών προϊόντων.

- **Εξοπλισμός:** πρέπει να είναι κατάλληλος για τη χρήση που προορίζεται και να καθαρίζεται / απολυμαίνεται εύκολα και γρήγορα. Επιπλέον, τα όργανα μετρήσεων που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι βαθμονομημένα.
- **Επιλογή Πρώτων Υλών:** για την παραγωγή επιτρέπεται η χρήση καθορισμένων πρώτων υλών και συστατικών που ικανοποιούν προκαθορισμένες απαιτήσεις. Ο υπεύθυνος δεν θα επιτρέψει σε καμία πρώτη ύλη ή άλλο υλικό, για τα οποία έχει την υποψία ότι είναι και θα παραμείνουν ακατάλληλα και μετά τη μεταποίηση, να εισέλθουν στην βιομηχανία καθώς μπορεί να αποτελέσουν πηγή μόλυνσης.
- **Διεργασίες Παραγωγής:** για λόγους υγιεινής πρέπει κάθε διεργασία παραγωγής να εκτελείται σε ξεχωριστό χώρο, το προσωπικό να φορά φόρμα εργασίας και ουδείς στο τμήμα παραγωγής να είναι φορέας κάποιας ασθένειας. Για αυτό όλοι οι εργαζόμενοι πρέπει να διαθέτουν βιβλιάριο υγείας.
- **Υλικά Συσκευασίας:** πρέπει να ελέγχονται ως προς την καταλληλότητα της χρήσης τους και να αντιμετωπίζονται ως πρώτες ύλες.
- **Προσωπικό:** πρέπει τα άτομα που απασχολούνται στο τμήμα παραγωγής και ελέγχου ποιότητας να επιβλέπονται και να καθοδηγούνται, καθώς και να παρακολουθούν εκπαιδευτικά προγράμματα σχετικά με την υγιεινή των τροφίμων και ανάλογα με τις εκτελούμενες εργασίες τους. Επιπλέον, απαιτείται υψηλός βαθμός ατομικής καθαριότητας από όλο το εργατικό δυναμικό που είναι προμηθευμένο με κατάλληλο και καθαρό ρουχισμό.

1.4.2 Κανόνες Ορθής Υγιεινής Πρακτικής

Περιλαμβάνουν τις διαδικασίες καθαρισμού και εξυγίανσης (*Sanitation Standard Operation Procedures, SSOP's*).

- **Καθαρισμός (Εγκατάστασης και Εξοπλισμού):** η φυσική ή χημική διαδικασία για την απομάκρυνση κάθε είδους ακαθαρσίας (ρύπου) ορατής ή μη, από τις διάφορες επιφάνειες, με χρήση ζεστού ή/και κρύου νερού, απορρυπαντικών και τριψίματος σύμφωνα με τη διαδικασία που ορίζεται από τον υπεύθυνο για την εφαρμογή του προγράμματος.
- **Εξυγίανση (*sanitation*) ή Απολύμανση (*disinfection*):** η διαδικασία που επιφέρει την ελάττωση / καταστροφή της μικροχλωρίδας με τη χρήση ειδικών εγκεκριμένων καθαριστικών, σε επίπεδα τόσο χαμηλά ώστε να ανταποκρίνονται στις ελάχιστες απαιτήσεις των υγειονομικών αρχών.

Ο καθαρισμός σε συνδυασμό με το κατάλληλο πρόγραμμα εξυγίανσης, εφαρμόζονται συστηματικά ούτως ώστε κάθε νέος κύκλος παραγωγής να ξεκινάει από μηδενική μικροβιακή βάση. Επιπλέον, ο υπεύθυνος του προγράμματος καθαρισμού και εξυγίανσης οφείλει να είναι καλός γνώστης της παραγωγικής διαδικασίας και να επιτηρεί την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας ανεξάρτητα της παραγωγής. Για το πρόγραμμα καθαρισμού και απολύμανσης πρέπει να υπάρχουν σαφείς οδηγίες εργασίας, που περιγράφουν λεπτομερώς τα στάδια που πρέπει να ακολουθούνται.

1.4.2.1 Τεχνικές Καθαρισμού και Εξυγίανσης

Για τον καθαρισμό των βιομηχανιών τροφίμων χρησιμοποιούνται απορρυπαντικά, τα οποία αφαιρούν ρύπους που σχετίζονται με συγκεκριμένη επεξεργασία τροφίμων και εφαρμόζονται σε καθαρισμό υψηλής πίεσης και εσωτερικού δικτύου (CIP). Τα απορρυπαντικά για να είναι αποτελεσματικά πρέπει να:

1. Έχουν καλή ενυδατική ικανότητα

2. Να απομακρύνουν τους ρύπους από τις διάφορες επιφάνειες
3. Να μην είναι διαβρωτικά
4. Να χαρακτηρίζονται από εύκολη έκπλυση
5. Να είναι άοσμα και ασφαλή για το προσωπικό

Η απόδοση των καθαριστικών επηρεάζεται από το χρόνο επαφής με την επιφάνεια, τη συγκέντρωση και τη θερμοκρασία του διαλύματος και την ποιότητα του νερού (σκληρότητα).

Τα καθαριστικά που συνήθως χρησιμοποιούνται στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων αποτελούν προϊόντα ανάμιξης. Χρησιμοποιούνται ενώσεις αλκαλικές, όπως το καυστικό νάτριο και τα σύνθετα φωσφορικά, σάπωνες, καθώς και όξινες ενώσεις, όπως το φωσφορικό οξύ (Marriott and Gravani 2006).

Όσον αφορά τις τεχνικές εξυγίανσης, εφαρμόζονται συνήθως μετά από ένα ή περισσότερα στάδια καθαρισμού, καθώς είναι περισσότερο αποτελεσματικές σε επιφάνειες που απουσιάζουν οργανικά υλικά. Τα απολυμαντικά που χρησιμοποιούνται:

1. Πρέπει να είναι αποδοτικά κάτω από τις συνθήκες χρήσης τους
2. Πρέπει να είναι ασφαλή για τη χρήση από τους φορείς που τα εφαρμόζουν
3. Δεν πρέπει να επηρεάζουν την γεύση ή την οσμή των προϊόντων που μεταποιοούνται στον εξοπλισμό όπου έγινε χρήση τους
4. Πρέπει να ξεπλένονται εύκολα και να μην αφήνουν τοξικά υπολείμματα
5. Πρέπει να είναι εύκολα στη χρήση.

Οι συνήθεις τεχνικές απολύμανσης μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες, στην απολύμανση με θερμότητα (θερμό νερό ή ατμός) και στην απολύμανση με χημικές ουσίες.

Κατά την απολύμανση με θερμότητα γίνεται είτε εμβάπτιση των αντικειμένων σε ζεστό νερό ή ατμό (> 85°C), είτε εφαρμογή τους στις επιφάνειες επεξεργασίας για 3 με 5 λεπτά. Όσο μεγαλύτερη είναι η θερμοκρασία τόσο λιγότερος είναι ο χρόνος εφαρμογής. Από την άλλη, η

απολύμανση με χημικές ουσίες, γίνεται με χρήση ενώσεων χλωρίου, ιωδίου, αλάτων τεταρτοταγούς αμμωνίου και ισχυρών οξέων και αλκαλίων. Κατά την εφαρμογή τους πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στο χρόνο επαφής, τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση του διαλύματος και στις οδηγίες εφαρμογής (EFET).

Επιπλέον, άλλες εναλλακτικές τεχνικές απολύμανσης θεωρούνται η χρήση ηλεκτρολυμένου νερού, η εφαρμογή υπερήχων, οι φωτοκαταλύτες διοξειδίου του τιτανίου σε συνδυασμό με υπεριώδη ακτινοβολία, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν δεν λειτουργεί η βιομηχανία και οι βακτηριοφάγοι, που αποτελούν μία φυσική μέθοδο ισχυρής βακτηριοκτόνας δραστηριότητας έναντι στοχευμένων ειδών βακτηρίων (Chorianopoulos et al., 2011; Viazis et al., 2011). Τέλος, τα τελευταία χρόνια υπάρχουν κάποιες μελέτες εφαρμογής ψυχρού πλάσματος, το οποίο δύναται να θανατώσει τα βακτηριακά κύτταρα λόγω της εξαιρετικά υψηλής του θερμοκρασίας (Bardos and Brankova, 2010).

Τέλος, για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του καθαρισμού είναι απαραίτητες οι επιθεωρήσεις, κατά τις οποίες χρησιμοποιούνται έντυπα υγιεινής (αρχείο) για το σύνολο των διαδικασιών. Αποτελεσματικός οπτικά καθαρισμός μπορεί να θεωρηθεί όταν δεν υπάρχουν εμφανή υπολείμματα και μικροαποθέσεις στις επιφάνειες καθώς και δυσάρεστες οσμές. Ωστόσο, απαραίτητος είναι ο έλεγχος με διάφορες μεθόδους, όπως οι μικροβιολογικές δοκιμές, η βιοφωταύγεια και η υπεριώδης ακτινοβολία, καθώς και οι μοριακές τεχνικές, οι οποίες δίδουν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Αυτές οι μέθοδοι συμβάλουν στην καλύτερη αξιολόγηση, επαλήθευση και παρακολούθηση του συστήματος καθαρισμού (Cramer, 2006; Tamine, 2008).

1.4.3 Γενικές Απαιτήσεις Υγιεινής για τους Χώρους Τροφίμων

- ✿ Οι χώροι τροφίμων πρέπει να είναι καθαροί και σε καλή κατάσταση.
- ✿ Ο σχεδιασμός, η διαρρύθμιση, η κατασκευής, η χωροθέτηση και οι διαστάσεις των χώρων τροφίμων πρέπει:
 - να επιτρέπουν τις ορθές πρακτικές υγιεινής τροφίμων, συμπεριλαμβανομένης της προστασίας από μόλυνση και ιδίως του ελέγχου των επιβλαβών οργανισμών, καθώς και να αποτρέπουν ή να περιορίζουν στο ελάχιστο την αερόφερτη μόλυνση, όπως και να προστατεύουν από τη συσσώρευση ρύπων, την επαφή με τοξικά υλικά, την πτώση σωματιδίων μέσα στα τρόφιμα και τη συμπύκνωση υδρατμών ή το σχηματισμό ανεπιθύμητης μούχλας στις επιφάνειες.
 - να διαθέτουν κατάλληλο χώρο εργασίας που να επιτρέπει την υγιεινή εκτέλεση όλων των εργασιών, όπως η επαρκής συντήρηση, ο καθαρισμός και η απολύμανση.
- ✿ Επαρκής αριθμός εγκαταστάσεων πλυσίματος ειδικά για το πλύσιμο των χεριών και διαφορετικών για το πλύσιμο των τροφίμων.
- ✿ Κατάλληλο και επαρκές σύστημα φυσικού ή μηχανικού αερισμού, με ροή αέρα από καθαρούς χώρους.
- ✿ Επαρκές σύστημα φυσικού και τεχνητού φωτισμού.
- ✿ Κατάλληλη αποχετευτική εγκατάσταση που να αποκλείει τον κίνδυνο μόλυνσης, καθώς ο σχεδιασμός της θα εξασφαλίζει ότι τα απόβλητα ρέουν πάντα από έναν καθαρό προς ένα μολυσμένο χώρο.
- ✿ Κατάλληλα και επαρκή αποδυτήρια και αποχωρητήρια για το προσωπικό.
- ✿ Τα προϊόντα καθαρισμού και απολύμανσης, αποθηκεύονται σε ειδικούς χώρους και όχι σε αυτούς που χειρίζονται τρόφιμα.

1.4.4 Ειδικές Απαιτήσεις Υγιεινής για τους Χώρους Παρασκευής, Επεξεργασίας ή Μεταποίησης Τροφίμων

- ✿ Πρέπει ο σχεδιασμός και η διαρρύθμιση των χώρων αυτών να επιτρέπει την εφαρμογή ορθής υγιεινής πρακτικής των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένης της πρόληψης της διασταυρούμενης επιμόλυνσης μεταξύ και κατά τη διάρκεια των χειρισμών.
 - Χρήση κατάλληλων στεγανών, μη απορροφητικών και μη τοξικών υλικών στις επιφάνειες των τοίχων, που τους επιτρέπουν να καθαρίζονται και να απολυμαίνονται εύκολα, διατηρούμενοι σε καλή κατάσταση.
 - Δάπεδα με επαρκή επιφανειακή αποστράγγιση.
 - Σχεδιασμένες και κατασκευασμένες οροφές που δεν συσσωρεύουν ρύπους και περιορίζουν τη συμπύκνωση υδρατμών, την ανάπτυξη ανεπιθύμητης μούχλας και την πτώση σωματιδίων.
 - Παράθυρα και ανοίγματα που φέρουν αποσπώμενα δικτυωτά πλέγματα για προστασία από έντομα και τα οποία κατά την διάρκεια της παραγωγής παραμένουν ερμητικά κλειστά.
 - Οι επιφάνειες που βρίσκονται σε χώρους χειρισμού τροφίμων και ιδίως αυτές που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα (εξοπλισμός), πρέπει να είναι λείες, από μη τοξικά υλικά ανθεκτικά στη διάβρωση και να μπορούν να πλένονται και να απολυμαίνονται.
- ✿ Κατάλληλες εγκαταστάσεις με επαρκή παροχή κρύου και ζεστού νερού, για τον καθαρισμό, την απολύμανση και την αποθήκευση των σκευών και του εξοπλισμού εργασίας.
- ✿ Κατάλληλη εγκατάσταση με επαρκή παροχή ζεστού και κρύου πόσιμου νερού για το πλύσιμο των τροφίμων, που δύναται να καθαρίζεται και να απολυμαίνεται εύκολα.

1.4.5 Μεταφορά

- ✿ Πρόκειται για βυτία και δοχεία μεταφοράς τροφίμων:
 - που πρέπει να είναι καθαρά και σε καλή κατάσταση ώστε να προφυλάσσουν τα τρόφιμα από μολύνσεις, καθώς και να μπορούν να καθαριστούν και να απολυμανθούν.
 - που χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για τη μεταφορά τροφίμων.
 - που φέρουν ξεκάθαρη, ευανάγνωστη και ανεξίτηλη επιγραφή «μόνον για τρόφιμα» σε μία ή περισσότερες κοινοτικές γλώσσες.
 - που όταν μεταφέρουν διαφορετικά είδη τροφίμων, καθαρίζονται αποτελεσματικά μεταξύ των φορτώσεων για αποφυγή κινδύνου επιμόλυνσης.
 - που επιτρέπουν τη διατήρηση των τροφίμων στην κατάλληλη θερμοκρασία και τον έλεγχο του επιπέδου της θερμοκρασίας.

1.4.6 Απαιτήσεις Εξοπλισμού

- ✿ Κάθε αντικείμενο, συσκευή ή εξοπλισμός που έρχεται σε άμεση επαφή με το τρόφιμο πρέπει:
 - να καθαρίζεται αποτελεσματικά και να απολυμαίνεται αρκετά συχνά ώστε να αποφεύγεται ο κίνδυνος μόλυνσης.
 - τα υλικά και η κατασκευή του να είναι τέτοια που θα του επιτρέπουν να διατηρείται σε καλή κατάσταση.
 - να είναι εγκατεστημένο με τρόπο που θα επιτρέπει τον επαρκή καθαρισμό του ιδίου και των πέριξ χώρων.
- ✿ Ο εξοπλισμός θα πρέπει να φέρει κάθε κατάλληλη συσκευή ελέγχου.

1.4.7 Απορρίμματα Τροφίμων

- ✿ Τα απορρίμματα τροφών, τα μη εδώδιμα υποπροϊόντα και τα άλλα απορρίμματα πρέπει να:
 - απομακρύνονται το ταχύτερο δυνατό από τους χώρους όπου υπάρχουν τρόφιμα ώστε να αποφεύγεται η συσσώρευση.
 - τοποθετούνται σε δοχεία ειδικής κατασκευής που κλείνουν και μπορούν να καθαρίζονται και να απολυμαίνονται.
- ✿ Οι χώροι αποθήκευσης απορριμμάτων πρέπει να είναι καθαροί και να προλαμβάνουν την είσοδο ζώων και επιβλαβών οργανισμών.
- ✿ Τα υγρά απόβλητα δεν πρέπει να αποτελούν πηγή μόλυνσης είτε άμεσα είτε έμμεσα και πρέπει να απομακρύνονται με φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο.

1.4.8 Παροχή Νερού

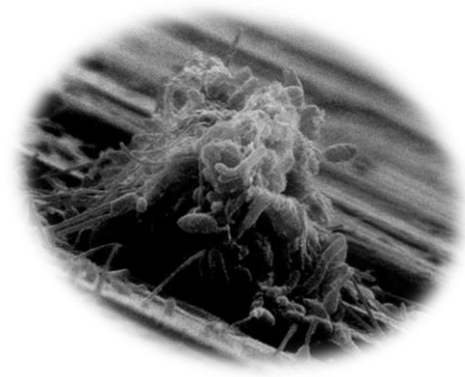
- ✿ Πρέπει να υπάρχει επαρκής παροχή πόσιμου νερού, το οποίο θα χρησιμοποιείται όπως χρειάζεται ώστε να εξασφαλίζεται ότι τα τρόφιμα δεν επιμολύνονται.
- ✿ Σε οποιαδήποτε περίπτωση χρήσης μη πόσιμου νερού, πρέπει αυτό να κυκλοφορεί και να προέρχεται από διαφορετικό δίκτυο παροχής, καθώς και να είναι απαλλαγμένο από κάθε ουσία που παρουσιάζει κίνδυνο για την υγεία ή ενδέχεται να αποτελέσει πηγή μόλυνσης.

2. Βιοϋμένια (*Biofilms*)

Κατά το πλείστο μέρος της ιστορίας της Μικροβιολογίας, οι μικροοργανισμοί έχουν πρωτίστως χαρακτηριστεί ως πλαγκτονικοί (*planktonic*) – ήτοι ελεύθερα μεμονωμένα και εν αιώρηση κύτταρα, υπό τη μορφή υδατικής καλλιέργειας – και περιγραφεί με βάση τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξής τους σε πλούσια θρεπτικά καλλιεργητικά μέσα (Donlan, 2002). Παρόλο που έχει κατηγορηματικά αποδειχθεί ότι οι πλαγκτονικοί πληθυσμοί απαρτίζουν λιγότερο του 0,1% του συνόλου της μικροβιακής κοινότητας (Costerton et al., 1995), η μελέτη των κυττάρων είχε εστιάσει στις αμιγείς και ομοιογενείς καλλιέργειες για πέραν του ενός αιώνα (Lens et al., 2003). Ένεκεν τούτου δε δόθηκε η ανάλογη σημασία στον τρόπο με τον οποίο τα μικρόβια αναπτύσσονται σε πολύπλοκες κοινωνίες – όπου δεν υπάρχουν ούτε δρουν μεμονωμένα, μα αποτελούν δομικά και εν δυνάμει πολύπλοκα βιολογικά συστήματα (Antoniadou and Andresakis, 2008).

Στο φυσικό περιβάλλον ένας ή συσσωματώματα μικροοργανισμών αναπτύσσουν πολύ καλά οργανωμένες μικροβιακές κοινότητες – τα καλούμενα βιοϋμένια (Εικόνα 2.1) – που απαντώνται επάνω σε επιφάνειες, όπως οι όχθες ενός ποταμού, τα ανθρώπινα δόντια, οι πνεύμονες ή το έντερο ενός ζώου (Costerton et al., 1978), καθώς και τα υλικά και τα μηχανήματα στον ιατρικό και στον βιομηχανικό χώρο. Συγκεκριμένα στη βιομηχανία τροφίμων συναντώνται στις επιφάνειες επεξεργασίας των τροφίμων, στους χώρους αποθήκευσης, στα μηχανήματα και στα διάφορα εξαρτήματα κι εργαλεία (λόγου χάριν μαχαίρια κοπής) της παραγωγικής διαδικασίας· αλλά και σε σημεία που δεν έρχονται σε άμεση επαφή με τα τρόφιμα, όπως τα πατώματα, οι τοίχοι και οι υδρορροές (Kells and Gilmour, 2004).

Εικόνα 2.1 Βιοϋμένιο σε Βιομηχανικό
Εναλλάκτη Θερμότητας



Ο όρος βιοϋμένιο αποδίδεται σε μία μικροβιακή κοινότητα, η οποία χαρακτηρίζεται από κύτταρα που είναι αμετάκλητα προσκολλημένα σε μία – αβιοτική ή μη – επιφάνεια ή διεπιφάνεια και εγκλείονται εντός ενός στρώματος εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (*extracellular polymeric substances – EPSs*), που έχουν παραχθεί από τα ίδια τα μικρόβια. Αυτοί οι προσκολλημένοι μικροοργανισμοί (*sessile*) εμφανίζουν έναν σαφώς διαφοροποιημένο φαινότυπο σε ότι αφορά το ρυθμό ανάπτυξης και τη γονιδιακή έκφραση από τους αντίστοιχα ελεύθερους πλαγκτονικούς (*planktonic*) (Melabianaki et al., 2007).

Επιπρόσθετα, οι μικροοργανισμοί με την οργάνωσή τους σε βιοϋμένια καταφέρνουν να ανταγωνίζονται την εγκατάσταση άλλων παθογόνων στην ίδια εστία, με τις μικροβιακές κοινωνίες να αποτελούν μία δυναμική μορφή επιβίωσης των περιβαλλοντικών παθογόνων, τα οποία είναι μία σημαντική αιτία πρόκλησης ασθενειών (Stamou et al., 2014). Έχει υπολογιστεί ότι το 65% των λοιμώξεων στον άνθρωπο οφείλονται σε βακτήρια που ασκούν τη λοιμογόνο δράση τους μέσω των βιοϋμενίων (Potera, 1999) και σύμφωνα με δημόσια ανακοίνωση των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής – τα βιοϋμένια είναι ιατρικώς σημαντικά, καθώς σχετίζονται με περισσότερο από το 80% των μικροβιακών λοιμώξεων στο ανθρώπινο σώμα (Davies, 2003).

2.1 Ιστορική Αναδρομή

Μια σύντομη αναδρομή στην ιστορία των βιοϋμενίων φανερώνει την ύπαρξή τους πολύ καιρό πριν ο οποιοσδήποτε είχε την παραμικρή ιδέα του τι ή πόσο σημαντικά ήταν. Η αρχή του νήματος τοποθετείται τον 17^ο αιώνα και πιο συγκεκριμένα το 1684, όπου ο Ολλανδός Antonie van Leeuwenhoek σε έκθεσή του στην Βασιλική Εταιρία του Λονδίνου περιέγραψε τα βιοϋμένια ως μικρά ζώακια (*animalcules*). Με χρήση των απλών μικροσκοπιών του μπόρεσε να δει την τεράστια συσσώρευση των μικροοργανισμών στην οδοντική πλάκα και έγραψε πως «Ο αριθμός αυτών των μικρών ζώων στην τρυγία των δοντιών ενός άντρα είναι τόσο μεγάλος που πιστεύω ότι υπερβαίνουν τον αριθμό των αντρών σε ένα βασίλειο».

Αυτή η αναφορά θεωρείται η πρώτη επιστημονική έκθεση σχετικά με τα βιοϋμένια (Clarke, 1828; Sauer et al., 2007).

Τρεις περίπου αιώνες αργότερα ο Arthur Henrici (1932) κατέληξε στο συμπέρασμα πως «είναι προφανές ότι το μεγαλύτερο μέρος των βακτηρίων του ύδατος δεν είναι ελεύθεροι αιωρούμενοι οργανισμοί, αλλά αναπτύσσονται επάνω σε βυθισμένες επιφάνειες». Κάτι που προέκυψε τυχαία από την προσπάθειά του να παρατηρήσει *in situ* τα φύκη στα τοιχώματα του ενυδρείου στο εργαστήριό του. Η χρώση των αντικειμενοφόρων πλακών, που βύθισε στο ενυδρείο για μία εβδομάδα, φανέρωσε πέραν από τα φύκη κι ένα λεπτό και ομοιόμορφο στρώμα βακτηρίων, τα οποία ήταν σθεναρά προσκολλημένα στο γυαλί (δεν απομακρύνονταν με πλύσιμο σε τρεχούμενο νερό) και εμφάνιζαν μικροαποικίες σταθερά αυξανόμενου μεγέθους, όπου μετά από ένα σημείο δεν μπορούσε να διακρίνει μεμονωμένα κύτταρα. Επιπλέον, παρατήρησε ομάδες κυττάρων που περιβάλλονταν από μία «κάψα ρητίνης» (*sheath of gum*), η οποία χρησίμευε στην προσκόλληση της αποικίας στο γυαλί.

Ακολούθως μελέτες στα φυσικά υδάτινα οικοσυστήματα επισήμαναν την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα των βακτηρίων που ήταν προσκολλημένα σε μία επιφάνεια (Heukelekian and Heller, 1940), έτι δε ότι ο αριθμός των βακτηρίων σε βυθισμένες επιφάνειες ήταν δραματικά υψηλότερος από ότι στο θαλασσινό νερό (Zobell, 1943). Η ανακάλυψη του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου αποτέλεσε κομβικό σημείο στην ιστορία, καθώς μελέτες των βιοϋμενίων σε φίλτρα στάλαξης μονάδας επεξεργασίας λυμάτων φανέρωσαν την ποικιλία των μικροοργανισμών (με βάση την μορφολογία των κυττάρων) που τα αποτελούν και παράλληλα με τη βοήθεια της ειδικής χρωστικής «Κόκκινο Ρουθίνιο» απέδειξαν ότι το υλικό που περιβάλλει και περικλείει τα κύτταρα στα βιοϋμένια είναι πολυσακχαρίτης (Jones et al., 1969).

Προσέτι, η δεκαετία του 70 αποτέλεσε την στιγμή εκείνη από την οποία οι μελέτες των βιοϋμενίων εντατικοποιήθηκαν και κινήθηκαν εκ παραλλήλου στις βιομηχανίες, στο φυσικό περιβάλλον και στα περιβάλλοντα που σχετίζονται περισσότερο με τη δημόσια υγεία (Donlan, 2002). Στο γεγονός αυτό συνέτειναν η εύρεση βιοϋμενίων στα βιομηχανικά

συστήματα ύδατος, τα οποία δεν ήταν μόνο πολύ ισχυρά προσκολλημένα αλλά και άκρως ανθεκτικά σε απολυμαντικά – όπως το χλώριο (Characklis, 1973), καθώς και η θεωρία που αναπτύχθηκε από τους Costerton et al. (1978) και εξηγούσε τους μηχανισμούς με τους οποίους οι μικροοργανισμοί προσκολλώνται σε βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες και τη σημασία αυτής τους της θέσης. Η προσκόλληση πραγματοποιείται μέσω του γλυκοκάλυκα, ενός σχηματισμού που καθορίζει τις συγκεκριμένες θέσεις των ειδών βακτηρίων στα φυσικά περιβάλλοντα – δημιουργώντας μία εμφανή κοινότητα – προσδίδοντας στους προσκολλημένους πληθυσμούς μοναδική πλαστικότητα στις αλλαγές των συνθηκών, όπου βακτήρια σε «λάθος» βιοθέση (*niche*) δεν θα επιβιώσουν και θα αποτελέσουν πηγή θρεπτικών συστατικών για τα κατάλληλα.

Τέλος, μολονότι υφίσταται μια αναγνωρισμένη και επιστημονικά τεκμηριωμένη άποψη για την ύπαρξη και το σχηματισμό των βιοϋμενίων εδώ και έναν αιώνα, μόνο στη διάρκεια των τελευταίων χρόνων έχει καταστεί δυνατή η μελέτη γύρω από το γενετικό υπόβαθρο της ανάπτυξης των βιοϋμενίων (O' Toole et al., 2000).

2.2 Δομή και Σχηματισμός Βιοϋμενίων

2.2.1 Δομή του Βιοϋμενίου

Στην δομή του βιοϋμενίου τα ακινητοποιημένα μικροβιακά κύτταρα βρίσκονται ενσωματωμένα σε ένα σύνθετο σύστημα εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών, παρουσία ύδατος (Belessi, 2014). Ειδικότερα, σε ένα πλήρως ενυδατωμένο βιοϋμένιο το 15% του όγκου του αποτελείται από τα μικροβιακά κύτταρα και το 85% κατ' όγκον από το στρώμα εξωκυτταρικής πολυμερούς ουσίας (Donlan and Costerton, 2002).

Οι κύριες δομικές μονάδες που απαρτίζουν ένα βιοϋμένιο είναι:

- η Επιφάνεια Προσκόλλησης
- τα Μικροβιακά Κύτταρα
- η Εξωκυτταρική Πολυμερής Ουσία

και άνευ αυτών δεν δύναται να υφίσταται ο σχηματισμός του.

2.2.2 Σημαντικοί Παράγοντες για την Κυτταρική Προσκόλληση

Η προσκόλληση των μικροοργανισμών επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά:

- της επιφάνειας προσκόλλησης
- του υδατικού μέσου
- των μικροβιακών κυττάρων

τα οποία αποτελούν σημαντικούς παράγοντες διαμόρφωσης των προϋποθέσεων για την κυτταρική προσκόλληση και κατά συνέπεια το σχηματισμό του βιοϋμενίου.

Πίνακας 2.2.2.1. Σημαντικοί Παράγοντες Κυτταρικής Προσκόλλησης (Donlan, 2002)

Επιφάνεια Προσκόλλησης	Υδατικό Μέσο	Μικροβιακά Κύτταρα
υφή / τραχύτητα	υδροδυναμική	υδροφοβικότητα
υδροφοβικότητα	pH	κινητικότητα
ρυθμιστική μεμβράνη	θερμοκρασία	εξωκυτταρική πολυμερής ουσία
	ιοντική ισχύς	
	θρεπτικά επίπεδα	

Όπως προκύπτει από τον πίνακα η προσκόλληση των μικροοργανισμών σε επιφάνειες είναι μία πολύπλοκη διαδικασία με πολλές μεταβλητές να επηρεάζουν το αποτέλεσμα. Σε γενικές γραμμές η προσκόλληση θα συμβεί πιο εύκολα σε επιφάνειες που είναι πιο τραχιές, πιο υδρόφοβες και επικαλυμμένες με ρυθμιστική μεμβράνη. Αύξηση στην ταχύτητα ροής, στη θερμοκρασία του νερού ή στη συγκέντρωση των θρεπτικών μπορούν επίσης να συμβάλουν στην αυξημένη προσκόλληση, αν αυτοί οι παράγοντες δεν υπερβούν τα κρίσιμα επίπεδα. Τέλος, οι ιδιότητες της επιφάνειας του κυττάρου και ειδικότερα η παρουσία κροσσών, μαστιγίων, καθώς και οι συνδεδεμένοι πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες είναι εξίσου σημαντικά και μπορούν να παράσχουν ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα σε έναν μικροοργανισμό που εμπλέκεται σε μια μικτή κοινότητα (Donlan, 2002).

2.2.2.1 Επιφάνεια Προσκόλλησης

Το είδος και οι φυσικοχημικές ιδιότητες – η τραχύτητα, η υδροφοβικότητα και το φορτίο – της επιφάνειας προσκόλλησης αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για το σχηματισμό του βιοϋμενίου (Herzberg et al., 2009). Επιπλέον, η ρυθμιστική μεμβράνη (*conditioning film*), η οποία δημιουργείται στη διεπιφάνεια μεταξύ του υδάτινου μέσου και της επιφάνειας, τροποποιεί την επιφάνεια με τέτοιο τρόπο ώστε να παρέχει το ιδανικό περιβάλλον για την προσκόλληση των μικροβιακών κυττάρων.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες και συγκεκριμένα η επιφανειακή τραχύτητα, αναφέρεται στην κλίση, την ομαλότητα και την τοπολογία σε κορυφές και κοιλάδες (Lee et al. 2010). Η έκταση της μικροβιακής αποίκησης φαίνεται να αυξάνει καθώς αυξάνεται η τραχύτητα της επιφάνειας και αυτό συμβαίνει διότι οι δυνάμεις διάτμησης ελαττώνονται λόγω της διαταραχής στην ροή του υγρού. Επιπλέον, η αυξημένη τραχύτητα άμεσα ερμηνεύεται σε περισσότερο διαθέσιμο χώρο για τη προσκόλληση των κυττάρων, λόγω των κορυφών και των κοιλάδων (Donlan, 2002; Pasmore et al., 2001). Τέλος, η επιφανειακή τραχύτητα επηρεάζει περισσότερο την ανάπτυξη των νεότερων βιοϋμενίων από τα ώριμα (Pang et al., 2005).

Σε ότι αφορά την υδροφοβικότητα της επιφάνειας, έχει βρεθεί ότι οι αδρανείς επιφάνειες επηρεάζουν την αντοχή και την κινητική της μικροβιακής προσκόλλησης (Ridgway et al., 1999). Έχει προταθεί ότι μία υδρόφοβη επιφάνεια προσελκύει βακτήρια με υδρόφοβη επιφάνεια, ενώ μία υδρόφιλη επιφάνεια προσελκύει βακτήρια με υδρόφιλη επιφάνεια (An and Friedman, 1998; Katsikogianni and Missirlis, 2004). Επιπλέον, πλήθος μελέτες έχουν δείξει ότι οι μικροοργανισμοί προσκολλούνται πιο γρήγορα σε υδρόφοβες, μη πολικές επιφάνειες όπως το Teflon και άλλα πλαστικά παρά σε υδρόφιλα υλικά όπως το γυαλί ή το μέταλλο (Donlan, 2002).

Ακόμη, το ηλεκτροστατικό φορτίο της επιφάνειας μπορεί να επηρεάσει τις ελκτικές και απωστικές δυνάμεις μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων και της επιφάνειας (Pasmore et al., 2001). Έχει μάλιστα προταθεί ότι το ηλεκτροστατικό φορτίο ασκεί ισχυρότερη επίδραση από την υδροφοβικότητα της επιφάνειας (Koo et al., 2002). Το αρνητικό φορτίο μιας επιφάνειας μπορεί να μειώσει την προσκόλληση καθώς αναπτύσσεται

ηλεκτροστατική άπωση με την αρνητικά φορτισμένη βακτηριακή επιφάνεια (Her et al., 2000).

Όσον αφορά το είδος της επιφάνειας σχεδόν σε όλα τα είδη, τόσο οργανικές (τρόφιμα, ζώα, άνθρωπος) όσο και ανόργανες (μεταλλικές, γυάλινες, πλαστικές κ.ά.), οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να σχηματίσουν βιοϋμένια. Οι επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα λειτουργούν καλύτερα σαν υποστρώματα σε σχέση με επιφάνειες πολυμερών πλαστικών (PVC) ή γυαλιού. Λόγω της σταθερής φύσης του, ο ανοξειδωτός χάλυβας χρησιμοποιείται ευρέως τόσο στη βιομηχανία τροφίμων όσο και σε σημεία χειρισμού των τροφίμων από τους καταναλωτές (εμπορικά και οικιακά) (Wilks et al., 2006).

Τέλος, μία επιφάνεια που εκτίθεται σε ένα υδατικό μέσο, αναπόφευκτα και σχεδόν σε δευτερόλεπτα ρυθμίζεται ή επιστρώνεται με πολυμερή από το υδατικό μέσο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της ρυθμιστικής μεμβράνης. Στο σχηματισμό της επιδρούν οι παράγοντες της επιφάνειας, η υδροδυναμική του υδατικού μέσου και τα χαρακτηριστικά του υδατικού μέσου. Οι Loeb and Neihof (1975), ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν αυτό το σχηματισμό και διαπίστωσαν ότι είναι οργανικής φύσης. Αξιοσημείωτο είναι ότι η φύση της ρυθμιστικής μεμβράνης είναι αρκετά διαφορετική στα διάφορα περιβάλλοντα (Donlan, 2002).

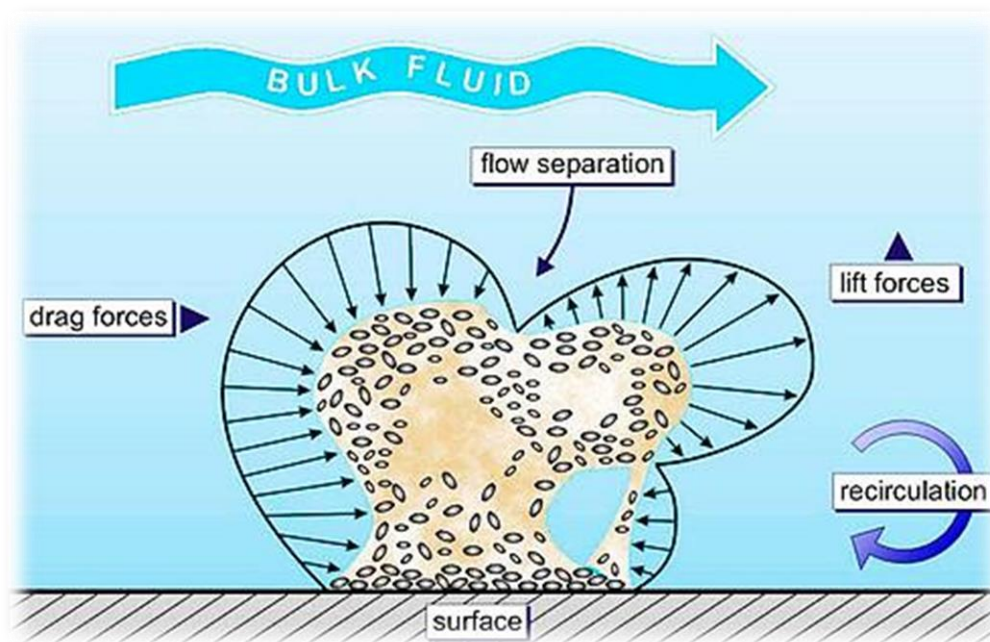
Ένας από τους ρόλους της ρυθμιστικής μεμβράνης είναι να εξουδετερώνει το υπερβολικό φορτίο και την ελεύθερη ενέργεια της επιφάνειας, τα οποία μπορούν να εμποδίσουν ένα βακτηριακό κύτταρο να την προσεγγίσει αρκετά ώστε να αρχίσει η διαδικασία της προσκόλλησης (Melabianaki et al., 2007). Αποτελεί το υπόστρωμα για τους μικροοργανισμούς, ενώ παράλληλα τροποποιεί τις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας (ηλεκτροστατικό φορτίο, υδροφοβικότητα), ευνοώντας την μετέπειτα προσκόλληση των κυττάρων (Hood and Zottola, 1997).

2.2.2.2 Υδατικό Μέσο

Η υδροδυναμική και τα χαρακτηριστικά του υδατικού μέσου, όπως το pH, τα θρεπτικά επίπεδα, η ιοντική ισχύς και η θερμοκρασία μπορούν να παίξουν καθοριστικό ρόλο στο ρυθμό της μικροβιακής προσκόλλησης (Donlan, 2002). Η υδροδυναμική αναφέρεται στην ταχύτητα και στο ρυθμό ροής του μέσου και θεωρείται σε μεγάλο βαθμό κυρίαρχος παράγοντας επίδρασης της βακτηριακής προσκόλλησης και της δομής του βιοϋμενίου (Stoodley et al., 1999; Isberg and Barnes, 2002). Θεωρητικά η ταχύτητα ροής που είναι άμεσα παρακείμενη της διεπιφάνειας υποστρώματος και υγρού μέσου είναι αμελητέα. Η ζώνη που είναι αμελητέας ροής ονομάζεται υδροδυναμικό οριακό στρώμα. Το πάχος του εξαρτάται από τη γραμμική ταχύτητα, όπου όσο υψηλότερη είναι η ταχύτητα τόσο λεπτότερο είναι το οριακό στρώμα. Η περιοχή εκτός του οριακού στρώματος χαρακτηρίζεται από σημαντικές αναμειξεις και στροβιλισμούς. Για καθεστώς ροής που χαρακτηρίζονται από ομαλή ή ελάχιστα τυρβώδη ροή, το υδροδυναμικό οριακό στρώμα μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου – υποστρώματος (Donlan, 2002).

Τα κύτταρα εντός ενός υγρού συμπεριφέρονται ως σωματίδια όπου ο ρυθμός προσκόλλησής τους θα εξαρτηθεί σε μεγάλο βαθμό από τα χαρακτηριστικά της ταχύτητας του υγρού. Κάτω από πολύ χαμηλές γραμμικές ταχύτητες, τα κύτταρα πρέπει να διασχίσουν το μεγάλο υδροδυναμικό οριακό στρώμα και η προσκόλληση με την επιφάνεια θα εξαρτηθεί σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος και την κυτταρική κινητικότητα των κυττάρων. Καθώς η ταχύτητα αυξάνεται, το οριακό στρώμα ελαττώνεται και τα κύτταρα θα υποβληθούν σε ολοένα και μεγαλύτερη αναταραχή και ανάμειξη (Donlan, 2002).

Στα φυσικά περιβάλλοντα, η τυρβώδης ροή (Εικόνα 2.2.2.2) αποτελεί τον κανόνα. Τα βιοϋμένια που αναπτύσσονται υπό στρωτή ροή και χαμηλούς ρυθμούς ροής τείνουν να είναι παχύτερα αλλά λιγότερο πυκνά από εκείνα που αναπτύσσονται υπό συνθήκες τυρβώδους ροής, τα οποία είναι λεπτότερα αλλά πυκνότερα, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στη χαμηλότερη απόδοση ανάπτυξης που λαμβάνεται όταν ο ρυθμός διάτμησης είναι αυξημένος (Chang et al., 1991; Katsikogianni and Missirlis, 2004).



Εικόνα 2.2.2.2 Υδροδυναμικές δυνάμεις σε Τυρβώδη Ροή (Brett Towler; Peg Dirckx, 2004)

Εκ των ανωτέρω προκύπτει το συμπέρασμα πως οι υψηλότερες γραμμικές ταχύτητες όχι μόνο δεν εμποδίζουν την βακτηριακή προσκόλληση αλλά συμβάλλουν και στην ταχύτερη σύνδεσή τους με την επιφάνεια (Dreeszen, 2003), τουλάχιστον μέχρι η ταχύτητα να γίνει αρκετά υψηλή ώστε να ασκήσει σημαντικές δυνάμεις διατμήσεως στα προσκολλημένα κύτταρα, με αποτέλεσμα την αποκόλλησή τους (Donlan, 2002).

Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του υδατικού μέσου, και συγκεκριμένα τα θρεπτικά επίπεδα, είναι γνωστό ότι τα βακτήρια απαιτούν ορισμένα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους. Αύξηση της συγκέντρωσης των θρεπτικών συνεπάγεται αύξηση του αριθμού των προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων (Cowan et al., 1991). Τα βιοϋμένια θα φτάσουν σε ένα συγκεκριμένο πάχος ισορροπίας ανάλογα με τη δύναμη διάτμησης και τα διαθέσιμα επίπεδα θρεπτικών συστατικών (Dreeszen, 2003).

Επιπρόσθετα, η ιοντική ισχύς και το pH επηρεάζουν την βακτηριακή προσκόλληση με επίδραση στα χαρακτηριστικά της κυτταρικής επιφάνειας, όπως η υδροφοβικότητα και το φορτίο, όπου παρατηρήθηκε μεγαλύτερη προσκόλληση σε υδρόφοβες επιφάνειες που βρέθηκαν σε pH στην περιοχή του ισοηλεκτρικού σημείου όταν τα βακτήρια ήταν αφόρτιστα (Bunt et al., 1993; Katsikogianni and Missirlis, 2004). Μελέτες του Fletcher (1988) έδειξαν

ότι η αύξηση στη συγκέντρωση διαφόρων κατιόντων (νάτριο, ασβέστιο, τρισθενής σίδηρος) επηρεάζει τη προσκόλληση, πιθανώς λόγω μείωσης των απωθητικών δυνάμεων μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων βακτηριακών κυττάρων και των γυάλινων επιφανειών

2.2.2.3 Μικροβιακά Κύτταρα

Οι διάφορες ιδιότητες της επιφάνειας των κυττάρων επιδρούν στην προσκόλληση. Η υδροφοβικότητα της κυτταρικής επιφάνειας, η παρουσία κροσσών και μαστιγίων και η παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών επηρεάζουν τον ρυθμό και την έκταση της προσκόλλησης των μικροβιακών κυττάρων.

Η υδροφοβικότητα της κυτταρικής επιφάνειας είναι σημαντική στην προσκόλληση καθώς οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις τείνουν να αυξάνουν με την αύξηση του μη πολικού χαρακτήρα της μίας ή αμφότερων των εμπλεκόμενων επιφανειών (επιφάνεια μικροβιακού κυττάρου και επιφάνεια του υποστρώματος). Ο Donlan (2002) παρατήρησε πως κάποια υδρόφοβη αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα μεταξύ της κυτταρικής επιφάνειας και του υποστρώματος, η οποία επιτρέπει στα κύτταρα να ξεπεράσουν απωθητικές δυνάμεις, που ενεργοποιούνται μέσα σε μία ορισμένη απόσταση από την επιφάνεια και τελικά να προσκολληθούν αμετάκλητα. Τα περισσότερα βακτήρια είναι αρνητικά φορτισμένα αλλά εξακολουθούν να περιέχουν υδρόφοβα συστατικά στην επιφάνειά τους. Στελέχη με υδροφοβικότητα μεγαλύτερη του 70% θεωρούνται υψηλά υδρόφοβα, ενώ εκείνα με υδροφοβικότητα μικρότερη του 30% χαρακτηρίζονται ως υψηλά υδρόφιλα (Krevvata, 2010).

Παράλληλα, φαίνεται πως η κινητικότητα συμβάλλει σημαντικά στην προσκόλληση. Οι κροσσοί συμβάλλουν στην κυτταρική υδροφοβικότητα καθώς πιθανώς βοηθούν τα κύτταρα να ξεπεράσουν το αρχικό ηλεκτροστατικό φράγμα άπωσης που υπάρχει μεταξύ κυττάρου και υποστρώματος (Donlan, 2002). Τα μαστίγια επίσης, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στα πρώτα στάδια της προσκόλλησης, καθώς και αυτά βοηθούν τα κύτταρα να ξεπεράσουν τις απωστικές δυνάμεις που

σχετίζονται με το υπόστρωμα. Φαίνεται πως τα κύτταρα με κινητικότητα δύνανται να προσκολλώνται σε μεγαλύτερους αριθμούς, ενώ αξιοσημείωτο είναι ότι προσκολλώνται ταχύτερα ενάντια στην ροή από τα μη κινητά, τα οποία αργούν να σχηματίσουν βιοϋμένιο (Donlan, 2002).

Με πλέον σχηματισμένη την εικόνα της δομής της κυτταρικής επιφάνειας, αποτελούμενη από κροσσούς, πρωτεΐνες, λιποπολυσακχαρίτες (LPS), εξωπολυσακχαρίτες (EPS) και μαστίγια, μπορεί επιπλέον να διακριθεί ότι τα πολυμερή με μη πολικά σημεία, όπως οι κροσσοί, οι πρωτεΐνες και τα συστατικά ορισμένων Gram – θετικών βακτηρίων (μυκολικά οξέα) κυριαρχούν στην προσκόλληση σε υδρόφοβα υποστρώματα, ενώ οι EPS και LPS είναι πιο σημαντικοί στην προσκόλληση σε υδρόφιλα υλικά. Τα μαστίγια είναι εξίσου σημαντικά στην προσκόλληση, αν και ο ρόλος τους φαίνεται να είναι η υπερπήδηση των απωθητικών δυνάμεων (Donlan, 2002).

2.2.2.3.1 Εξωκυτταρική Πολυμερής Ουσία (EPS) – Γλυκοκάλυκας

Η εξωκυτταρική Πολυμερής Ουσία μπορεί να ευθύνεται για το 50 – 90% του ολικού οργανικού άνθρακα των βιοϋμενίων (Flemming et al., 2000) και μπορεί να θεωρηθεί ως το κύριο υλικό της μήτρας του βιοϋμένιου. Επιπλέον, μπορεί να ποικίλει σε χημικές και φυσικές ιδιότητες αλλά αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες, μερικοί από τους οποίους είναι ουδέτεροι ή πολυανιονικοί, όπως συμβαίνει στα Gram – αρνητικά βακτήρια, ενώ στα Gram – θετικά η χημική σύνθεση είναι διαφορετική και κατά κύριο λόγο είναι κατιονικοί.

Η EPS είναι ιδιαίτερα ενυδατωμένη καθώς μπορεί να ενσωματώσει μεγάλες ποσότητες νερού στη δομή της με δεσμούς υδρογόνου. Μπορεί επίσης να είναι υδρόφοβη, αν και οι περισσότεροι τύποι EPS είναι τόσο υδρόφιλοι όσο και υδρόφοβοι, καθώς και ποικίλουν σε διαλυτότητα. Η σύνθεση και η δομή των πολυσακχαριτών καθορίζει την πρωτογενή διαμόρφωσή τους, όπου οι σκελετικές δομές τους, τους καθιστούν πιο άκαμπτους, λιγότερο παραμορφώσιμους και ελάχιστα διαλυτούς ή αδιάλυτους, ενώ άλλα μόρια EPS μπορεί να είναι άμεσα διαλυτά στο νερό.

Επιπρόσθετα, οι εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες των βιοϋμενίων δεν είναι γενικά ομοιόμορφες αλλά μπορεί να ποικίλουν χωρικά και χρονικά. (Sutherland, 2001).

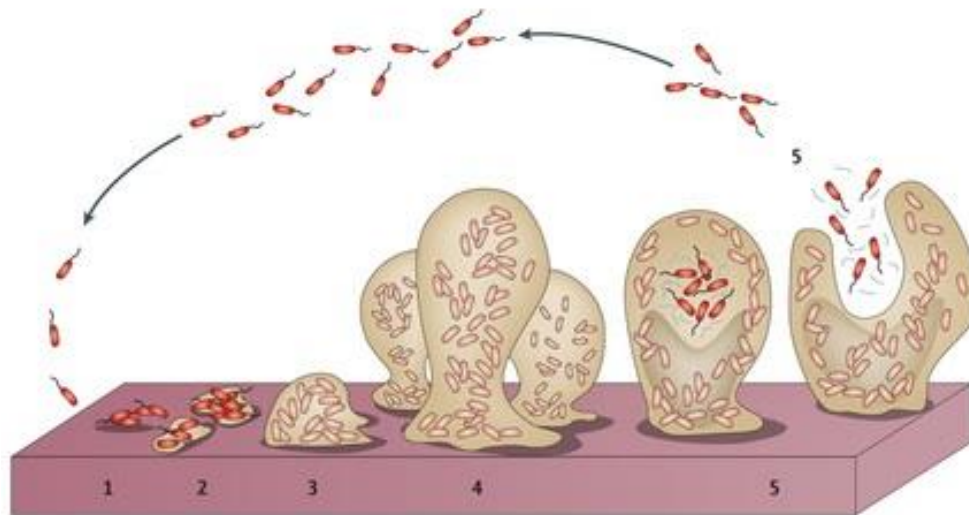
Αξιοσημείωτο είναι ότι οι διαφορετικοί οργανισμοί παράγουν διαφορετικές ποσότητες EPS, καθώς και ότι η ποσότητα των EPS αυξάνει με την ηλικία του βιοϋμενίου (Donlan, 2002). Οι EPS μπορούν να συνδεθούν με μεταλλικά ιόντα, δισθενή κατιόντα και άλλα μακρομόρια (όπως πρωτεΐνες, DNA, λιπίδια) (Flemming et al., 2000). Η παραγωγή της EPS επηρεάζεται από τα επίπεδα των θρεπτικών συστατικών του μέσου ανάπτυξης, όπου περίσσεια διαθέσιμου άνθρακα και περιορισμός αζώτου, καλίου ή φωσφόρου προάγουν τη σύνθεση της EPS. Επιπλέον η αργή ανάπτυξη των βακτηρίων ενισχύει την παραγωγή της EPS (Sutherland, 2001). Τέλος, επειδή η EPS είναι εξαιρετικά ενυδατωμένη μπορεί να αποτρέψει την αφυδάτωση σε ορισμένα φυσικά βιοϋμενία, καθώς και μπορεί να συμβάλει στην αντιμικροβιακή αντοχή των βιοϋμενίων, εμποδίζοντας τη μεταφορά των αντιβιοτικών μέσω του βιοϋμενίου, πιθανόν με απευθείας σύνδεση με αυτούς του παράγοντες (Donlan, 2002).

2.2.3 Σχηματισμός του Βιοϋμενίου

2.2.3.1 Στάδια Σχηματισμού του Βιοϋμενίου

Ο μηχανισμός σχηματισμού ενός βιοϋμενίου περιλαμβάνει τέσσερις διακριτές φάσεις (Εικόνα 2.2.3.1):

- Προσκόλληση των Κυττάρων
- Ανάπτυξη και Πολλαπλασιασμό των Κυττάρων
- Σχηματισμό Τρισδιάστατης Δομής
- Αποκόλληση Επιφανειακών Κυττάρων



Nature Reviews | Microbiology

Εικόνα 2.2.3.1 Υποτυπώδης Απεικόνιση των Σταδίων Σχηματισμού

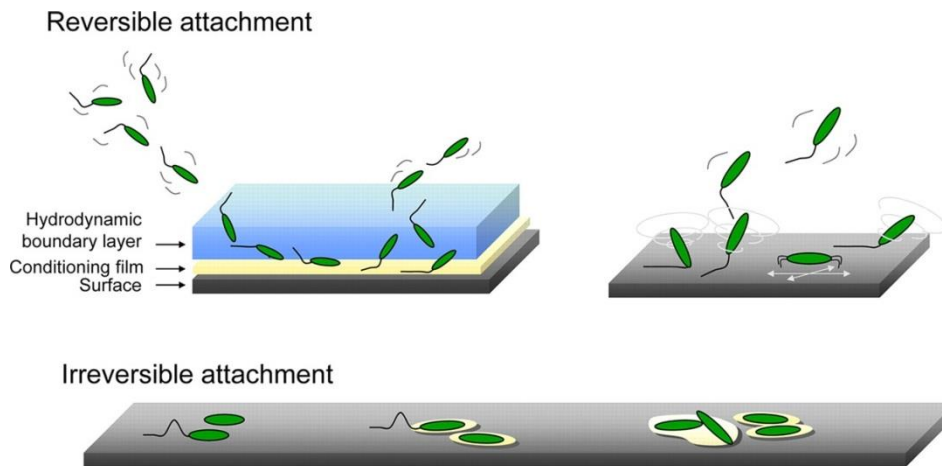
Τα βακτήρια διαμορφώνοντας το σχηματισμό του βιοϋμενίου, δύνανται να επιβιώνουν προστατευμένα εντός αυτού για χρόνια, διαγράφοντας διαρκώς κύκλους Προσκόλλησης – Σχηματισμού – Αποκόλλησης.

2.2.3.2 Περιγραφή Μηχανισμού Σχηματισμού

Ο σχηματισμός ενός βιοϋμενίου είναι μια πολυσύνθετη φυσική διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα σχεδόν οπουδήποτε υπάρχουν μικροοργανισμοί και επιφάνειες και περιλαμβάνει μία ακολουθία βημάτων. Αρχικά, η γένεση του βιοϋμενίου επέρχεται τη στιγμή της δημιουργίας της μεμβράνης περιβαλλοντικής προσαρμογής / ρυθμιστικής μεμβράνης (*conditioning film*), που αποτελεί το υπόστρωμα ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Απαρτίζεται από νερό και οργανικά μόρια (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες κ.ά.), των οποίων η βιοχημική σύνθεση ποικίλει ανάλογα με το περιβάλλον έκθεσης των διαφόρων επιφανειών προσκόλλησης (Vamvacopoulou et al, 2003).

Ακολούθως, τα μικροβιακά κύτταρα που κινούνται ως ελεύθερα πλαγκτονικά προσεγγίζουν την επιφάνεια και το υπόστρωμα που έχει δημιουργηθεί και πιο συγκεκριμένα το υδροδυναμικό οριακό στρώμα, όπου σταδιακά προσκολλούνται. Η προσέγγιση επιτυγχάνεται είτε παθητικά μέσω της διάχυσης και της βαρύτητας της δυναμικής ροής του υγρού μέσου, είτε ενεργητικά με τη φυσική κινητικότητα των μικροβίων (μαστίγια, κροσσοί, τριχίδια) (Kumar and Anand, 1998; Bixler and Bhushan, 2012). Σε

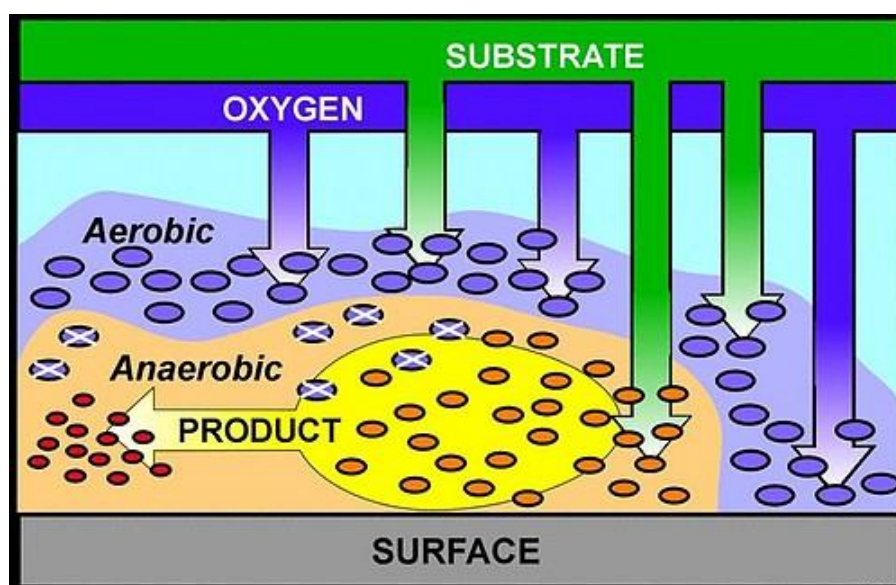
αυτό το σημείο έγκειται η αρχή της μετάβασης των μικροοργανισμών από ελεύθερα αιωρούμενα πλαγκτονικά κύτταρα σε σταθερά προσκολλημένα, με την εμφάνιση δύο μορφών προσκόλλησης (Εικόνα 2.2.3.2.1).



Εικόνα 2.2.3.2.1 Αντιστρεπτή και μη Αντιστρεπτή Προσκόλληση (ASM)

Η πρώτη προσκόλληση χαρακτηρίζεται ως αντιστρεπτή (*reversible attachment*) καθώς οι φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροβιακών κυττάρων με τη ρυθμιστική μεμβράνη είναι ηλεκτροστατικής φύσεως, ήτοι ασθενείς δυνάμεις Van der Waals. Επιπλέον, σε αυτή τη φάση η κίνηση Brown είναι εμφανής στα κύτταρα που διατηρούν την κινητικότητά τους και προσκρούουν στην επιφάνεια, προσκολλώνται για κάποιο χρονικό διάστημα και αποκολλώνται από αυτήν (με απλή έκπλυση). Εκ παραλλήλου, μέρος των προσκολληθέντων κυττάρων σχηματίζουν δομές που θα τους εξασφαλίσουν την μη αντιστρεπτή προσκόλληση (*irreversible attachment*) στην επιφάνεια. Ισχυρότερες δυνάμεις λαμβάνουν χώρα, όπως δυνάμεις υδρογόνου, ομοιοπολικοί και ιονικοί δεσμοί και αλληλεπιδράσεις διπόλου – διπόλου. Αυτά τα μικροβιακά κύτταρα εκκρίνουν την εξωκυτταρική πολυμερή ουσία, που συμβάλει στη άρρηκτη συγκράτηση τους στην επιφάνεια και συγκρατεί θρεπτικά συστατικά από το υγρό περιβάλλον, τα οποία χρησιμοποιούνται για την μετέπειτα αύξηση και διαίρεση των κυττάρων. Τα νέα θυγατρικά κύτταρα παράγουν το δικό τους στρώμα εξωκυτταρικού πολυμερούς και έτσι αυξάνεται ο όγκος του γλυκοκάλυκα. Η αύξηση των κυττάρων, η διαίρεση και η παραγωγή εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών οδηγεί τελικά στο σχηματισμό μικροαποικιών (Melabianaki et al., 2007; Staikou and Voyatzki, 2011; Belessi, 2014).

Εν συνεχεία, στις μικροαποικίες προσκολλώνται μεμονωμένα κύτταρα (*single cells*), συναθροίσεις κυττάρων (*coaggregated cells*) και ομάδες ομοειδών κυττάρων (*group of identical cells*), οι οποίες θα δημιουργήσουν το νέο σύνθετο βιοϋμένιο, όπου οι μικροαποικίες ίδιου ή διαφορετικών βακτηρίων εναποτίθενται σε στρώματα με ενδιάμεση ύπαρξη εξωπολυσακχαρίτη. Σε αυτή τη φάση, ο μικροβιακός πληθυσμός οργανώνεται οριζόντια ή κατακόρυφα ανάλογα με την διαβάθμιση της συγκέντρωσης των συστατικών και με αυτό το τρόπο δύνανται μικροοργανισμοί με εντελώς διαφορετικές τροφικές και φυσιολογικές απαιτήσεις να διαβιούν πολύ κοντά, κατέχοντας το καθένα τη δική του βιοθέση (Varnam and Evans, 2000). Επί παραδείγματι, η διαβάθμιση της συγκέντρωσης του οξυγόνου επιτρέπει την ανάπτυξη αερόβιων, μικροαερόφιλων και αναερόβιων βακτηρίων σε πολύ μικρή απόσταση μεταξύ τους (Melabianaki et al., 2007).

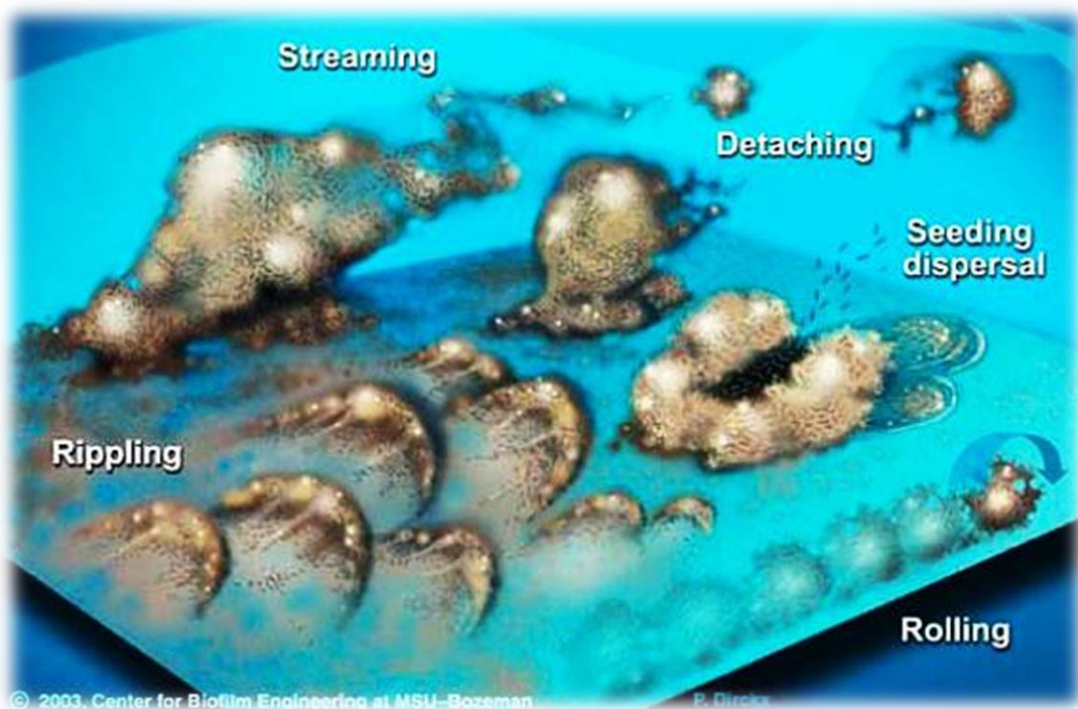


Εικόνα 2.2.3.2.2 Απεικόνιση της Ετερογένειας των Μικροβιακών Ειδών σε ένα Βιοϋμένιο – Βιοθέσεις (Anne Camper & Peg Dirckx, 1996)

Αυτό το στάδιο, όπου το βιοϋμένιο χαρακτηρίζεται από ετερογενή σύσταση και οι μικροοργανισμοί σε αυτό βρίσκονται προστατευμένοι σε μικροαποικίες, αποτελεί την ωρίμαση (*maturation*) του βιοϋμένιου. Χαρακτηρίζεται από την κυτταρο - κυτταρική προσκόλληση και συσσώρευση των βακτηρίων, ενώ αξιοσημείωτη είναι η χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή του βιοϋμένιου.

Την ολοκλήρωση του κύκλου της ωρίμασης του βιοϋμενίου ακολουθεί η αποκόλληση (*detachment*) και η διάχυση των κυττάρων εκ νέου σε πλαγκτονική μορφή. Η αποκόλληση των κυττάρων μπορεί να γίνει με παθητικό τρόπο, μέσω της ροής των τροφίμων ή με ενεργητικό, με εσωτερικούς μηχανισμούς αποδέσμευσης. Τα αποδεσμευμένα κύτταρα μπορούν να δημιουργήσουν καινούρια βιοϋμένια (Belessi, 2014).

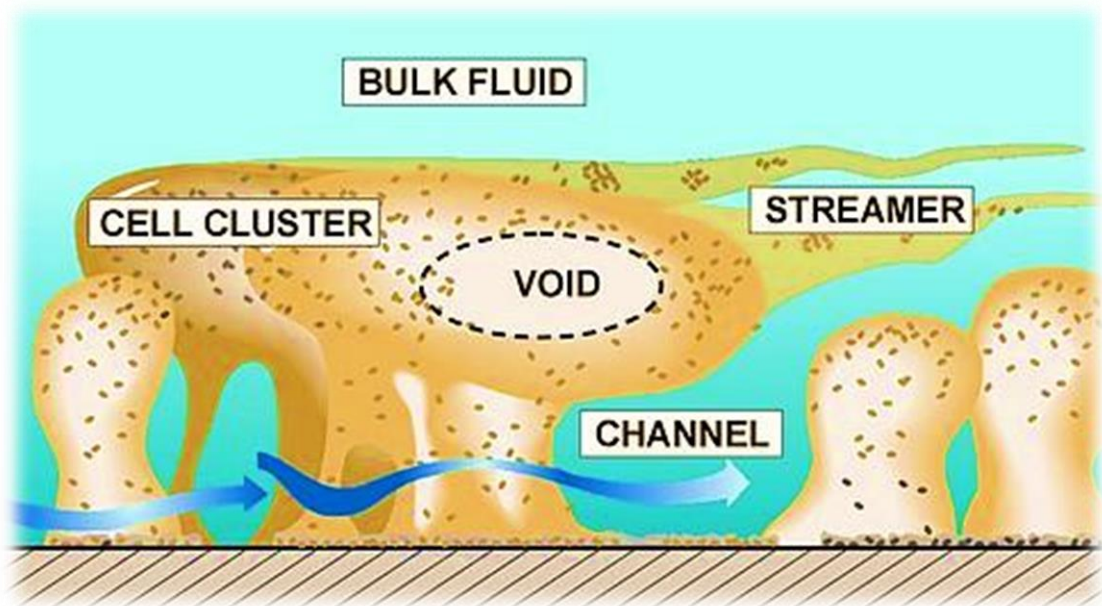
Τα μικροβιακά κύτταρα μπορεί να αποκολληθούν μεμονωμένα από τα βιοϋμένια, ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης και διαίρεσης εντός του βιοϋμενίου. Επιπλέον, συσσωματώματα κυττάρων ή μικροαποικίες μπορούν να αποκολληθούν ή να αποβληθούν από το βιοϋμένιο, λόγω αλλαγής στη συγκέντρωση του υποστρώματος (Donlan and Costerton, 2002). Η αποκόλληση μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους (εικόνα 2.2.3.2.3), όπως με κυματισμό ή κυλιόμενα σε όλη την επιφάνεια, ή με αποκόλληση σε συστάδες, ή με εξάπλωση και διασπορά των κινητών βακτηρίων από μία κοινότητα βιοϋμενίου.



Εικόνα 2.2.3.2.3 Μετανάστευση Κυττάρων Βιοϋμενίου (Paul Stoodley & Peg Dirckx, 2003)

2.2.3.3 Δομή Ώριμου Βιοϋμενίου

Έπειτα από παρατηρήσεις με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες λέιζερ (CLSM) παρατηρήθηκε ότι τα ανεπτυγμένα βιοϋμένια δεν είναι δομικά ομοιογενείς μονοστοιβάδες μικροβιακών κυττάρων σε μία επιφάνεια. Αντιθέτως, μπορούν να περιγραφούν ως ετερογενή τόσο στο χρόνο όσο και στο χώρο. Η δομική ετερογένεια του βιοϋμενίου έγκειται στις δυναμικές διαστάσεις του, όπου οι μικροαποικίες (*cell clusters*) που εσωκλείονται εντός της εξωκυττάριας πολυμερούς ουσίας εμφανίζονται είτε ως μεμονωμένοι ελαστικοί «πύργοι / πυραμίδες» είτε ως πολύπλοκα «μανιτάρια» (Σχήμα 2.2.1).



Σχήμα 2.2.1 Εννοιολογικό Σκίτσο που Απεικονίζει την Δομική Ετερογένεια των Βιοϋμενίων (Peg Dirckx, 1997)

Επιπλέον, διάσπαρτα και μεταξύ των μικροαποικιών δημιουργούνται ανοιχτά κανάλια ή πόροι (*channels*) – μέσω των οποίων μπορεί να ρέει το υδατικό μέσο (*bulk fluid*) που συμβάλει στην ομοιόσταση του βιοϋμενίου– κενές περιοχές (*voids*) που δεν κατοικούνται πλέον από μικροοργανισμούς και *streamers* που δημιουργούνται από τον όγκο του υγρού που ρέει και χαρακτηρίζονται από ιξωδοελαστικότητα, η οποία τους προσδίδει ευελιξία· παραμορφώνοντας με αυτό τον τρόπο τις μικροαποικίες και προσδίδοντάς τους το σχηματισμό του γυρίνου που ταλαντώνεται μέσα στον όγκο του ύδατος (Donlan and Costerton, 2002).

Το πυκνό δίκτυο καναλιών που διαπερνά τις διάφορες ομάδες των μικροβίων μεταφέρει θρεπτικές ουσίες, ύδωρ και τα τοξικά παράγωγα του μεταβολισμού. Ως εκ τούτου αποτελεί βασικό κομμάτι για τη διατήρηση ζωντανών βιοϋμενίων, δεδομένου ότι δια μέσω του υδατικού μέσου που κυκλοφορεί στα κανάλια παρέχονται στο βιοϋμένιο θρεπτικές ουσίες, οξυγόνο και ένζυμα καθώς και αποβάλλονται ή επαναχρησιμοποιούνται τα προϊόντα του μεταβολισμού (Watnick and Kotler, 2000).

2.3 Ιδιότητες Βιοϋμενίων

Το κύριο χαρακτηριστικό των βιοϋμενίων είναι η αυξημένη αντοχή τους σε διεργασίες απολύμανσης σε σχέση με την αντοχή των ελεύθερων και αιωρούμενων (planktonic) μικροβιακών κυττάρων που δε ανήκουν σε κοινότητα βιοϋμενίων. Ιδιαίτερα, τα προσκολλημένα κύτταρα είναι τουλάχιστον 500 φορές περισσότερο ανθεκτικά στους αντιμικροβιακούς παράγοντες. (Costerton et al., 1995).

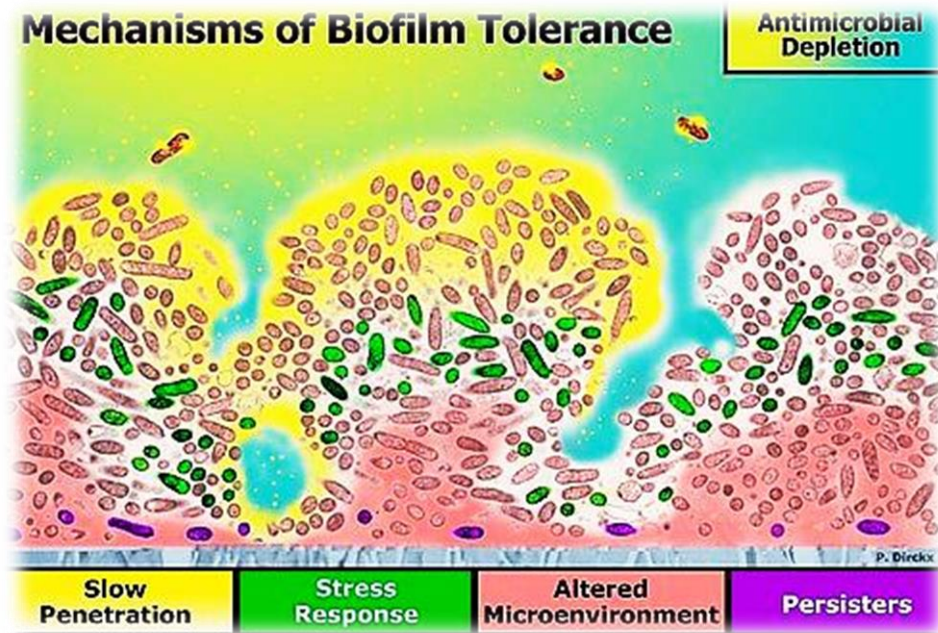
Η φύση της δομής του βιοϋμενίου και τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών που το συνθέτουν, προσφέρουν μία εγγενή ανθεκτικότητα στους αντιμικροβιακούς παράγοντες είτε αυτοί οι μικροβιακοί παράγοντες είναι αντιβιοτικά, απολυμαντικά ή μικροβιοκτόνα. Οι μηχανισμοί (εικόνα 2.3) που είναι υπεύθυνοι για την ανθεκτικότητα μπορεί να είναι ένας ή περισσότεροι από τους ακόλουθους (Donlan and Costerton, 2002; Staikou and Voyatzi, 2011):

- **Καθυστέρηση ή Αδυναμία Διείσδυση του Αντιμικροβιακού Παράγοντα μέσω της Εξωκυττάριας Πολυμερούς Ουσίας:** Τα αντιμικροβιακά μόρια πρέπει να διαχυθούν μέσω της εξωκυττάριας πολυμερούς ουσίας του βιοϋμενίου προκειμένου να αδρανοποιήσουν τα εγκλεισμένα σε αυτήν κύτταρα. Η εξωκυττάρια ουσία όμως αποτελεί ένα περιορισμό διαχύσεως αυτών των μορίων, καθώς επηρεάζει είτε το ρυθμό μεταφοράς του μορίου στο εσωτερικό του βιοϋμενίου είτε αλληλεπιδρά με τις αντιμικροβιακές ουσίες. Επιπλέον, η αντιμικροβιακή ουσία αδρανοποιείται είτε από το σχηματισμό συμπλεγμάτων, είτε από τη δράση υδρολυτικών ενζύμων στα

επιφανειακά στρώματα του πολυμερούς με ταχύτερο ρυθμό από ότι διαχέεται και έτσι με αυτό τον τρόπο παρεμποδίζεται η διείσδυσή της.

- **Ανάπτυξη Ανταγωνιστικού, Βλαπτικού Μικροπεριβάλλοντος και Αναστολή Του Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού στο Βιοϋμένιο:** Τα μικροβιακά κύτταρα εντός του βιοϋμένιου, βιώνουν πολλαπλές καταστάσεις καταπόνησης / στέρησης – όπως έλλειψη θρεπτικών συστατικών λόγω της αυξημένης κατανάλωσης, ανοξία, μικροβιακό ανταγωνισμό και συσσώρευση μεταβολικών προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, η ανοξία στα ανώτερα στρώματα του βιοϋμένιου οδηγεί στη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών και αναστολή του πολλαπλασιασμού των βακτηριακών κυττάρων στα βαθύτερα στρώματα. Η συγκέντρωση των βλαπτικών ουσιών του μεταβολισμού των βακτηρίων αναστέλλει περαιτέρω το ρυθμό ανάπτυξης ενός υποπληθυσμού των μικροβίων. Η δημιουργία αυτού του μικροπεριβάλλοντος επάγει μηχανισμούς άμυνας που παρεμποδίζουν τη δράση των αντιμικροβιακών παραγόντων.
- **Αλλαγή Φαινοτύπου:** Στο 1% του πληθυσμού των μικροοργανισμών που απαρτίζουν το βιοϋμένιο έπειτα από τις ανωτέρω καταστάσεις καταπονήσεως σηματοδοτούνται γενετικές, μεταγραφικές και πρωτεομικές αλλαγές, που τελικά οδηγούν στη «σκληραγώγηση» (*hardening*) των κυττάρων. Οι ανθεκτικοί αυτοί φαινότυποι (*persisters* ή *phenotypic variants*) επιβιώνουν από την επίδραση αντιμικροβιακών ουσιών και διατηρούν ενίοτε την ικανότητα επανεμφάνισης τους στους χώρους επεξεργασίας των τροφίμων.

Μία άλλη σημαντική ιδιότητα των βιοϋμενίων είναι η ικανότητά τους να αναπτύσσουν επικοινωνία μεταξύ των μικροβίων και κατά αυτόν το τρόπο να δρουν ως συντονισμένες ομάδες. Η κυτταρική διεπικοινωνία (*quorum sensing*), δίδει το πλεονέκτημα της ευκολότερης προσαρμογής στο εξωτερικό περιβάλλον, μέσω αλλαγών προσαρμογής στη φυσιολογία των βακτηρίων. Οι αλλαγές προκύπτουν έπειτα από κατάλληλη ρύθμιση (ενεργοποίηση ή αναστολή) της γονιδιακής έκφρασης συγκεκριμένων γονιδιακών αλληλουχιών.



Εικόνα 2.3 Απεικόνιση των Μηχανισμών Ανοχής του Βιοϋμενίου σε Αντιμικροβιακούς Παράγοντες (Phil Stewart and Peg Dirckx, 2001)

Η ικανότητα των βακτηρίων να συντονίζουν τη γονιδιακή έκφραση σύμφωνα με την πυκνότητα του πληθυσμού τους οφείλεται σε ειδικά σηματοδοτικά μόρια, τους αυτεπαγωγείς, που απελευθερώνονται στο περιβάλλον του βακτηρίου. Οι συγκεντρώσεις των σηματοδοτικών μορίων ανιχνεύονται από τα γειτονικά βακτήρια, τα οποία αντιλαμβάνονται την πυκνότητα του τοπικού βακτηριακού πληθυσμού. Η ποσότητα των σημάτων ανάμεσα στα είδη και μεταξύ του ίδιου είδους, βοηθά τα βακτήρια να αντιληφθούν το σχετικό πλήθος τόσο των ομοειδών όσο και των διαφορετικών κυττάρων (Melabianaki et al., 2007). Τα σηματοδοτικά μόρια αλληλεπιδρούν με τα βακτήρια μέσω πρόσδεσης και ενεργοποίησης συγκεκριμένων και ειδικών υποδοχέων, που ανήκουν είτε στο ίδιο το βακτήριο που τα απελευθέρωσε είτε σε γειτονικά βακτήρια μέσα στο βιοϋμένιο (Stamou et al., 2014).

Τέλος, με τη διεπικοινωνία τα μικροβιακά κύτταρα χρησιμοποιούν καλύτερα τα θρεπτικά συστατικά του περιβάλλοντός τους, με έκκριση μεγάλων ποσών ενζύμων, καθώς και προστατεύονται καλύτερα με έκκριση λοιμογόνων παραγόντων (Melabianki et al., 2007).

Πειραματικό Μέρος

3. Σκοπός του Πειράματος

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση των συνθηκών υγιεινής που επικρατούν στην αλυσίδα τροφίμων κρέατος, τόσο με κλασσικές όσο και με μοριακές τεχνικές ανάλυσης. Αποτελεί μέρος των πειραμάτων του Project “Biofilm Fight”, που διεξήχθησαν στο Τμήμα DISAFA του Πανεπιστημίου του Τορίνο, κατά την περίοδο 2014 – 2015.

4. Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Δειγματοληψία

Τρεις επιχειρήσεις επεξεργασίας τροφίμων κρέατος συμμετείχαν στο Project “*Biofilm Fight*” για τη λήψη δειγμάτων, που θα έδιναν τη μικροβιολογική εικόνα του περιβάλλοντός τους ύστερα από την διαδικασία καθαρισμού και απολύμανσης. Συγκεκριμένα, η πρώτη (K1) ήταν ένα σφαγείο και βιομηχανία τεμαχισμού στην περιφέρεια του Cuneo, της Βορείου Ιταλίας. Η δεύτερη (K2), επίσης στην περιφέρεια του Cuneo, ήταν μία επιχείρηση παραγωγής αλλαντικών και η τρίτη (K3) ήταν μία βιομηχανία τεμαχισμού κρέατος και παρασκευής hamburger, στην Alba της Βορείου Ιταλίας.

Η δειγματοληψία έλαβε χώρα μία φορά στην κάθε επιχείρηση, εντός του Ιανουαρίου του έτους 2015. Πενήντα οκτώ (58) συνολικά δείγματα ελήφθησαν, εκ των οποίων τα είκοσι τρία (23) δείγματα προέρχονταν από τη K1, τα δεκαπέντε (15) από την K2 και τα είκοσι (20) από την K3 επιχείρηση. Τα δείγματα (*swabs*) συλλέχθηκαν από τις επιφάνειες και τον εξοπλισμό χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα γάντια και ενυδατωμένους σπόγγους σε 10 mL θρεπτικού υλικού ρυθμιζόμενης πεπτόνης. ([3M Health Care](#), St. Paul, USA). Ο σπόγγος συρόταν μηχανικά (οριζοντίως – καθέτως) σε μία επιφάνεια 100 cm² και επανατοποθετούταν στη σακούλα με το διάλυμα πεπτόνης. Εν συνεχεία, τα δείγματα τοποθετούνταν σε ψυγείο χειρός (*cool box*) με παγοκυψέλες, για τη διατήρησή τους στους 4°C και μεταφέρονταν εντός διαστήματος 12 ωρών στο εργαστήριο για τις μικροβιολογικές αναλύσεις.



Εικόνα 4.1 Δειγματοληψία

4.2 Μικροβιολογικές Αναλύσεις

4.2.1 Απαρίθμηση Μικροοργανισμών

Σε κάθε σακούλα δείγματος προστέθηκαν 10 mL Ringer Solution ([OXOID](#), Milan, Italy) και πραγματοποιήθηκε μηχανική ομογενοποίηση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το ομογενοποιημένο δείγμα αποτελούσε την μηδενική αραίωση (TQ) και με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, 1 mL από την αραίωση TQ μεταφερόταν σε 9 mL Ringer Solution για την 10^{-1} αραίωση, ενώ 0,1 mL από την 10^{-1} αραίωση μεταφερόταν σε 0,9 mL Ringer Solution για την 10^{-2} αραίωση. Ακολούθως, έγινε ενοφθαλμισμός σε θρεπτικά υποστρώματα στα τρυβλία petri, που χρησιμοποιήθηκαν για επιφανειακή επίστρωση (*spread plate*) ή ενσωμάτωση (*pour plate*).

Οι μικροοργανισμοί προς απαρίθμηση φαίνονται στον Πίνακα 4.2.1.1 μαζί με τα θρεπτικά υποστρώματα, τις θερμοκρασίες και τη διάρκεια επώασής τους. Για τους μικροοργανισμούς Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX), Ζύμες και Μύκητες, *Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes* χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης, όπου ποσότητα 0,1 mL από τις διαδοχικές αραιώσεις εξαπλωνόταν κυκλικά με χρήση τριγωνικής ράβδου σε στερεό υπόστρωμα. Εν αντιθέσει, για τους μικροοργανισμούς *Escherichia coli* και Κολοβακτηριοειδή (*Coliforms*) χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ενσωμάτωσης, όπου ποσότητα 1 mL από τις διαδοχικές αραιώσεις διασπειρόταν ομοιόμορφα στη μάζα του υγρού θρεπτικού υποστρώματος, με ήπια ανάδευση του τρυβλίου. Όλες οι ανωτέρω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες και με χρήση αποστειρωμένων υλικών.

4.2.1.1 Θρεπτικά Υποστρώματα Ανάπτυξης

Όλα τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα παρασκευάστηκαν με προσθήκη απιονισμένου νερού και με την κατάλληλη θερμική επεξεργασία, σύμφωνα με τις οδηγίες της κάθε εταιρείας. Ύστερα από την παρασκευή τους διατηρήθηκαν για μία με δύο ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα σε θερμοκρασία 4°C. Όσον αφορά στα θρεπτικά υποστρώματα προς ενσωμάτωση, παρασκευάστηκαν πριν την δειγματοληψία και

τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο ώστε να διατηρήσουν τη ρευστότητά τους και η θερμοκρασία τους να σταθεροποιηθεί στους 45°C.

Πίνακας 4.2.1.1 Θρεπτικά Υπόστρώματα Μικροοργανισμών και η Επώασή τους

Μικροοργανισμός	Θρεπτικό Υπόστρωμα	Θερμοκρασία Επώασης	Διάρκεια Επώασης
<i>Listeria monocytogenes</i>	OXFORD	37°C	24 - 48 ώρες
<i>Salmonella spp.</i>	X.L.D.	37°C	24 ώρες
<i>Escherichia coli</i>	T.B.X.	44°C	24 ώρες
Coliforms	V.R.B.A.	37 & 44°C	24 ώρες
Ζύμες και Μύκητες	MALT	30°C	3 ημέρες
OMX	PCA	30°C	2 – 3 ημέρες

Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) αναπτύχθηκε στο μη επιλεκτικό υπόστρωμα Plate Count Agar – PCA ([LABM](#), Lancashire, United Kingdom), που επώαστηκε στους 30°C για 2 – 3 ημέρες. Οι Ζύμες και Μύκητες αναπτύχθηκαν στο επιλεκτικό μέσο Malt Extract Agar – MALT ([LABM](#)), το οποίο επώαστηκε στους 30°C για 3 ημέρες. Ακόμη, τα Coliforms αναπτύχθηκαν στο επιλεκτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Agar – V.R.B.A. ([LABM](#)), το οποίο επώαστηκε τόσο στους 37°C όσο και στους 44°C για 24 ώρες, ούτως ώστε να αναπτυχθούν τα ολικά κολοβακτηριοειδή (*total coliforms*) και τα κολοβακτηριοειδή εντερικής προελεύσεως (*fecal coliforms*), αντίστοιχα.

Επιπλέον, για την ανάπτυξη της *Escherichia coli* χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό υπόστρωμα Tryptone Bile X –Glucuronide Medium – T.B.X. ([OXOID](#)), που επώαστηκε στους 44°C για 24 ώρες. Σε ότι αφορά τη *Salmonella spp.* αναπτύχθηκε στο επιλεκτικό υπόστρωμα Xylose Lysine Decarboxylase Agar – X.L.D. ([LABM](#)), το οποίο επώαστηκε στους 37°C για 24 ώρες (To). Τέλος, η *Listeria monocytogenes* αναπτύχθηκε στο επιλεκτικό υπόστρωμα Listeria Selective Agar – OXFORD Formulation ([OXOID](#)) με προσθήκη του συμπληρώματος SR0140E ([OXOID](#)), που επώαστηκε στους 37°C για 24 – 48 ώρες (To). Όλα τα τρυβλία επώαστηκαν ανεστραμμένα σε κλιβάνους.

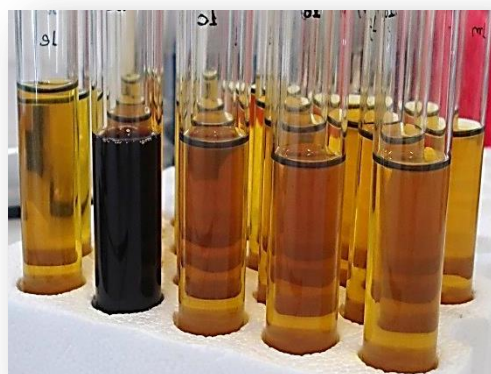
4.2.1.2 Εμπλουτισμός Δειγμάτων

Για την ανίχνευση των μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* spp. πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός των κυττάρων σε δύο φάσεις, τον προ-εμπλουτισμό και τον επιλεκτικό εμπλουτισμό. Όσον αφορά στην *Listeria monocytogenes*, για τον πρώτο εμπλουτισμό 1 mL δείγματος μεταφέρθηκε σε 9 mL Half Fraser broth με προσθήκη του συμπληρώματος SR0166E (OXOID) και επώαστηκε στους 30°C για 24 ώρες. Με το πέρας της επώασης, εφαρμόστηκε η τεχνική της γραμμωτής ράβδωσης (*streaking*) με χρήση στείρου μικροβιολογικού κρίκου σε υπόστρωμα OXFORD (T24). Παράλληλα, έγινε ο δεύτερος εμπλουτισμός με μεταφορά 1 mL από το Half Fraser broth σε 9 mL Fraser broth με προσθήκη του συμπληρώματος SR0156E (OXOID), το οποίο εν συνεχεία επώαστηκε στους 37°C για 48 ώρες. Ύστερα από 48 ώρες, με τη βοήθεια στείρου κρίκου εφαρμόστηκε *streaking* σε υπόστρωμα Oxford και τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες (T72).

Κατά παρόμοιο τρόπο, ο προ-εμπλουτισμός για την *Salmonella* spp. έγινε με τη μεταφορά 1 mL δείγματος σε 9 mL Buffered Peptone Water – BPW (LABM) που επώαστηκε στους 37°C για 24 ώρες. Ακολούθως, εφαρμόστηκε *streaking* σε υπόστρωμα X.L.D., που επώαστηκε στους 37°C για 24 ώρες (T24), καθώς και 1 mL από το BPW μεταφέρθηκε σε 9 mL Rappaport Vassiliadis Medium – R.V.S (LABM), το οποίο επώαστηκε στους 42°C για 24 ώρες. Με το πέρας των 24 ωρών, έγινε *streaking* σε υπόστρωμα X.L.D. και τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες (T72).

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί πως η πιθανή ύπαρξη μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* μπορεί να διακριθεί κατά τη διαδικασία του εμπλουτισμού, όπου τα θρεπτικό διάλυμα Fraser broth αλλάζει χρώμα – από κεχριμπαρένιο γίνεται σκούρο καφέ, ύστερα από την επώαση (εικόνα 4.2.1.2).

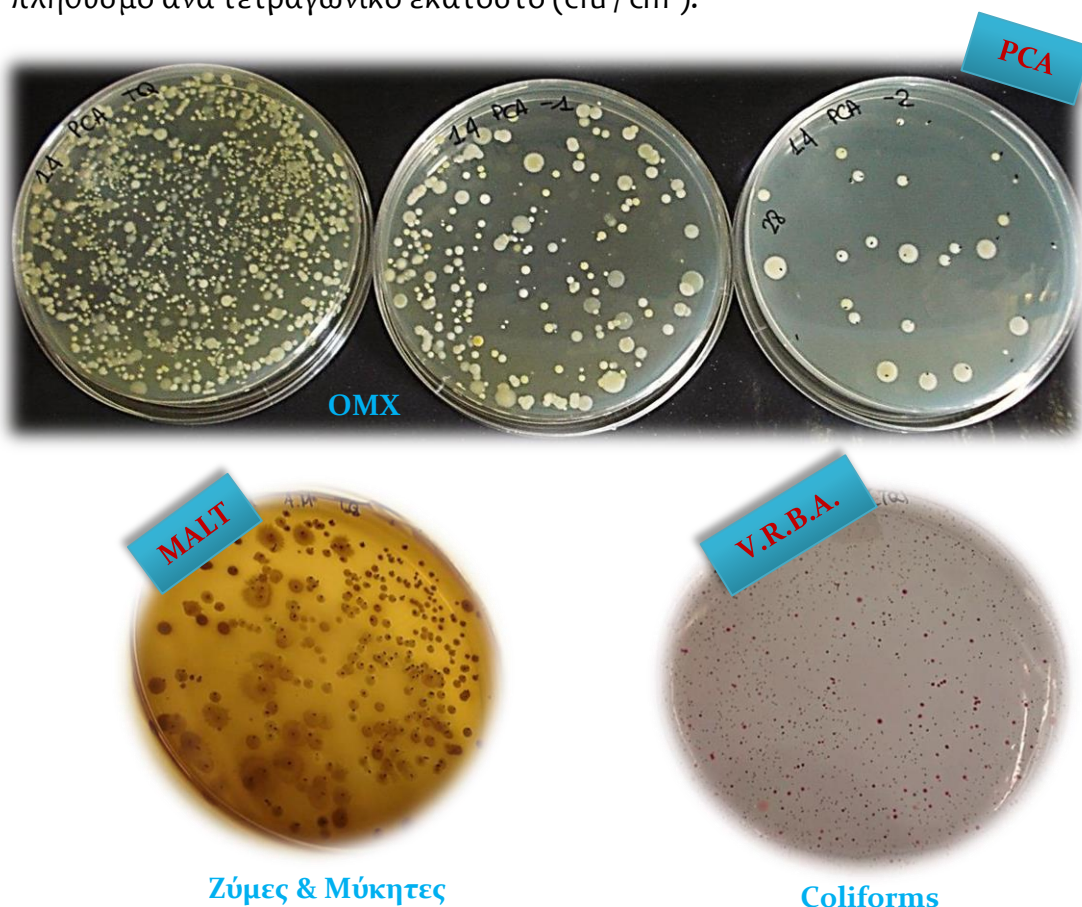
Εικόνα 4.2.1.2 Αλλαγή Χρώματος σε ενοφθαλμισμένο Fraser broth

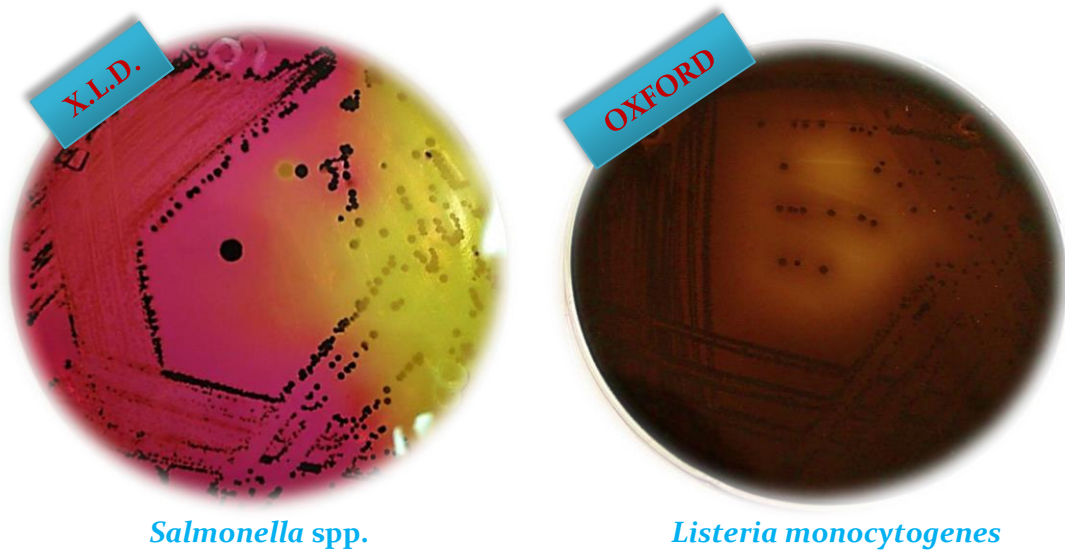


4.2.2 Καταμέτρηση Αποικιών (Colony Count)

Όλα τα τρυβλία εξετάστηκαν οπτικά για τα τυπικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών που σχηματίστηκαν σε κάθε ενοφθαλμισμένο θρεπτικό υπόστρωμα (εικόνα 4.2.2.1). Πιο συγκεκριμένα, στα υποστρώματα PCA και MALT καταμετρήθηκαν όλες οι αποικίες που εμφανίστηκαν ανεξαρτήτως μορφολογίας και χρώματος. Στο V.R.B.A καταμετρήθηκαν όλες οι ιώδεις αποικίες διαμέτρου μεγαλύτερης των 0,5 χιλιοστών. Επιπλέον, στο T.B.X. οι χαρακτηριστικές αποικίες έχουν μπλε / πράσινο χρώμα. Τέλος, όσον αφορά τους μικροοργανισμούς *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* spp., δεν έγινε καταμέτρηση αλλά χαρακτηρισμός ως προς την παρουσία / απουσία των χαρακτηριστικών αποικιών, όπου στο OXFORD οι αποικίες έχουν καφέ χρώμα με μαύρη άλω και στο X.L.D. οι αποικίες φέρουν μαύρο κέντρο.

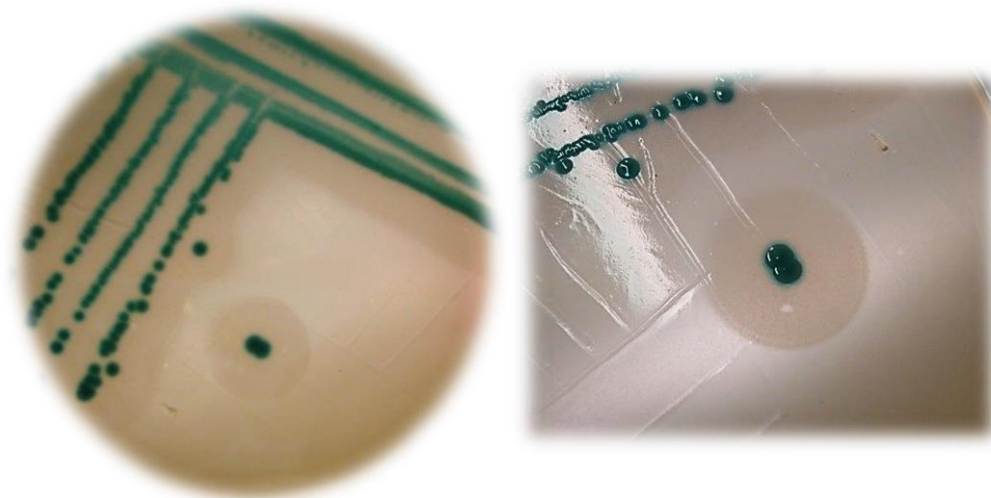
Η μέτρηση των αποικιών πραγματοποιήθηκε με γυμνό μάτι και όταν εμφανιζόταν μεγάλος αριθμός αποικιών στο τρυβλίο, τότε γινόταν διαίρεση του τρυβλίου σε τομείς, ούτως ώστε να γίνει προσέγγιση του πλήθους των αποικιών. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε μικροβιακό πληθυσμό ανά τετραγωνικό εκατοστό (cfu / cm²).





Εικόνα 4.2.2.1 Θρεπτικά Υποστρώματα κι Ανεπτυγμένες Αποικίες Μικροβίων

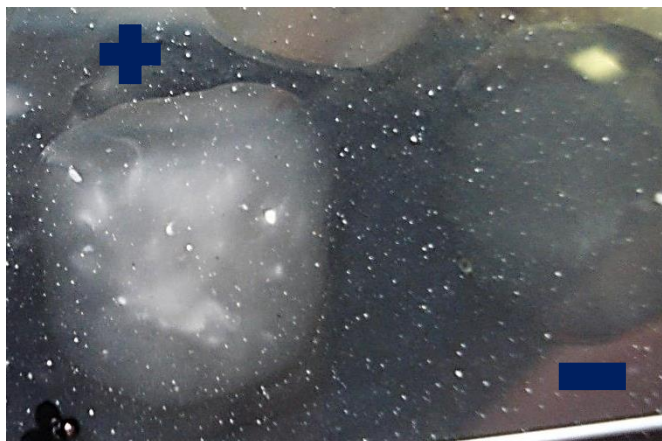
Στην περίπτωση εμφάνισης των μαύρων αποικιών της *Salmonella spp.* συλλέχθηκε μία αποικία με τη βοήθεια αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου και με *streaking* έγινε νέα εξάπλωση σε υπόστρωμα X.L.D., το οποίο επωάστηκε στους 37°C για 24 ώρες. Ομοίως, μία χαρακτηριστική αποικία της *Listeria monocytogenes* απομονώθηκε και μεταφέρθηκε (*streaking*) σε ένα τρυβλίο με το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Harlequin *Listeria Chromogenic Agar* – ALOA ([LABM](#)), στο οποίο είχαν προστεθεί τα συμπληρώματα Χ072 και Χ010 και επωάστηκε στους 37°C για 24 ώρες. Το υπόστρωμα ALOA παρουσιάζει μπλε / πράσινες αποικίες που περιβάλλονται από αδιαφανή άλω (εικόνα 4.2.2.2).



Εικόνα 4.2.2.2 Χαρακτηριστική Αποικία της *Listeria monocytogenes* σε ALOA

4.2.3 Δοκιμή Συγκόλλησης

Για την δοκιμή συγκόλλησης χρησιμοποιήθηκε ο Αντιορός Σαλμονέλλας (*Salmonella Antisera*; [PRO-LAB Diagnostics](#), Merseyside, United Kingdom), ο οποίος επιτρέπει μία πρώτη ταυτοποίηση στελεχών *Salmonella* spp. που έχουν καλλιεργηθεί σε άγαρ. Η δοκιμή προκαλεί ορατή συγκόλληση του αντιορού με τα ομόλογα αντιγόνα που φέρουν τα βακτήρια, η οποία διακρίνεται από γαλακτώδη υφή (εικόνα 4.2.3).



Εικόνα 4.2.3 Δοκιμή Συγκόλλησης (+ & -) για την Ταυτοποίηση της *Salmonella* spp.

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτηση μίας σταγόνας αντιορού σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα. Με τη χρήση στείρου βακτηριολογικού κρίκου απομονώθηκε μία «ύποπτη» αποικία από το Χ.Λ.Δ. άγαρ και δημιουργήθηκε εναιώρημα με τη σταγόνα του ορού, υπό ήπια ανακίνηση του δακτυλίου. Η θετική αντίδραση αντιορού – αντιγόνου αποδεικνύεται από την εμφάνιση συγκόλλησης σε διάστημα μικρότερο των 60 δευτερολέπτων, η οποία έπειτα παύει να είναι διακριτή.

4.3 Μοριακές Τεχνικές

4.3.1 Απομόνωση DNA (*DNA extraction*) «Υποπτών» Μικροοργανισμών

Για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* spp., απομονώθηκε μία χαρακτηριστική αποικία από τα τρυβλία (ALOA & Χ.Λ.Δ.), με χρήση μικροβιολογικού κρίκου, τοποθετήθηκε σε 2 mL Brain Heart Infusion – BHI broth ([OXOID](#)) και επώαστηκε στους 37°C για 24

ώρες, ώστε να αναζωογονηθεί. Με το πέρας της μίας ημέρας, ξεκίνησε η διαδικασία του DNA extraction, όπου 1 mL από το broth μεταφέρθηκε σε 1,5 mL micro tubes ([SARSTEDT](#), Nümbrecht, Germany), τα οποία περιείχαν Zirconia / Silica Beads διαμέτρου 0,5 mm ([BioSpec](#), Bartlesville, USA), για τη λύση του κυτταρικού τοιχώματος. Ύστερα από φυγοκέντρηση σε 14.000 rpm για 10 λεπτά, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο με χρήση πιπέτας και προστέθηκαν 50 µL λυσοζύμης (50 mg/mL). Τα tubes αναδεύτηκαν στο vortex και τοποθετήθηκαν για επώαση στο Thermomixer ([Sigma-Aldrich](#), Milan, Italy) στους 37°C, σε 1.400 rpm για 1 ώρα.

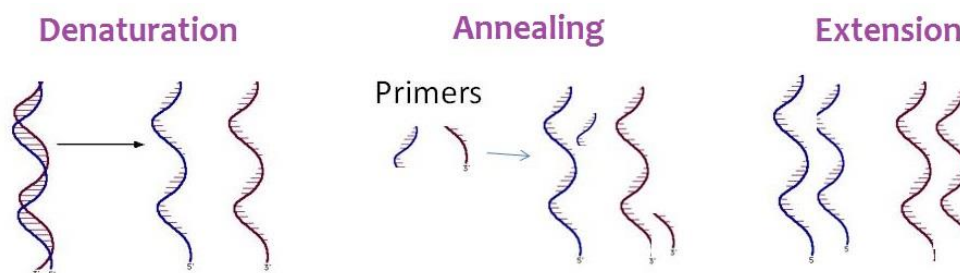
Εν συνεχεία, προστέθηκαν 300 µL Breaking Buffer (1x; 2% Triton X – 100 [v/v], 1% SDS [w/v], 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA, pH 8) και 300 µL διαλύματος φαινόλης / χλωροφόρμιου / ισοαμυλικής αλκοόλης – σε αναλογία 25:24:1 και τα tubes ανακινήθηκαν χειροκίνητα για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα σε vortex ([genie 2](#)). Ακολούθως, έγινε προσθήκη 300 µL TE (10 mM Tris pH 8: 1 mM EDTA pH 8) και τα tubes φυγοκεντρήθηκαν στα 14.000 rpm για 10 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση ήταν διακριτές τρεις φάσεις, εκ των οποίων η άνω φάση περιείχε το DNA, δια τούτο συλλέχθηκε σε νέο 1,5 mL erpendorf και προστέθηκαν 600 µL αιθανόλης 99%, για να επιτευχθεί η κατακρήμνιση του DNA. Έπειτα από φυγοκέντρηση στα 14.000 rpm για 10 λεπτά, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν εκ νέου 250 µL αιθανόλης 70% και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 14.000 rpm για 2 λεπτά. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο με πιπέτα και τα erpendorfs έμεινα περίπου 30 λεπτά ανοικτά για ξήρανση. Εδώ να τονιστεί πως όλες οι ανωτέρω διαδικασίες έγιναν εντός απαγωγού (*laminar flow hood*).

Τέλος, έγινε προσθήκη 50 µL αποστειρωμένου, απιονισμένου νερού και τα δείγματα ποσοτικοποιήθηκαν (ng/ul) με τη χρήση του Nanodrop 1.000 Spectrophotometer ([Thermo SCIENTIFIC](#), Wilmington, DE, USA).

4.3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για Ανίχνευση της *Salmonella* spp.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) χρησιμοποιείται για την ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος δίκλωνου DNA ή cDNA, το οποίο είναι εντοπισμένο μεταξύ δύο περιοχών γνωστής

αλληλουχίας βάσεων εκατέρωθεν της διπλής έλικας. Γίνεται χρήση δύο ολιγονουκλεοτιδίων (μήκους 18 – 30 βάσεων), μη συμπληρωματικών μεταξύ τους, που καλούνται εκκινητές (*primers*). Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί των περιοχών γνωστής αλληλουχίας στα άκρα του τμήματος του δίκλωνου DNA.



Εικόνα 4.3.2 Βήματα κατά την Διάρκεια του Κύκλου της PCR

Η πορεία της ενίσχυσης (εικόνα 4.3.2) του τμήματος του DNA ξεκινά με την αποδιάταξη (*denaturation*) του δίκλωνου μορίου σε υψηλή θερμοκρασία (92 – 96°C), παρουσία των ολιγονουκλεοτιδίων και των τεσσάρων τριφωσφοδεοξυριβονουκλεοτιδίων (*deoxyribonucleoside triphosphate – dNTPs: dATP – dTTP – dCTP – dGTP*). Εν συνεχεία, το διάλυμα ψύχεται σε καθορισμένη θερμοκρασία (50 - 65°C), στην οποία οι εκκινητές υβριδίζονται (*annealing*) με τις αλληλουχίες – στόχους. Τέλος, λαμβάνει χώρα η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA (*extension*) σε θερμοκρασία 72°C, όπου οι εκκινητές προεκτείνονται – με τη δράση μίας θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (*Taq polymerase*) – κατά μήκος του τμήματος του DNA.

Ο κύκλος της αποδιάταξης, του υβριδισμού και της αναδιάταξης επαναλαμβάνεται πολλές φορές και ο χρόνος που απαιτείται εξαρτάται από το μήκος τους προϊόντος της PCR. Επιπλέον, κάθε φορά τα προϊόντα του ενός κύκλου αποτελούν μητρικά τμήματα για τα επόμενα, διπλασιάζοντας σε κάθε κύκλο το ποσό του επιθυμητού προϊόντος, το οποίο μπορεί να φτάσει από μερικά εκατομμύρια έως και δισεκατομμύρια αντίγραφα του αρχικού τμήματος DNA.

Η μέθοδος PCR χρησιμοποιήθηκε με στόχο την ανίχνευση της *Salmonella* spp. στα «ύποπτα» δείγματα. Χρησιμοποιήθηκαν δύο ειδικοί εκκινητές που προέρχονταν από το γονίδιο *invA* (πίνακας 4.3.2.1).

Πίνακας 4.3.2.1 Ειδικοί Εκκινητές για την Ανίχνευση της *Salmonella* spp.

Όνομασία	Ακολουθία (5' - 3')
Primer Salm 3 (F)	GCTGCGCGCGAACGGCGAAG
Primer Salm 4 (R)	TCCCGGCAGAGTTCCCATT

Οι ενισχύσεις των μορίων DNA εκτελέστηκαν σε έναν τελικό όγκο 25 μ L στο Peltier Thermal Cycler (BIO –RAD, Milan, Italy). Τα διαλύματα Buffer, $MgCl_2$, οι εκκινητές καθώς και η Taq που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προϊόντα της εταιρείας Sigma-Aldrich (Πίνακας 4.3.2.2).

Πίνακας 4.3.2.2 Πρωτόκολλο PCR Ανίχνευσης *Salmonella* spp.

x1

Buffer (10x)	2,5
$MgCl_2$ (25 mM)	1,5
dNTPs (10 mM)	0,5
Salm 3 (10 μ M)	0,5
Salm 4 (10 μ M)	0,5
Taq (5U/uL)	0,3
H ₂ O	18,2
DNA	1
Τελικό Όγκος (μ L)	25

Ο κύκλος της ενίσχυσης ήταν ο ακόλουθος:

1. Επώαση στους 95°C για 5 λεπτά.
2. Επώαση στους 95°C για 90 δευτερόλεπτα.
3. Επώαση στους 58°C για 80 δευτερόλεπτα.
4. Επώαση στους 72°C για 2 λεπτά.
5. Μετάβαση στο βήμα 2 για 35 φορές.
6. Επώαση στους 72°C για 7 λεπτά.
7. Παραμονή στους 10°C επ' αόριστον.

4.3.3 Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Αγαρόζης

Η πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση των προϊόντων της PCR. Η αγαρόζη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης ουδέτερου φορτίου, ο οποίος όταν μετατρέπεται σε πηκτή (*gel*) δημιουργεί ένα πλέγμα με πόρους που είναι κατάλληλο για το διαχωρισμό των μακρομορίων με βάση το μέγεθός τους. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων DNA προς διαχωρισμός. Διαχωρίζει τα τμήματα του DNA με μήκος από λίγες εκατοντάδες έως και 20.000 ζεύγη βάσεων (*base pairs, bp*). Επιπλέον, το μήκος του DNA συγκρίνεται με το μήκος γνωστού μάρτυρα (*DNA Ladder*) που ηλεκτροφορείται στην αρχή του *gel*. Το DNA καθίσταται ορατό με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου (*ethidium bromide*), το οποίο φθορίζει στο υπεριώδες.

Η ηλεκτροφόρηση που εφαρμόστηκε για τα προϊόντα της PCR, έτρεξε στα 130V για περίπου 30 λεπτά και πραγματοποιήθηκε σε *gel* 1,5% αγαρόζης και σε ρυθμιστικό διάλυμα 100 mL TAE 1x (40 mM Tris – 20 mM acetate – 1 mM EDTA). Ακόμη, 10 μL βρωμιούχου αιθιδίου προσθέτονταν στο *gel*. Στα πηγαδάκια του *gel* φορτώνονταν 3,5 μL *gel loading dye* και 5 μL προϊόντος PCR, ενώ στο πρώτο πηγαδάκι φορτώνονταν 2 μL από το μάρτυρα – Perfect Size 100 bp XL Ladder ([5 PRIME](#), Milan, Italy).

4.3.4 Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (*Quantitative PCR – qPCR*) για Ανίχνευση της *Listeria monocytogenes*

Η qPCR αποτελεί μία τεχνική ταυτόχρονου πολλαπλασιασμού και ποσοτικοποίησης συγκεκριμένου τμήματος DNA του μικροοργανισμού. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενός φθορίζοντος μορίου αναφοράς σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Το μόριο αναφοράς που εκπέμπει φθορισμό βρίσκεται συνδεδεμένο σε έναν ιχνηθέτη υδρόλυσης μαζί με ένα μόριο που απορροφά το φθορισμό, όπου όσο ο ιχνηθέτης είναι άθικτος δεν ανιχνεύεται φθορισμός. Κατά την εξέλιξη της ενίσχυσης των μορίων του DNA, στα οποία είναι συνδεδεμένος ο ιχνηθέτης υδρολύεται από την πολυμεράση *Taq*. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο διαχωρισμό του μορίου αναφοράς από το μόριο που απορροφά το

φθορισμό, με αποτέλεσμα την ανίχνευσή του. Σε κάθε κύκλο PCR ο φθορισμός αυξάνεται εκθετικά καθώς συσσωρεύεται το προϊόν και είναι ανάλογος των νέων κλώνων DNA που συντίθενται.

Στο παρόν πείραμα η ανίχνευση έγινε μέσω της χρήσης θετικού μάρτυρα (στέλεχος *Listeria monocytogenes*) που πολλαπλασιαζόταν μαζί με το στόχο. Οι ενισχύσεις εκτελέστηκαν σε έναν τελικό όγκο 20 μL στο Chromo4 Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, Milan, Italy). Ένα μL απομονωμένου DNA *Listeria monocytogenes* ενισχύθηκε με τους ειδικούς εκκινητές IGS₁ και IGS₂ και τον ανιχνευτή Taqman IGS (πίνακες 4.3.4.1, 4.3.4.2).

Πίνακας 4.3.4.1 Πρωτόκολλο qPCR Ανίχνευσης *Listeria monocytogenes*

	x1
Buffer (10x)	10
IGS₁ (400 nM)	1
IGS₂ (400 nM)	1
Taqman probe: IGS (250 nM)	0,625
H₂O	6,375
DNA	1
Τελικός όγκος (μL)	20

Πίνακας 4.3.4.2 Εκκινητές και Ανιχνευτές Ειδικοί για την *Listeria monocytogenes*

Όνομασία	Ακολουθία (5' - 3')
Primer IGS₁	GGCCTATAGCTCAGCTGGTTA
Primer IGS₂	GCTGAGCTAAGGCCCGTAAA
Probe IGS	FAM – ATAAGAAATACAAATAATCAT – TAMRA

Τέλος, ο κύκλος ενίσχυσης ήταν ο εξής:

1. Επώαση στους 95°C για 3 λεπτά.
2. Επώαση στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα.
3. Επώαση στους 56°C για 30 δευτερόλεπτα.
4. Ανάγνωση plate.
5. Μετάβαση στο βήμα 2 για 40 φορές
6. Τέλος

4.3.5 DNA Extraction Δειγμάτων

Κατά την μικροβιακή ανάλυση των δειγμάτων, έγινε λήψη 1 mL από το κάθε δείγμα – swab (TQ), το οποίο τοποθετήθηκε σε 1,5 mL eppendorf, όπου φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 14.000 rpm και ύστερα από απομάκρυνση του υπερκειμένου τα δείγματα καταψύχθηκαν στους -32°C . Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το Master Pure Complete DNA and RNA Purification Kit ([Epicentre Biotechnologies](#), Madison, WI, USA).

Αρχικά, προστέθηκαν 50μl Λυσοζύμης (50 mg/ mL) σε κάθε δείγμα και τα eppendorfs τοποθετήθηκαν στο Thermomixer compact ([Sigma-Aldrich](#)) προς επώαση στους 37°C για 30 λεπτά στα 1.400 rpm, ούτως ώστε να λυθούν τα κύτταρα. Εν συνεχεία, προστέθηκαν 300 μL του διαλύματος Tissue and Cell Lysis και 25 μL πρωτεΐνάσης K (50 mg/ mL; [Sigma-Aldrich](#)) και τα eppendorf αναμείχθηκαν στο vortex (στα 40 Hertz) για περίπου 10 δευτερόλεπτα και επανατοποθετήθηκαν στο Thermomixer για επώαση στους 65°C για 15 λεπτά, στα 1.400 rpm. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο για 5 λεπτά και εν συνεχεία προστέθηκαν 150 μL του διαλύματος MPC protein. Τα δείγματα ανακινήθηκαν στο vortex για περίπου 10 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στους 4°C , στα 13.200 rpm.

Μετά τη φυγοκέντρηση συλλέχθηκε το υπερκείμενο σε νέο eppendorf και προστέθηκαν 500 μL ισοπροπανόλης. Τα eppendorf αναποδογυρίστηκαν μηχανικά (περίπου 30 – 40 φορές) και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στους 4°C , στα 13.200 rpm. Ύστερα από τη φυγοκέντρηση αφαιρέθηκε με προσοχή η ισοπροπανόλη χωρίς να μετατοπιστεί το ίζημα του DNA. Έπειτα έγινε έκπλυση του DNA, όπου προστέθηκαν 100μL αιθανόλης 70%, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στους 4°C , στα 13.200 rpm και απομακρύνθηκε με τη βοήθεια μικροπιπέτας το υπερκείμενο, με προσοχή στο ίζημα του DNA. Τέλος, προστέθηκαν 35 μL αποστειρωμένου νερού και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -32°C .

4.3.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για το DGGE

Η ενίσχυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των δειγμάτων έγινε σε έναν τελικό όγκο 25 μL στο Peltier Thermal Cycler (BIO –RAD).

Πίνακας 4.3.6.1 Πρωτόκολλο της PCR των Δειγμάτων

x1	
Buffer (10x)	2,5
MgCl₂ (25 mM)	1,5
dNTPs (10 mM)	0,5
338fGC (10 μM)	0,5
518R (10 μM)	0,5
Taq (5U/uL)	0,2
H₂O	18,3
DNA	1
Τελικό Όγκος (μL)	25

Πίνακας 4.3.2.1 Εκκινητές

Ονομασία	Ακολουθία (5' – 3')
Primer 338fGC (F)	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
Primer 518R (R)	ATTACCGCGGCTGCTGCTGG

Ο κύκλος της ενίσχυσης ήταν ο κάτωθι:

1. Επώαση στους 95°C για 10 λεπτά.
2. Επώαση στους 95°C για 1 λεπτό.
3. Επώαση στους 42°C για 1 λεπτό.
4. Επώαση στους 72°C για 2 λεπτά.
5. Μετάβαση στο βήμα 2 για 35 φορές.
6. Επώαση στους 72°C για 7 λεπτά.
7. Παραμονή στους 10°C επ' αόριστον.

4.3.7 Ηλεκτροφόρηση Βαθμιδωτής Αποδιάταξης (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – DGGE)

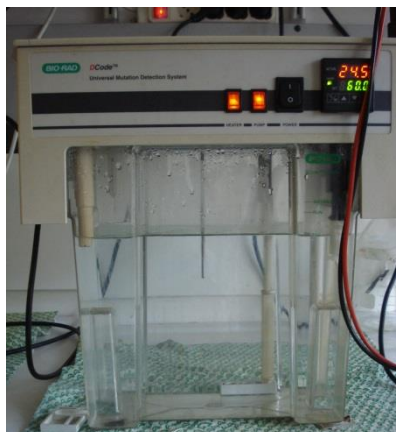
Η τεχνική PCR – DGGE μπορεί να χαρακτηρίσει έναν πληθυσμό ως προς τη σύσταση και τη δυναμική του, καθώς είναι μια τεχνική ανεξάρτητης καλλιέργειας. Αποτελεί μία ευαίσθητη μέθοδο που επιτρέπει τη γρήγορη ανίχνευση απλών και μικρών αλλαγών βάσεων στο μόριο του DNA. Η τεχνική βασίζεται στο διαχωρισμό των μορίων του DNA που έχουν ίδιο μήκος αλλά διαφορετική αλληλουχία νουκλεοτιδίων, σε πηκτή που περιέχει αποδιατακτικές ουσίες – ουρία και φορμαμίδιο – με αυξανόμενη συγκέντρωση κινούμενα προς τα κάτω.

Ο διαχωρισμός των μορίων του DNA γίνεται σύμφωνα με τη θερμοκρασία αποδιάταξής τους (T_m), η οποία εξαρτάται από τη συχνότητα των βάσεων A – T και G – C. Όταν δύο όμοια τμήματα DNA, τα οποία διαφέρουν μόνο σε μία απλή βάση νουκλεοτιδίου, ηλεκτροφορηθούν σε πηκτή με αποδιατακτικούς παράγοντες, θα κινηθούν αρχικά σε σταθερή τροχιά. Καθώς όμως θα κινούνται, σε μία κρίσιμη αποδιατακτική συγκέντρωση, μία ειδική περιοχή εντός της έλικας αποδιατάσσεται και παράγει μερικά αποδιαταγμένο DNA. Αυτό συνοδεύεται από τη ξαφνική μείωση της κινητικότητας του DNA, που οφείλεται στην αποδιάταξη. Με αυτό τον τρόπο τα δύο τμήματα θα ακινητοποιηθούν σε διαφορετικά σημεία της πηκτής, που αντιστοιχούν στις διαφορετικές T_m που παρουσιάζουν. Επιπλέον, τα τμήματα του DNA που έχουν περισσότερα GC είναι πιο σταθερά και απαιτούν μεγαλύτερη συγκέντρωση αποδιατακτικού παράγοντα για να αλλοδομηθούν, ώστε να σταματήσει η κίνησή τους εντός της πηκτής.

Όσον αφορά στην παρούσα εργασία αρχικά, ετοιμάστηκαν τα δύο διαλύματα (*stock*) των αποδιατακτικών παραγόντων με συγκέντρωση 60% (*High Solution*) και 30% (*Low Solution*). Το διάλυμα 60% αποτελούταν από 24 mL φορμαμίδιο, 25,2 g ουρία, 20 mL ακρυλαμίδιο και 2 mL TAE 50x, ενώ το διάλυμα 30% αποτελούταν από 12 mL φορμαμίδιο, 12,6 g ουρία και ομοίως από 20 mL ακρυλαμίδιο και 2 mL TAE 50x.

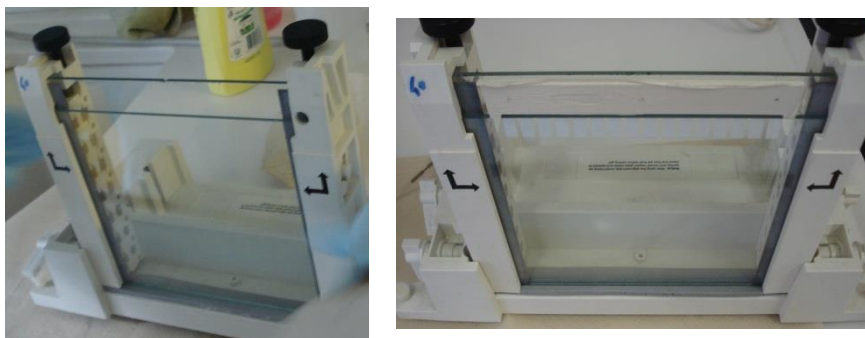
Πριν το «χτίσιμο» του gel τέθηκε σε λειτουργία η συσκευή ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 4.3.7.1) Dcode Universal Detection System ([BIO-](#)

[RAD](#)), ούτως ώστε να φτάσει το ρυθμιστικό διάλυμα τους 60°C και ελέγχθηκε η στάθμη του ρυθμιστικού διαλύματος, όπου εάν δεν ήταν αρκετή συμπληρωνόταν με TAE 1x.



Εικόνα 4.3.7.1 Συσκευή Ηλεκτροφόρησης

Το «χτίσιμο» του gel περιλάμβανε την ένωση δύο ειδικών γυάλινων επιφανειών με την παρεμβολή των spacer στις δύο άκρες και την τοποθέτησή τους κάθετα στον ειδικό μηχανισμό συγκράτησης (Εικόνα 4.3.7.2). Εν συνεχεία, ετοιμάστηκαν τα δύο διαλύματα, ώστε να επιτευχθεί ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου. Ουσιαστικά χρησιμοποιήθηκαν 15 mL από το High Solution και 15 mL από το Low Solution σε δύο διαφορετικά falcon, όπου προστέθηκαν στο καθένα 150 μ L Ammonium peroxisulfide (APS) και 15 μ L TEMED (N,N,N', N' - tetramethylenediamine; Sigma). Στη συνέχεια τα διαλύματα τοποθετήθηκαν στη συσκευή βαθμίδωσης συγκέντρωσης (*gradient delivery system*; Εικόνα 4.3.7.3) και αναμείχθηκαν σχηματίζοντας την πηκτή εντός των δύο γυάλινων επιφανειών, με το πέρας μίας περίπου ώρας.



Εικόνα 4.3.7.2 Μηχανισμός Συγκράτησης Πηκτής



Εικόνα 4.3.7.3 Συσκευή Βαθμίδωσης Συγκέντρωσης

Όταν το gel πολυμερίστηκε, τοποθετήθηκε εντός της συσκευής ηλεκτροφόρησης και φορτώθηκαν τα δείγματα, όπου 8 μL από τα προϊόντα της PCR αναμείχθηκαν με 4 μL loading dye και τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια της πηκτής. Η ηλεκτροφόρηση έτρεξε στα 180V για 240 λεπτά (4 ώρες). Με το πέρας των 4 ωρών η πηκτική εμβαπτίστηκε σε διάλυμα 250 mL TAE 1x με 25 μL Cybergold, για 20 λεπτά με ήπια ανακίνηση. Τέλος, τα σχηματιζόμενα gel παρατηρούνταν σε σύστημα απεικόνισης με υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 4.3.7.4), όπου γινόταν φωτογράφιση και επιλογή των bands προς κόψιμο. Οι κομμένες μπάντες τοποθετούνταν σε erpendorf, προσθέτονταν 50 μL αποστειρωμένου νερού και διατηρούνταν στους 4°C.



Εικόνα 4.3.7.4 Σύστημα Απεικόνισης Υπεριώδους

4.4 Καθαρισμός και Αλληλούχιση του DNA

Στις επιλεγμένες μπάντες που αποκόπηκαν από τα gel των DGGE, εφαρμόστηκε μία PCR με στόχο την ενίσχυση των τμημάτων DNA προς αλληλούχιση (*sequencing*) (Πίνακας 4.4.1), σε έναν τελικό όγκο 100 μL στο Peltier Thermal Cycler (BIO –RAD).

Πίνακας 4.4.1 PCR για το DNA προς Αλληλούχιση.

x1

Buffer (10x)	10
MgCl₂ (25 mM)	6
dNTPs (10 mM)	2
338f (10 μM)	2
518RH13AT (10 μM)	2
Taq (5U/uL)	0,6
H₂O	73,4
DNA	4
Τελικό Όγκος (μL)	100

Πίνακας 4.3.2.1 Εκκινητές

Ονομασία	Ακολουθία (5' - 3')
Primer 338f (F)	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
Primer 518RATM13 (R)	GTAAAACGACGGCCAGTAAATAAAAATAAAAAT GTAAAAAAATTACCGCGGCTGCTGG

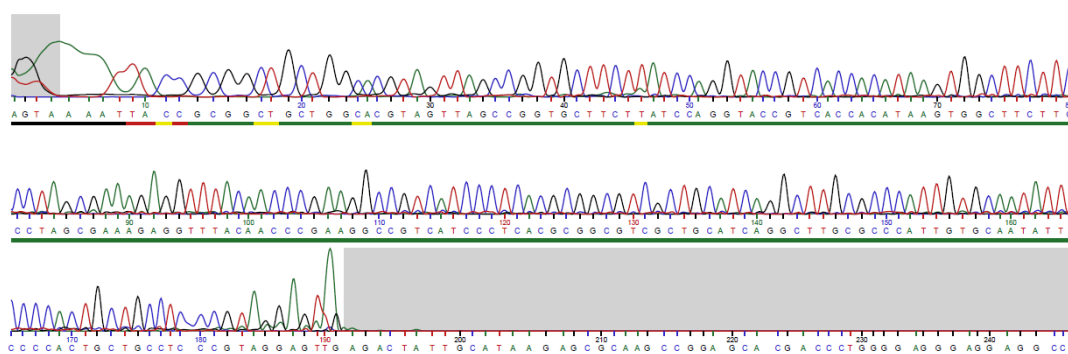
Ο κύκλος της ενίσχυσης ήταν ο ακόλουθος:

1. Επώαση στους 95°C για 10 λεπτά.
2. Επώαση στους 95°C για 1 λεπτό.
3. Επώαση στους 42°C για 1 λεπτό.
4. Επώαση στους 72°C για 2 λεπτά.
5. Μετάβαση στο βήμα 2 για 35 φορές.
6. Επώαση στους 72°C για 7 λεπτά.
7. Παραμονή στους 10°C επ' άοριστον.

4.4.1 Καθαρισμός (Purifying) DNA

Για τον καθαρισμό των δίκλωνων μορίων του DNA, που προέκυψαν από την PCR, χρησιμοποιήθηκε το PCRExtract Mini Kit (5 PRIME). Ειδικότερα, 500 μL Buffer BL προστέθηκαν στις ειδικές στήλες (PCRExtract Mini Column CB2) του kit και φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000 rpm για 1 λεπτό. Ύστερα από τη φυγοκέντρηση, αφαιρέθηκε το υποκείμενο. Παράλληλα, σε νέα erpendorf προστέθηκαν 500 μL Buffer PD και το σύνολο του προϊόντος της αντίδρασης PCR και αναμείχθηκαν. Αυτό το διάλυμα μεταφέρθηκε στις στήλες για να δεσμευθεί το DNA, όπου έμεινε προς επώαση σε συνθήκες περιβάλλοντος για 2 λεπτά και ακολούθως φυγοκεντρήθηκε στα 12.000 rpm για 1 λεπτό. Αφαιρέθηκε και πάλι το υποκείμενο, προστέθηκαν 700 μL Buffer PW και φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000 rpm για 1 λεπτό.

Εν συνεχεία, αφαιρέθηκε το υποκείμενο και προστέθηκαν 500 μL Buffer Pw. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000 rpm για 2 λεπτά, αφαιρέθηκε το υποκείμενο και οι στήλες έμειναν ανοιχτές να στεγνώσουν στον αέρα για μερικά λεπτά. Για την έκπλυση του DNA τοποθετήθηκε η στήλη σε 1,5 mL erpendorf και προστέθηκαν 50 μL Buffer PEB στο κέντρο της μεμβράνης. Έμειναν προς επώαση για 2 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000 rpm για 1 λεπτό. Αφαιρέθηκε η στήλη και τα erpendorf τοποθετήθηκαν το Thermomixer, στους 37°C για μία ημέρα. Τέλος, τα καθαρά πλέον μόρια DNA στάλθηκαν για αλληλούχιση.



Εικόνα 4.4.1 Αλληλουχία DNA

5. Αποτελέσματα και Συζήτηση

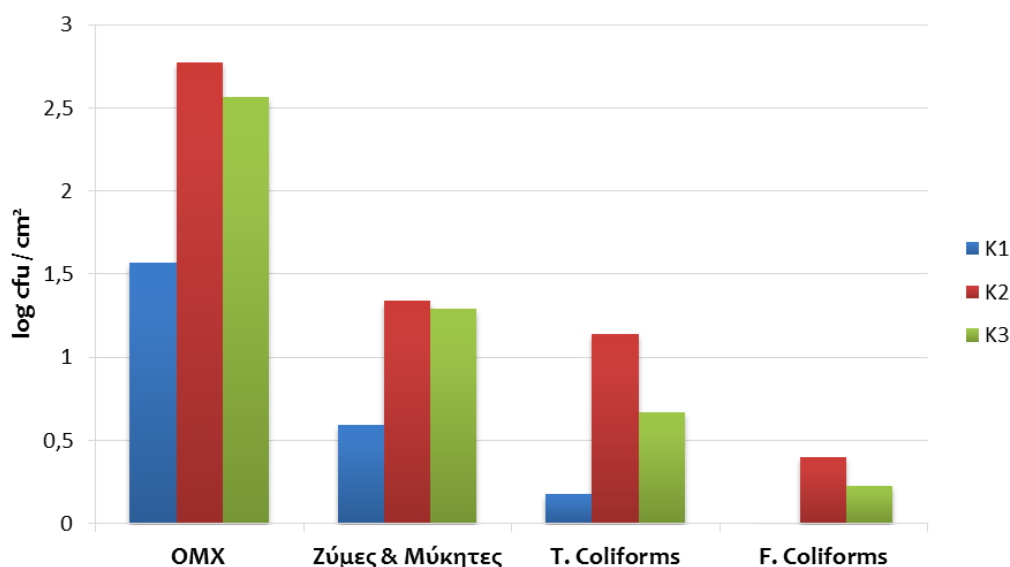
Ο έλεγχος των βακτηρίων στη βιομηχανία επεξεργασίας κρέατος αποτελεί βασικό στοιχείο που διασφαλίζει την ασφάλεια και την ποιότητα των προϊόντων. Ωστόσο, η βακτηριακή εξάλειψη και οι στρατηγικές ελέγχου συνιστούν ένα δύσκολο έργο στην παραγωγή κρέατος, καθώς ο καθαρισμός και η απολύμανση δεν εξαλείφουν όλα τα βακτήρια που υπάρχουν στο περιβάλλον της βιομηχανίας. Παρόλο που ο καθαρισμός και η απολύμανση εκτελούνται καθημερινά – και περισσότερες της μιας φορές εντός της ημέρας – λίγες επιφάνειες είναι στείρες. Τα βακτήρια που υπάρχουν στις επιφάνειες και επιβιώνουν από τη διαδικασία της εξυγίανσης μπορούν να επιμολύνουν (*cross – contamination*) τα τρόφιμα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας.

5.1 Απαρίθμηση Μικροβιακού Πληθυσμού

Οι αποικίες που μετρήθηκαν στα θρεπτικά υποστρώματα καταγράφηκαν σε cfu / cm² και μετατράπηκαν εν συνεχεία σε δεκαδικούς λογάριθμους (log cfu / cm²) για την περεταίρω επεξεργασία τους. Η απαρίθμηση συμπεριλάμβανε τρυβλία που περιείχαν 10 – 300 αποικίες. Στις περιπτώσεις των τρυβλίων που δεν εμφάνιζαν αποικίες, καταγράφονταν ως < 1 cfu / cm² για τα υποστρώματα με ενσωμάτωση (1 mL) και ως < 10 cfu / cm² για τα υποστρώματα με επιφανειακή εξάπλωση (0,1 mL).

Οι μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν αφορούσαν κυρίως παθογόνους μικροοργανισμούς (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.) και μικροοργανισμούς δείκτες (Ζύμες και Μύκητες, *Coliforms*, *Escherichia coli*), οι οποίοι μπορούσαν να δώσουν μία εικόνα για την μικροβιολογική ποιότητα των επιφανειών. Επιπλέον, ελέγχθηκε η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (ΟΜΧ) των δειγμάτων στις διάφορες επιφάνειες των τριών επιχειρήσεων. Μία πρώτη γενική προσέγγιση του συνόλου των δειγμάτων (Διάγραμμα 5.1.1), φανερώνει τα σχετικά μέτρια επίπεδα των ομάδων μικροοργανισμών, που απαριθμήθηκαν και κυμαίνονταν (ως μέσοι όροι) μεταξύ 0,2 και 3 λογαρίθμων. Εδώ να σημειωθεί πως η επιχείρηση Κ1 έφερε μερικά μη μετρήσιμα τρυβλία (> 300 αποικιών) για τα κολοβακτηριοειδή εντερικής

προελεύσεως (*F. Coliforms*), δια τούτο στο διάγραμμα δεν εμφανίζεται η αντίστοιχη μπάρα.



Διάγραμμα 5.1.1 Απεικόνιση της OMX, των Ζυμών & Μυκήτων και των *Coliforms* (μέσος όρος log cfu / cm²) στις Τρεις Επιχειρήσεις.

Επιπρόσθετα, από το διάγραμμα απορρέει το συμπέρασμα πως η επιχείρηση K2 είναι η περισσότερο επιβαρυμένη μικροβιολογικά, για το σύνολο των μικροοργανισμών, ακολουθεί η K3 με πολύ κοντινές τιμές λογαρίθμων, κυρίως για τους OMX και Ζύμες & Μύκητες. Αντιθέτως, η K1 επιχείρηση φαίνεται ως η λιγότερο επιβαρυμένη, με διαφορά της τάξεως του ενός λογαρίθμου περίπου συγκριτικά με τις μετρήσεις της K2, για το σύνολο των μικροοργανισμών. Τέλος, είναι σαφές στο διάγραμμα ότι οι Ζύμες και οι Μύκητες δεν ξεπερνούν τα βακτήρια, καθώς αυτά αναπτύσσονται ταχύτερα και χρησιμοποιούν όλα τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται οι Ζύμες και οι Μύκητες για την ανάπτυξή τους (Jay et al., 2005).

Αναφορικά με τους παθογόνους μικροοργανισμούς, αυτοί εξετάστηκαν ως προς την παρουσία ή απουσία τους στα δείγματα και επιβεβαιώθηκε η παρουσία τους με μοριακές τεχνικές. Στους ακόλουθους πίνακες (5.1.1 και 5.1.2) εμφανίζεται η μικροβιολογική ποιότητα των δειγμάτων, διαχωρισμένα σε επιφάνειες που έρχονται σε άμεση επαφή με τα τρόφιμα και σε αυτές του περιβάλλοντος χώρου, όπου δεν υφίσταται ουδεμία επαφή.

Πίνακας 5.1.1 Μικροβιολογική Ποιότητα των Δειγμάτων Επιφανειών που βρίσκονται σε Άμεση Επαφή με τα Τρόφιμα

Είδος Δείγματος	Επιχείρηση	ΟΜΧ	Ζύμες & Μύκητες	Total Coliforms	Fecal Coliforms	<i>E. coli</i>	<i>Listeria spp.</i>			<i>Salmonella spp.</i>			
							To	T24	T72	To	T24	T72	
Μαχαίρια Χειρός	22	K1	0,95*	<1**	<1	<1	<1	-	-	-	-	-	-
	23	K1	1,00	<1	<1	<1	<1	-	-	-	-	-	-
	N	K2	1,43	1,00	<1	<1	<1	-	-	-	-	-	-
	1a	K3	3,28	1,00	<1	<1	<1	-	-	-	-	-	-
	1b	K3	3,04	1,93	0,54	0,70	<1	-	-	-	-	-	-
Λάμες και Μηχανήματα Κοπής	6	K1	4,41	2,23	3,38	Υ	<1	-	-	-	-	-	+
	17	K1	2,28	0,95	<1	<1	<1	-	-	-	-	-	-
	20	K1	4,31	1,70	0,00	Υ	<1	-	-	-	-	-	-
	G	K2	3,66	1,57	2,08	1,64	<1	-	+	+	-	-	+
	H	K2	2,71	1,03	<1	<1	<1	-	+	+	-	-	-
	K	K2	3,95	1,95	2,45	2,03	<1	-	-	-	-	+	+
	L	K2	3,00	1,08	2,05	1,29	<1	-	-	-	-	-	-
	M	K2	3,92	1,71	1,23	1,04	<1	-	-	+	-	-	+
	1d	K3	4,80	3,42	2,68	1,51	<1	-	+	+	-	+	+

	it	K ₃	3,52	0,00	0,69	0,15	< 1	-	-	-	-	-	-
	ir	K ₃	3,18	2,45	0,58	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
Τραπέζια	9	K ₁	0,60	0,00	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	10	K ₁	1,70	1,34	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	11	K ₁	1,32	0,00	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	14	K ₁	2,45	1,78	0,65	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	B	K ₂	3,34	1,11	0,92	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	O	K ₂	3,15	0,62	0,18	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	ic	K ₃	0,30	< 10	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	ie	K ₃	2,69	1,52	0,90	0,88	< 1	-	-	-	-	-	-
	if	K ₃	1,34	< 10	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	io	K ₃	1,28	0,78	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	Επιφάνειες Επεξεργασίας	1	K ₁	0,48	0,00	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-
2		K ₁	0,00	0,00	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
7		K ₁	0,48	0,00	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
12		K ₁	0,48	0,30	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
15		K ₁	1,95	0,95	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-

16	K1	1,20	0,00	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
18	K1	1,95	0,48	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
19	K1	0,78	< 10	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
21	K1	3,15	1,60	0,04	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
A	K2	2,70	1,26	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
I	K2	2,70	1,28	< 1	< 1	< 1	-	+	+	-	-	-
J	K2	Υ	Υ	Υ	Υ	< 1	-	+	+	-	-	+
1h	K3	3,23	1,64	0,51	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
1i	K3	2,91	1,30	2,30	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
1m	K3	0,90	0,90	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
1n	K3	0,30	0,30	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
1s	K3	1,11	0,30	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
1v	K3	2,92	1,73	1,72	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-

*,** Οι αριθμητικές τιμές είναι εκφρασμένες σε $\log_{10} \text{cfu} / \text{cm}^2$, ενώ αυτές που εκφράζονται με "<" αφορούν μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά cm^2 .

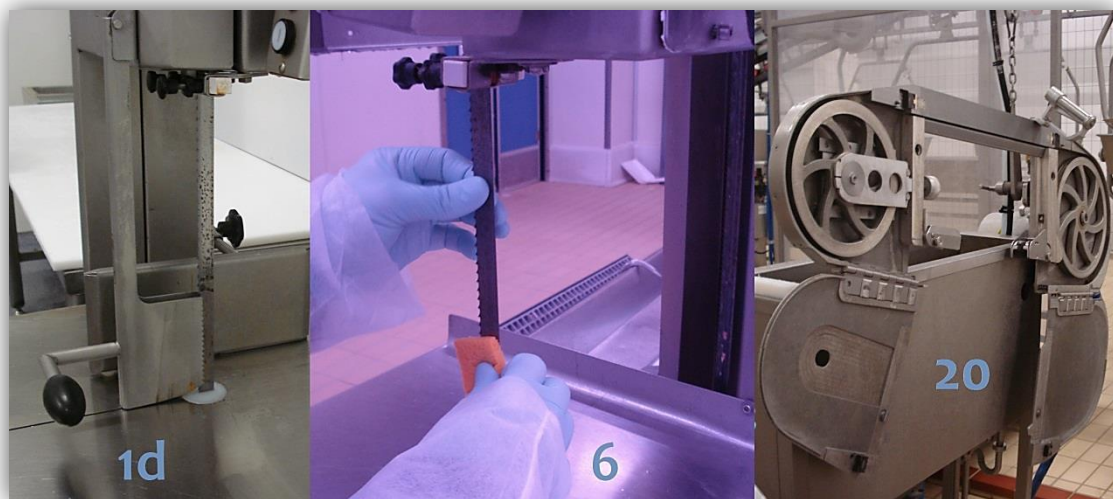
~ Μικροοργανισμοί με ενδείξεις: "Υ" αφορούν μη μετρήσιμο πληθυσμό (> 300 αποικιών); "-" απουσία; "+" παρουσία.

Πίνακας 5.1.2 Μικροβιολογική Ποιότητα των Δειγμάτων Επιφανειών σε μη Επαφή με τα Τρόφιμα

Είδος Δείγματος	Επιχείρηση	OMX	Ζύμες & Μύκητες	Total Coliforms	Fecal Coliforms	<i>E. coli</i>	<i>Listeria spp.</i>			<i>Salmonella spp.</i>			
							To	T24	T72	To	T24	T72	
Τοίχοι	4	K1	1,80	0,78	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	C	K2	2,94	1,95	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	F	K2	3,15	1,78	< 1	< 1	< 1	-	+	+	-	-	-
	1g	K3	3,23	2,23	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	1u	K3	3,85	0,70	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
Αποχετεύσεις	3	K1	1,30	0,48	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	5	K1	0,95	< 10	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	8	K1	1,36	< 10	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	13	K1	1,20	1,04	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	D	K2	4,96	Υ	3,58	Υ	< 1	+	+	+	-	+	+
	E	K2	Υ	3,72	3,62	Υ	< 1	-	+	+	-	-	+
	11	K3	4,50	2,57	1,49	0,34	< 1	-	-	-	-	-	-
	1p	K3	< 10	0,00	< 1	< 1	< 1	-	-	-	-	-	-
	1q	K3	4,91	3,08	1,98	0,94	< 1	-	-	-	-	-	+

Εν αρχή, οι επιφάνειες που έρχονταν σε επαφή με το κρέας, παρουσίασαν διαφοροποιήσεις στη μικροβιολογική τους σύσταση, με τις λάμες και τα μηχανήματα κοπής να εμφανίζουν σχετικά υψηλά επίπεδα, που «άγγιζαν» τους 5 log cfu / cm² ΟΜΧ, ενώ οι υπόλοιπες επιφάνειες παρουσίαζαν 2 λογαρίθμους διαφορά. Αυτό το υψηλό επίπεδο μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα μηχανήματα κοπής και γενικότερα το σύνολο του εξοπλισμού μίας βιομηχανίας επεξεργασίας κρέατος παρουσιάζουν έναν ιδιαίτερα πολύπλοκο σχεδιασμό, που δεν καθιστά εύκολη και αποτελεσματική την εφαρμογή της εξυγίανσης (Moretro et al., 2013)

Ειδικότερα, η ΟΜΧ στα μηχανήματα κοπής κυμαινόταν από 2,20 έως 4,8 log cfu / cm², ενώ οι ζύμες βρίσκονταν σε χαμηλότερα επίπεδα της τάξεως του 1 – 2,5 λογαρίθμους, όπως και τα κολοβακτηριοειδή. Με κριτήριο την επιχείρηση, φαίνεται πως τα δείγματα της Κ3 και της Κ1 έφεραν το υψηλότερο μικροβιακό φορτίο, με χαρακτηριστικό το δείγμα από τη Λάμα κοπής των οστών (1d) της Κ3, η οποία έφερε τους μεγαλύτερους λογαρίθμους σε ΟΜΧ (4,8 log cfu / cm²) και Ζύμες & Μύκητες (3,42 log cfu /



cm²).

Εικόνα 5.1.1 Δείγματα Μηχανημάτων Κοπής με τα Υψηλότερα Επίπεδα Απαρίθμησης

Επιπλέον, το δείγμα (6) από τη Λεπίδα κοπής στη γραμμή επεξεργασίας της Κ1 επιχείρησης, έφερε ΟΜΧ της τάξεως των 4,41 log cfu / cm², ολικά Coliforms της τάξεως των 3,38 λογαρίθμων και κολοβακτηριοειδή εντερικής

προέλευσης σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα (μη αριθμήσιμα). Την ίδια εικόνα παρουσίαζε και το Μαχαίρι κοπής ημι-σφαγίου (20) της K1, με 4,31 log cfu / cm² OMX και μη αριθμήσιμα *F. Coliforms*. Παρόμοιες διακυμάνσεις μεταξύ 2,23 και 3 λογαρίθμων OMX βρέθηκαν από τους Cetin et al. (2006). Μία άλλη μελέτη έδειξε πως τα μηχανήματα κοπής, σε συνδυασμό με τα τραπέζια επεξεργασίας ανήκαν στα πιο μολυσμένα κομμάτια του εξοπλισμού με OMX της τάξης των 6 – 7 log cfu / cm² (Schlegelova et al., 2010). Αυτά τα υψηλά επίπεδα λογαρίθμων OMX αναφέρθηκαν και από τους Gounadaki et al. (2008) σε μηχανήματα κοπής και μίξερ, από επτά εργοστάσια επεξεργασία αλλαντικών.

Σε ότι αφορά τις διάφορες επιφάνειες επεξεργασίας, η OMX κυμαινόταν στους 0,3 – 3 λογαρίθμους, οι Ζύμες & Μύκητες στους 0 – 1,7 λογαρίθμους και τα Coliforms στους 0 – 2,3 λογαρίθμους. Η επιχείρηση K1 δεν παρουσίασε Coliforms σε κανένα εκ των δειγμάτων, με εξαίρεση μία ταινία μεταφοράς στη γραμμή του σφαγείου (21), η οποία χαρακτηριζόταν από 1 log cfu / cm². Ιδιαίτερης σημασίας, λόγω του υψηλού μικροβιακού της επιπέδου, μπορεί να θεωρηθεί μία επιφάνεια (J) της επιχείρησης K2. Αυτή αφορά έναν σωλήνα που διασταυρώνει την χοάνη που περιέχει την κρεατόπαστα και το υλικό της ενθήκευσης. Αυτός ο εξοπλισμός, λόγω της πολυπλοκότητας της κατασκευής του, επιβεβαιώνει τη δυσκολία που παρουσιάζει η εφαρμογή της εξυγίανσης στα διάφορα μέρη του.



Εικόνα 5.1.2 Σωλήνας Διασταύρωσης για την Ενθήκευση των Σαλαμιών

Επιπρόσθετα, οι επιφάνειες των τραπεζιών εργασίας καθώς και των μαχαιριών χειρός έφεραν σχετικά μέτρια επίπεδα μικροοργανισμών, με ΟΜΧ από 1 – 3 λογαρίθμους, Ζύμες και Μύκητες από 0 – 2 λογαρίθμους και κολοβακτηριοειδή από 0 – 1 λογάριθμο. Πιο συγκεκριμένα, τα μαχαίρια της Κ3 έφεραν 3 λογαρίθμους ΟΜΧ και 2 λογαρίθμους Ζύμες & Μύκητες, ενώ η Κ1 παρουσίαζε μόλις 1 και 0 λογαρίθμους, αντίστοιχα. Από την άλλη μεριά, τα τραπέζια επεξεργασίας εμφάνιζαν παρόμοια εικόνα μεταξύ των Κ1 και Κ3 επιχειρήσεων, ενώ αυτά της Κ2 φαίνονταν ως πιο επιβαρυσμένα μικροβιολογικά. Η Gavriil (2009), μετά την εξυγίανση βρήκε αυξημένα επίπεδα ΟΜΧ και εντεροβακτηρίων στους πάγκους εργασίας τεμαχισμού και συσκευασίας των προϊόντων κρέατος, μα μειωμένη ΟΜΧ και εντεροβακτήρια στα μαχαίρια κοπής.

Όσον αφορά στις επιφάνειες που δεν είχαν καμία επαφή με τα τρόφιμα και συγκεκριμένα οι αποχετεύσεις και οι τοίχοι, έδωσαν μερικά ενδιαφέροντα δείγματα. Τα δείγματα της επιχείρησης Κ1 εμφάνιζαν ΟΜΧ και Μύκητες της τάξεως του 1 λογαρίθμου, ενώ δεν εμφάνιζαν κολοβακτηριοειδή. Εν αντιθέσει, η Κ3 έφερε στο φρεάτιο αποχέτευσης 4,9 log cfu / cm² ΟΜΧ, 3 λογαρίθμους Ζύμες και Μύκητες, 2 log cfu / cm² ολικών Coliforms και 1 λογάριθμο Coliforms εντερικής προέλευσης, ενώ οι τοίχοι της εμφάνιζαν διαφορά 1 λιγότερου λογαρίθμου εξ αυτών της αποχέτευσης και δεν έφεραν καθόλου κολοβακτηριοειδή. Τέλος η επιχείρηση Κ2 ήταν η πιο επιβαρυσμένη αφού τα δείγματα από τις αποχετεύσεις έφεραν 5 λογάριθμους ΟΜΧ και πολύ υψηλούς πληθυσμούς σε Ζύμες & Μύκητες καθώς και σε εντερικά Coliforms, με τα ολικά να αγγίζουν τους 3,5 λογαρίθμους. Σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη, οι Cetin et al. (2006) βρήκαν σε δείγματα από τοίχους επιχειρήσεων επεξεργασίας κόκκινου κρέατος, μέσες τιμές ΟΜΧ της τάξεως των 0,69 – 1,56 log cfu / cm².

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η ύπαρξη των Ζυμών και Μυκήτων στις επιφάνειες είναι ένδειξη μη αποτελεσματικής εφαρμογής των διαδικασιών καθαριότητας και απολύμανσης, καθώς και των προαπαιτούμενων προγραμμάτων των συστημάτων υγιεινής στις βιομηχανίες τροφίμων. Η επικινδυνότητά τους είναι μικρή, ωστόσο η παρουσία τους δε θα πρέπει να παραβλέπεται καθώς με την μεταβολική

τους δραστηριότητα αλλάζουν το pH του περιβάλλοντός τους ευνοώντας με αυτό το τρόπο την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών (Belessi et al., 2008). Επιπρόσθετα, η ύπαρξη των Coliforms στις διάφορες επιφάνειες αποτελεί ένδειξη επιμόλυνσης (Belessi, 2014).

Σε ότι αφορά τους παθογόνους μικροοργανισμούς, η *Escherichia coli* δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα. Έχει προταθεί ότι η επιβίωση της στα περιβάλλοντα επεξεργασίας κρέατος, δεν είναι συνδεδεμένη με την ενίσχυση των ιδιοτήτων επιβίωσης του μικροοργανισμού, αλλά με το γεγονός ότι το βακτήριο είναι «εξειδικευμένο» σε συγκεκριμένες πρώτες ύλες και βιοθέσεις (Holah et al., 2004). Εξ αυτού μπορεί να υποτεθεί ότι οι προμηθευτές των επιχειρήσεων εφαρμόζουν τους κανόνες υγιεινής και ελέγχουν τακτικά τις εγκαταστάσεις και τις πρακτικές τους, με αποτέλεσμα ασφαλείς πρώτες ύλες, που δεν αποτελούν πηγές επιμόλυνσης.

Εν αντιθέσει με την *E.coli*, η *Listeria monocytogenes* συνδέεται με τις ικανότητες επιβίωσης του μικροοργανισμού στα διάφορα περιβάλλοντα και εξακολουθεί να αποτελεί τη μεγαλύτερη μικροβιακή απειλή για το πλήθος του κλάδου των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένης και της βιομηχανίας επεξεργασίας κρέατος (Moretro et al., 2013). Μάλιστα, μελέτες έχουν αναφέρει την ύπαρξη της *Listeria monocytogenes* σε επιφάνειες που δεν έρχονται σε άμεση επαφή με τα τρόφιμα (Schoder et al., 2011). Επιπλέον, στην παραγωγή κρέατος δίδεται έμφαση στα παθογόνα μικρόβια εντερικής προέλευσης, όπως η *Salmonella* spp. και η *Escherichia coli*, με σημαντικούς πόρους να διατίθενται για περιβαλλοντικά δείγματα, εκ των οποίων ένα μεγάλο μέρος εμφανίζονται ως αρνητικά (Moretro et al., 2013).

Όσον αφορά τους παθογόνους μικροοργανισμούς της παρούσας μελέτης, στο σύνολο των 58 δειγμάτων, 9 δείγματα (15,5%) εντοπίστηκαν ως ύποπτα με *Listeria* spp. και 9 δείγματα (15,5%) με *Salmonella* spp. Για την επιβεβαίωση της ύπαρξης των παθογόνων στα ύποπτα δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης.

Αξιοσημείωτο θεωρείται ότι το σύνολο των απομονώσεων του παθογόνου *Listeria* spp. προέρχονταν από την K2 επιχείρηση και συγκεκριμένα από επιφάνειες επαφής με τα τρόφιμα (μηχανήματα κοπής),

ενώ η *Salmonella* spp. σχετιζόταν με δείγματα από όλες τις επιχειρήσεις. *Listeria monocytogenes* βρέθηκε από τους Schlegelova et al. (2010) στις επιφάνειες των τραπεζιών επεξεργασίας και στα μηχανήματα κοπής μιας επιχείρησης σφαγής και επεξεργασίας χοιρινού και βόειου κρέατος. Επιπλέον, μελέτες στις επιφάνειες των βιομηχανιών κρέατος βρήκαν το 1/3 των δειγμάτων θετικά για *L. monocytogenes* (Gomez et al., 2012) και άλλες ανέφεραν ένα ποσοστό της τάξεως του 11,7% θετικών δειγμάτων σε σημεία δειγματοληψίας, όπως μηχανήματα κοπής και ενθήκευσης, μίξερ, μαχαίρια και τραπέζια (Gounadaki et al., 2008). Ακόμη, μία μελέτη ανέφερε μικρότερη συχνότητα ανίχνευσης του παθογόνου, με μόνο ένα θετικό δείγμα (στη μηχανή ενθήκευσης) σε 20 δείγματα που ελήφθησαν από μία επιχείρηση παραγωγής αλλαντικών (Chevallier et al., 2006).

5.2 Μοριακές Τεχνικές Ταυτοποίησης

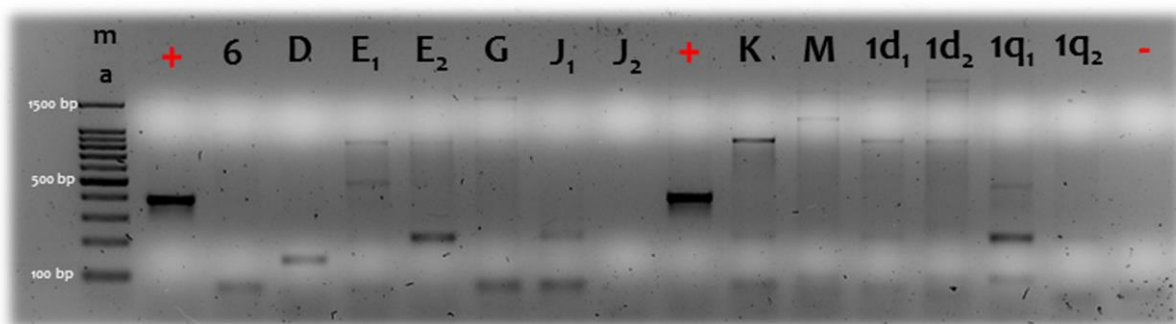
5.2.1 PCR Ανίχνευσης των *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* spp.

Για τα «ύποπτα» δείγματα πιθανόν φέροντα *Listeria monocytogenes* εφαρμόστηκε η μοριακή τεχνική qPCR, όπου με χρήση του θετικού μάρτυρα *Listeria monocytogenes* EGDe διαπιστώθηκε ότι μόνο ένα εκ των δειγμάτων (1,7%) έδιδε παρόμοιο σήμα. Το δείγμα (M) προερχόταν από μία επιφάνεια σε άμεση επαφή με το κρέας και συγκεκριμένα ήταν η λεπίδα κοπής του κούτερ (εικόνα 5.2.1.1) της βιομηχανίας παρασκευής αλλαντικών (Κ2). Τα υπόλοιπα οκτώ (8) δείγματα έφεραν είδη της *Listeria* spp. αλλά δεν ανήκαν στον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*.



Εικόνα 5.2.1.1 Επιφάνεια εκ της οποίας δείγμα έφερε *Listeria monocytogenes*

Εκ παραλλήλου, έλαβε χώρα η ταυτοποίηση των εννιά (9) «ύποπτων» δειγμάτων με *Salmonella* spp., η οποία πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της PCR και τη χρήση του θετικού μάρτυρα *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028). Ύστερα από την ενίσχυση των τμημάτων του DNA, με τους ειδικούς εκκινητές SALM 3 & 4, ο θετικός μάρτυρα απέδωσε ένα τμήμα περίπου 389 bp (Cocolin et al., 1998). Ύστερα από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (εικόνα 5.2.1.2), κανέναν εκ των ύποπτων δειγμάτων δεν έφερε τμήμα DNA αυτού του μεγέθους. Ένεκεν τούτου, προκύπτει το συμπέρασμα πως σε κανένα από τα 9 δείγματα δεν απαντάται ο παθογόνος μικροοργανισμός *Salmonella* spp.



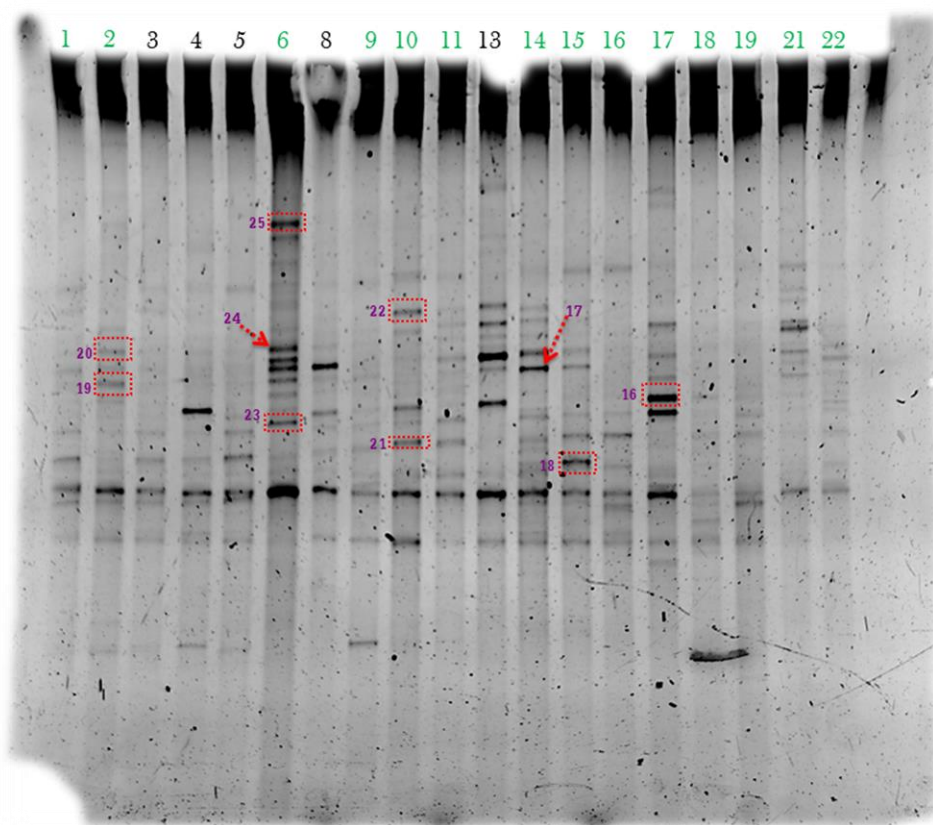
Εικόνα 5.2.1.2 Απεικόνιση Ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της αντίδρασης PCR με τη χρήση των SALM 3 & SALM 4 εκκινητών. Στήλες: **ma**: δείκτης μοριακών βαρών (ladder), **+**: θετικός μάρτυρας, **-**: αρνητικός μάρτυρας.

5.2.2 Ηλεκτροφόρηση Βαθμιδωτής Αποδιάταξης (DGGE)

Η μέθοδος ανεξάρτητης καλλιέργειας DGGE χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ούτως ώστε να προσδιοριστεί η βακτηριακή ποικιλότητα στις τρεις επιχειρήσεις, για τις οποίες λήφθηκαν τα προφίλ του DNA τους. Έτρεξε μία πηκτή για κάθε επιχείρηση, στο σύνολο των δειγμάτων, με εξαίρεση την επιχείρηση K1, στην οποία λόγω του πλήθους αυτών αφαιρέθηκαν όμοιες επιφάνειες και διατηρήθηκε μόνο μία χαρακτηριστική. Τα προφίλ που διαμορφώθηκαν ήταν αρκετά σύνθετα με τις μπάντες να

κυμαίνονται από 6 έως και 14 ανά δείγμα. Σε κάθε προφίλ DGGE επιλέχθηκαν οι μπάντες ενδιαφέροντος, με παράγοντα τη θέση τους στην πηκτή και την ποιότητα του προϊόντος (ένταση). Οι μπάντες που αποκόπηκαν ήταν συνολικά 31 και απεικονίζονται στις εικόνες 5.2.2.1 – 5.2.2.3.

Επιπρόσθετα, οι επιλεγθείσες μπάντες ενισχύθηκαν και στάλθηκαν για αλληλούχιση. Τα αποτελέσματα των ακολουθιών επεξεργάστηκαν και αναζητήθηκαν οι ομοιότητές τους στο National Center for Biotechnology Information (NCBI), σε μία βάση δεδομένων που χρησιμοποιεί την ανάλυση νουκλεοτιδίων Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Η βάση δεδομένων επέτρεψε τον προσδιορισμό των 27 bands, ενώ οι υπόλοιπες 4 δεν μπόρεσαν να προσδιοριστούν. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης φαίνονται στους πίνακες 5.2.2.1 – 5.2.2.3, αντίστοιχα.



Εικόνα 5.2.2.1 DGGE profile της Επιχείρησης K1

Πίνακας 5.2.2.1 Προσδιορισμός σε επίπεδο γένους και εν μέρει είδους των Επιλεγμένων Bands από το προφίλ DGGE της K1.

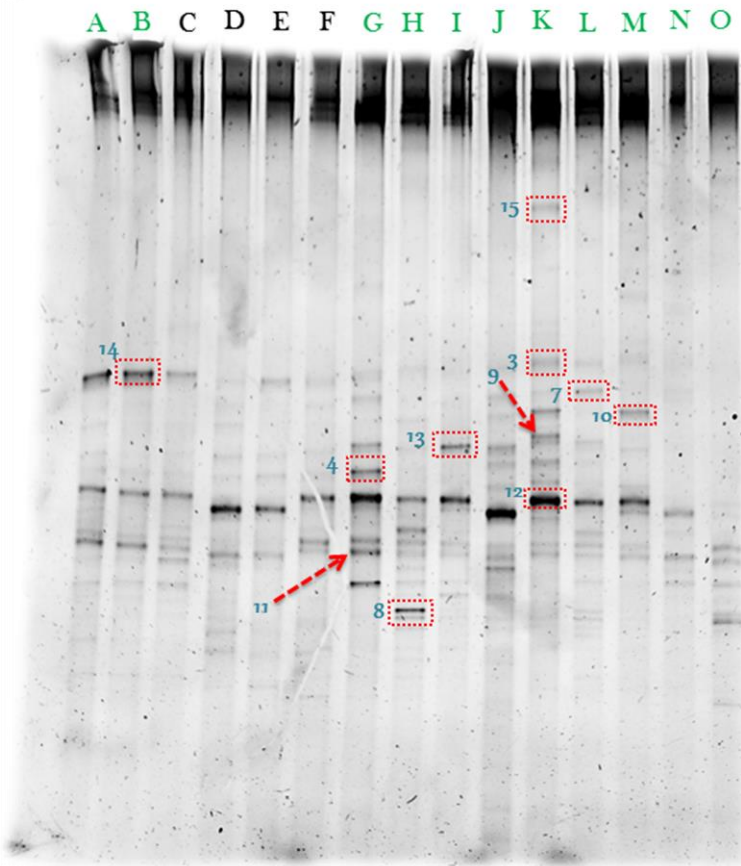
No of Band	Closest described Relative	Identity %	Συνομοταξία (Phylum)	Ομοταξία (Class)	Τάξη (Order)	Οικογένεια (Family)
20	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
19	<i>Acinetobacter</i> sp.	98	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>
25	<i>Pseudomonas graminis</i>	99	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
24	uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.	100	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
23	<i>Brochothrix</i> sp.	100	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Listeriaceae</i>
22	uncultured <i>Arthrobacter</i> sp.	100	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae</i>
21	unidentified					
17	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	99	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>
18	<i>Sphingomonas</i> sp.	100	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alpha</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
16	unidentified					

Πίνακας 5.2.2.2 Προσδιορισμός σε επίπεδο γένους και εν μέρει είδους των Επιλεγμένων Bands από το προφίλ DGGE της Κ2.

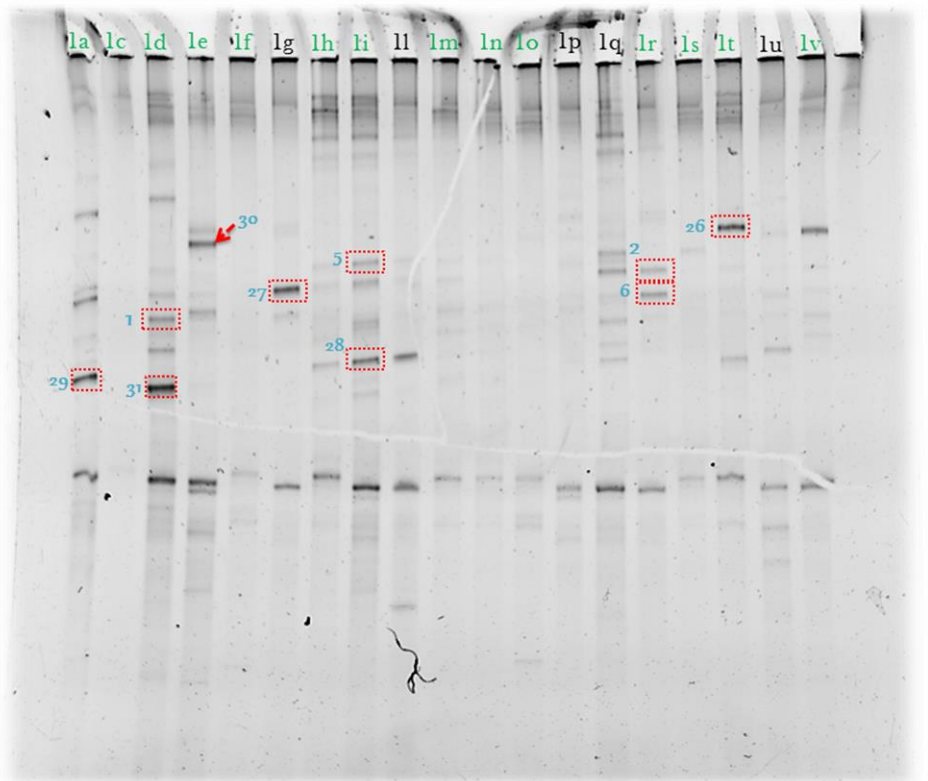
No of Band	Closest described Relative	Identity %	Συνομοταξία (Phylum)	Ομοταξία (Class)	Τάξη (Order)	Οικογένεια (Family)
14	<i>unidentified</i>					
4	uncultured <i>Moraxella</i> sp.	100	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>
11	uncultured <i>Blastochloris</i> sp.	100	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alpha</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>
8	<i>Corynebacterium</i> sp.	99	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>
13	<i>Psychrobacter</i> sp.	100	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>
15	uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.	99	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
3	uncultured <i>Bacillus</i> sp.	100	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>
9	<i>Acinetobacter xiamenensis</i>	97	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>
12	Uncultured bacterium	100				
7	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	100	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>
10	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	100	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>

Πίνακας 5.2.2.3 Προσδιορισμός σε επίπεδο γένους και εν μέρει είδους των Επιλεγμένων Bands από το προφίλ DGGE της Κ3.

No of Band	Closest described Relative	Identity %	Συνομοταξία (Phylum)	Ομοταξία (Class)	Τάξη (Order)	Οικογένεια (Family)
29	<i>Acinetobacter johnsonni</i>	99	Proteobacteria	Gamma	Pseudomonadales	Moraxellaceae
1	<i>Acinetobacter johnsonni</i>	99	Proteobacteria	Gamma	Pseudomonadales	Moraxellaceae
31	<i>Acinetobacter</i> sp.	100	Proteobacteria	Gamma	Pseudomonadales	Moraxellaceae
30	<i>Flavobacterium</i> sp.	99	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae
27	uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.	100	Proteobacteria	Gamma	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
5	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	Proteobacteria	Gamma	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
28	<i>Pseudomonas migulae</i>	100	Proteobacteria	Gamma	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
2	<i>Pseudomonas graminis</i>	100	Proteobacteria	Gamma	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
6	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	Proteobacteria	Gamma	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
26	<i>Lactococcus piscium</i>	98	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae



Εικόνα 5.2.2.2
 DGGE profile της Επιχείρησης
 K2



Εικόνα 5.2.2.3
 DGGE profile της
 Επιχείρησης K3

Τα τρία προφίλ DGGE που δημιουργήθηκαν και στην συνέχεια επιλεκτικά αλληλουχήθηκαν, ως προς κάποιες χαρακτηριστικές μπάντες, βρέθηκαν να περιέχουν μικροβιακό πληθυσμό που στο σύνολό του ήταν βακτήρια. Πιο συγκεκριμένα ανήκαν στις συνομοταξίες των *Proteobacteria*, *Actinobacteria* και *Firmicutes*, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται τα ευρέως εμφανιζόμενα – στη βιομηχανία επεξεργασίας κρέατος – γένη των *Pseudomonas* spp. και *Acinetobacter* spp. Η εύρεση αυτών των βακτηρίων σε μεγάλο βαθμό μπορεί να αποδοθεί στην ενδογενή ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν τα gram θετικά βακτήρια έναντι των βιοκτόνων (McDonnell and Russell, 2001; Morente et al., 2013).

Ωστόσο, τα προφίλ των τριών επιχειρήσεων βρέθηκαν να διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τους προσδιορισθέντες μικροοργανισμούς στο είδος των δειγμάτων. Ειδικότερα, η K1 επιχείρηση εμφάνισε τα γένη *Pseudomonas* spp. και *Acinetobacter* spp. – στις ταινίες μεταφοράς του κρέατος, τα γένη *Brochothrix* sp. και *Pseudomonas* sp. (uncultured) – σε λεπίδα κοπής, όπου και προσδιορίστηκε το είδος *Pseudomonas graminis*. Επιπλέον, εμφανίστηκε το μη καλλιεργήσιμο γένος *Arthrobacter* sp. – σε ένα τραπέζι κοπής χοιρινού κρέατος, καθώς και το είδος *Acinetobacter haemolyticus* – σε ένα τραπέζι όπου συλλέγονταν τεμάχια κρέατος. Άλλο ένα γένος προσδιορίστηκε στο τμήμα του σφαγείου της K1 επιχείρησης, το οποίο ήταν το *Sphingomonas* sp.

Ομοίως, σε μία μελέτη της βακτηριακής σύνθεσης μάντων μεταφοράς ενός χώρου αποστέωσης κρέατος, ο *Sphingomonas* sp. βρέθηκε μεταξύ των μην καλλιεργήσιμων βακτηρίων. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η Intralox επιφάνεια των μάντων μεταφοράς, χαρακτηριζόταν από δύο διαφορετικούς μικροοργανισμούς, που μοιράζονται μεγάλης ομοιότητας, τους *Pseudomonas* spp. και *Sphingomonas* spp. (Brightwell et al., 2006).

Σε ότι αφορά στην K2 επιχείρηση, παρουσίασε στο δίσκο κοπής του κούτερ, τα uncultured γένη *Moraxella* sp. και *Blastochloris* sp, καθώς και τα γένη *Corynebacterium* sp. – σε μίξερ, *Psychrobacter* sp. – στη χοάνη ενθήκευσης, ενώ στις κεφαλές ενθήκευσης τα είδη *Staphylococcus saprophyticus* και *Staphylococcus xylosus*. Ακόμη, η μηχανή κοπής κιμά χαρακτηριζόταν από μη καλλιεργήσιμα γένη *Pseudomonas* sp. και *Bacillus* sp. και από το είδος *Acinetobacter xiamenesis*, ενώ η λεπίδα κοπής του

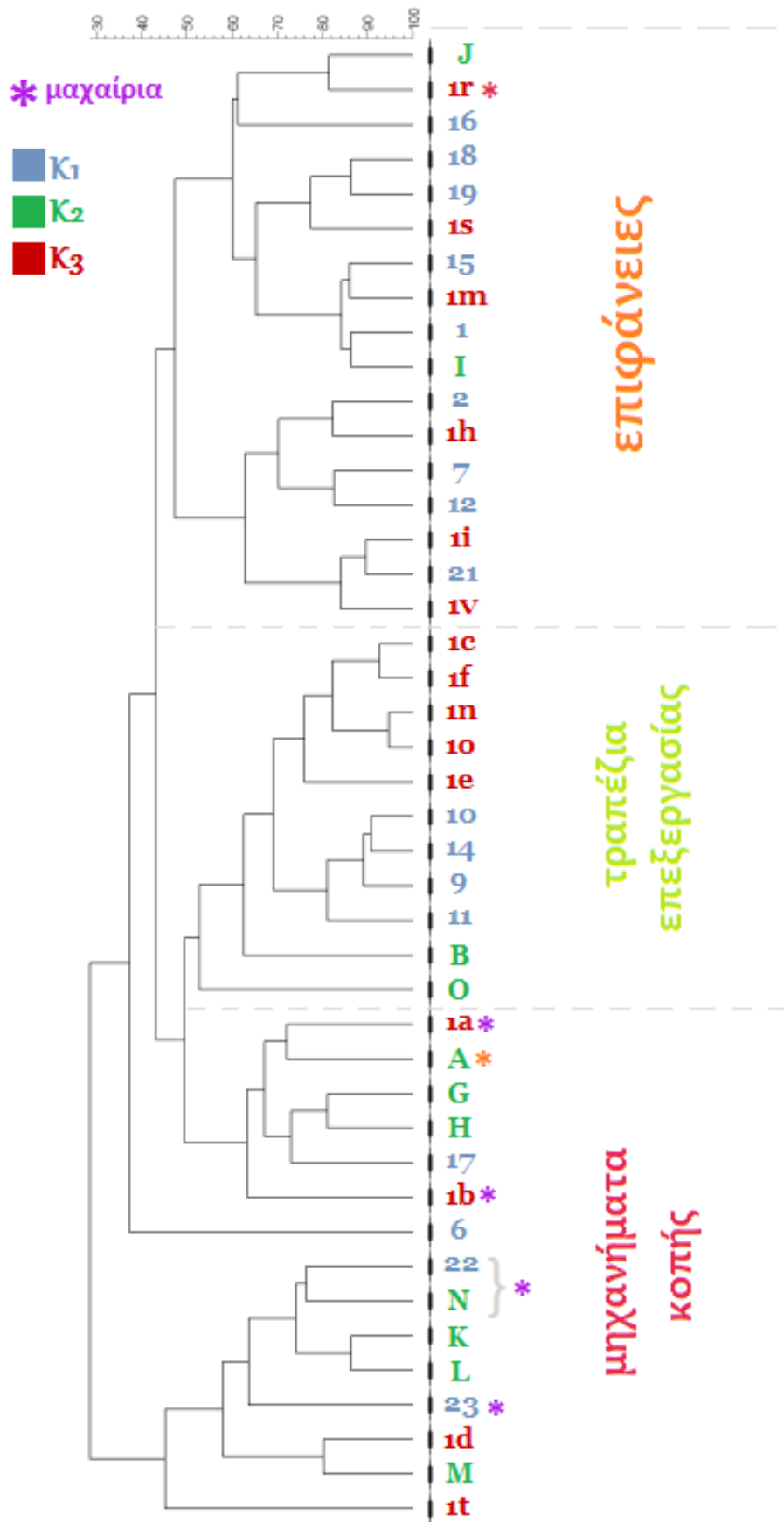
κούτερ έφερε το είδος *Acinetobacter johnsonni*. Οι Mettler και Carpentier (1998) βρήκαν επίσης τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* sp. και *Staphylococcus* sp. στο πάτωμα μίας εγκατάστασης επεξεργασίας κρέατος.

Τέλος, το προφίλ των μικροβίων που ανιχνεύθηκε στην Κ3 επιχείρηση, περιελάμβανε τα γένη *Pseudomonas* sp. με τα είδη *P. migulae* – σε επιφάνεια μεταφοράς, *P. graminis* – σε μηχανή κοπής κιμά και *Acinetobacter* sp. με το είδος *Acinetobacter johnsonni* – σε μαχαίρι χειρός και λάμα μηχανήματος κοπής. Επιπλέον, στο τραπέζι στήριξης της λάμας κοπής ανιχνεύθηκε το γένος *Flavobacterium* sp., ενώ τέλος, στη γραμμή παραγωγής Hamburger ταυτοποιήθηκε το είδος *Lactococcus piscium*.

Τα βακτήρια που ανιχνεύθηκαν και απεικονίζουν εν μέρει τη μικροβιακή ποικιλότητα των επιχειρήσεων αποτελούν την αρχική μικροχλωρίδα των προϊόντων κρέατος (Cukon et al. 2012). Είναι γνωστό ότι οι ψευδομονάδες κυριαρχούν, στο κρέας και στους χώρους που επεξεργάζεται, σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς, γεγονός που οφείλεται στον γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης των βακτηρίων αυτών (Koutsoumanis et al., 2004). Τέλος, μια γενικότερη σύγκριση ποιοτικού προσδιορισμού των βακτηριδίων από ποικίλους τύπους περιβαλλόντων παραγωγής τροφίμων αποκάλυψε ότι οι *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus* και γαλακτικά βακτήρια συνήθως κυριαρχούν (Moretro et al., 2013).

5.2.2.1 Cluster Analysis

Για τις επιφάνειες σε άμεση επαφή με τα τρόφιμα, διαμορφώθηκαν τρία επιπλέον προφίλ DGGE, τα οποία υποβλήθηκαν σε αναλύσεις εικόνας και συστάδων (*cluster analysis*), με τη χρήση του λογισμικού πακέτου *Bionumerics* v.4.6. Ο συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των ομοιοτήτων στα προφίλ του DGGE και δημιουργήθηκε το ακόλουθο δενδρόγραμμα.



Εικόνα 5.2.2.4 Δενδρόγραμμα απεικόνισης του βαθμού ομοιότητας (κατά Pearson) των βακτηριακών προφίλ DGGE των τριών επιχειρήσεων κρέατος.

Η ανάλυση των συστάδων του συνόλου των δειγμάτων των επιφανειών και των τριών επιχειρήσεων παρουσιάζει σχετικά χαμηλή ομοιότητα, της τάξεως του 47%. Παράλληλα, δείγματα επιφανειών μεταξύ των Κ1 και Κ3 βιομηχανιών τεμαχισμού κρέατος εμφανίζουν ομοιότητα που κυμαίνεται στο 60 – 89%. Από την άλλη, εκ των δύο δειγμάτων των επιφανειών της Κ2 επιχείρησης, το ένα έχει 84% ομοιότητα με μία επιφάνεια της Κ1, ενώ το άλλο φέρει 82% ομοιότητα με ένα μηχάνημα κοπής κιμά της Κ3 επιχείρησης.

Σε ότι αφορά στην ποιοτική σύσταση των δειγμάτων των διάφορων τραπεζιών επεξεργασίας μεταξύ των τριών βιομηχανιών, είναι της τάξεως του 52%. Το σύνολο των τραπεζιών της Κ3 κυμαίνεται στο 75 – 94%, ενώ της Κ1 στο 80 – 89%. Επιπλέον, η ομοιότητα μεταξύ των τραπεζιών της Κ3 και Κ1 έγκειται στο 68%. Τα δείγματα της Κ2 επιχείρησης εμφανίζουν 52 – 62% ομοιότητα με το σύνολο των δειγμάτων των Κ1 και Κ3.

Τα δύο μαχαίρια της Κ3 βιομηχανίας παρουσιάζουν 62% ομοιότητα, ενώ το ένα από αυτά χαρακτηρίζεται από 72% ομοιότητα με μία επιφάνεια κοπής από την Κ2. Το μαχαίρι χειρός της Κ1 φέρει 76% ομοιότητα με το μαχαίρι της Κ2. Επίσης, δύο διαφορετικά μηχανήματα κοπής της Κ2 επιχείρησης παρουσιάζουν 86% ομοιότητα, ενώ μία λάμα κοπής της Κ3 έχει 78% ομοιότητα με τη λεπίδα κοπής της Κ2 επιχείρησης. Τέλος, χαρακτηριστικό είναι το δείγμα 6 της Κ1 βιομηχανίας, το οποίο εμφανίζει 36% ομοιότητα με το σύνολο των συστάδων των τραπεζιών και των επιφανειών.

Βιβλιογραφία

- Adams M.R. and Moss M.O. (1995). Food Microbiology. *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge.
- An Y.H. and Friedman R.J. (1998). Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterial Surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 43 (3): 338 – 348.
- Antic D., Blagojevic B., Ducic M., Mitrovic R., Nastasijevic I., Buncic S. (2010). Treatment of Cattle Hides with Shellac – in – ethanol Solution to Reduce Bacterial Transferability – A Preliminary Study. *Meat Science*, 85: 77 – 81.
- Antoniadou A. and Andresakis D.I. (2008). Biofilms and their role in Nature and Medicine. *Hellenic Hospital Dentistry*, 1: 43 – 50.
- Argyri A.A. (2010). Quantifying Meat Spoilage with an Array of Biochemical Indicators – Ph.D. Thesis. *Cranfield University*.
- Arthur T.M., Bosilevac J.M., Nou X., Shackelford S.D., Wheeler T.L. and Kent M.P. (2004). *Escherichia coli* O157 Prevalence and Enumeration of Aerobic Bacteria, *Enterobacteriaceae* and *Escherichia coli* O157 at Various Steps in Commercial Beef Processing Plants. *Journal of Food Protection*, 67: 658 – 665.
- Bacon R.T., Sofos J.N., Belk K.E., Hyatt D.R. and Smith G.C. (2002). Prevalence and Antibiotic Susceptibility of *Salmonella* Isolated from Beef Animal Hides and Carcasses. *Journal of Food Protection*, 65: 284 – 290.
- Bardos L. and Barankova H. (2010). Cold Atmospheric Plasma: Sources, Processes and Applications. *Thin Solid Films*, 518: 6705 – 6713.
- Belessi C.A., Papanikolaou S., Drosinos E.H. and Skandamis P.N. (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.
- Belessi C.A. (2014). Study of the Physiological Characteristics of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Dairy Plants - Ph.D. Study. *Agricultural University of Athens*, Athens.
- Berends B.R., Van Knapen F., Mossel D.A.A., Burt S.A. and Snijders J.M.A. (1998). *Salmonella* spp. On Pork at Cutting Plants and at the Retail Level and the Influence of Particular Risk Factors. *International Journal of Food Microbiology*, 44: 207 – 217.

- Bixler G.D. and Bhushan B. (2012). Biofouling: Lessons From Nature. *Journal of Royal Society*, 370: 2381 – 2417.
- Borch E., Kant-Muemansb M.L. and Blixt Y. (1996). Bacterial Spoilage of Meat Products. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 103 – 120.
- Botta C. and Cocolin L. (2012). Microbial Dynamics and Biodiversity in Table Olive Fermentation: Culture – dependent and –independent Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 3: 245.
- Brightwell G., Boerema J., Mills J., Mowat E. and Pulford D. (2006). Identifying the Bacterial Community on the Surface of Intralox Belting in a Meat Boning Room by Culture-dependent and Culture-independent 16S rDNA Sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 109 (1-2): 47 – 53.
- Bunt C.R., Jones D.S. and Tucker I.G. (1993). The Effects of pH, Ionic – Strength and Organic – phase on the Bacterial Adhesion to Hydrocarbons (Bath) Test. *International Journal of Pharmaceutics*, 99: 93 – 98.
- Cetin O., Kahraman T. and Buyukunal S.K. (2006). Microbiological Evaluation of Food Contact Surfaces at Red Meat Processing Plants in Istanbul, Turkey. *Italian Journal of Animal Science*, 5: 277 – 283.
- Chang H.T., Rittmann B.E., Amar D., Heim R. Ehlinger O. and Lesty Y. (1991). Biofilm Detachment Mechanisms in Liquid – Fluidized bed. *Biotechnology and Bioengineering*, 38 (5): 499 – 506.
- Γεωργάκης Α.Σ., Βαρελτζής Π.Κ., Αμβροσιάδης Α.Ι. (2002). Τεχνολογία Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.
- Characklis W.G. (1973). Attached Microbial Growths – II. Frictional Resistance due to Microbial Slimes. *Water Research*, 7: 1249 – 1258.
- Chevallier I., Ammor S., Laguet A., Labayle S., Castanet V., Dufour E. and Talon R. (2006). Microbial Ecology of a Small-Scale Facility Producing Traditional Dry Sausage. *Food Control*, 17: 446 – 453.
- Chorianopoulos N.G., Tsoukleris D.S., Panagou E.Z., Falaras P. and Nychas G.J.E. (2011). Use of Titanium Dioxide Photocatalysts as Alternative Means for *Listeria monocytogenes* Biofilm Disinfection in Food Processing. *Food Microbiology*, 28: 164 – 170.

- Clarke C.C. (1828). *Readings in Natural Philosophy; or, a Popular Display of The Wonders of Nature; Exclusively Selected from the Transactions of the Royal Society of London, from its Foundation to the Present Time.* A. & R. Spottiswoode. London.
- Cocolin L., Manzano M., Cantoni C. and Comi G. (1998). Use of Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis to Directly Detect and Identify *Salmonella typhimurium* in Food. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 673 – 677.
- Codex Alimentarius (2009). Basic Text. 4th Edition. FAO / WHO.
- Codex Alimentarius (2010). Procedural Manual. 9th Edition. FAO / WHO.
- Costerton J.W., Geesey G.G. and Cheng K.J. (1978). How Bacteria Stick. *Scientific American*, 238: 86 – 95.
- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin – Scott H.M. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49: 711 – 745.
- Costerton J.W. and Stewart P.S. (2001). Battling Biofilms. *Scientific American*, 285 (1): 74 – 81.
- Cowan M.M, Warren T.M. and Fletcher M. (1991). Mixed Species Colonization of Solid Surfaces in Laboratory Biofilms. *Biofouling*, 3: 23 – 34.
- Cukon N., Fleck Z., Bratulic M., Kozacinski L. and Njari B. (2012). Diversity of Microflora in Meat and Meat Products. *MESO*, 15: 271 – 279.
- Cramer M.M. (2006). *Food Plant Sanitation – Design, Maintenance and Good Manufacturing Practices.* 2nd Edition, CRC Press.
- Davies D. (2003). Understanding Biofilm Resistance to Antibacterial Agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2: 114 – 122.
- Den Aantekker E.D., Boom R.M., Zwietering M.H. and van Schothorst M. (2003). Quantifying Recontamination Through Factory Environments. A review. *International Food Microbiology*, 80: 117 – 130.
- Donlan R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9): 881 – 890.
- Donlan R.M. and Costerton J.W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2): 167 – 193.

- Doyle M.P. and Erockson M.C. (2006). Emerging Microbiological Food Safety Issues Related to Meat. *Meat Science*, 74: 98 – 112.
- Dreeszen P.H. (2003). Biofilm: The Key to Understanding and Controlling Bacterial Growth in Automated Drinking Water Systems. 2nd Edition, *Edstrom Industries Inc.*, Waterford, WI, USA,
- EFSA (2015). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Foodborne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13 (1): 3991.
- Ercolini D, Russo F., Torrieri E., Masi P. and Villani F. (2006). Changes in the Spoilage – Related Microbiota of Beef During Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4663 – 4671.
- European Commission (2014). Food Safety – From Farm to Fork: Safe and Healthy Food for Everyone. *The European Union Explained*.
- Fernandes R. (2009). Chilled and Frozen Raw Meat, Poultry and their Products. In *Meat Products*, Leatherhead Publishing, Cambridge.
- Flemming H.C., Wingender J., Griegbe and Mayer C. (2000). Physico-chemical Properties of Biofilms. In: Evans L.V. editor. *Biofilms: Recent Advances in their Study and Control*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Garcia – Lopez M.L., Prieto M. and Otero A. (1998). The physiological attributes of Gram-negative Bacteria Associated with Spoilage of Meat and Meat Products. In *The Microbiology of Meat and Poultry*, Edited by Board R.G. and Davies A.R., London.
- Gavrill A. (2009). Μικροβιακή και Φυσικοχημική Αλλοίωση Κρέατος που Συντηρήθηκε σε Αερόβιες Συνθήκες και σε Τροποποιημένες Ατμόσφαιρες – M.Sc. Study. *Agricultural University of Athens*, Athens.
- Ghafir Y., China B., Dierick K., de Zutter L. and Daube G. (2007). A seven – year Survey of *Campylobacter* Contamination in Meat at Different Production Stages in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, 116: 111 – 120.
- Gill C.O. (1998). Microbiological Contamination of Meat During Slaughter and Butchering of Cattle, Sheep and Pigs. In *The Microbiology of Meat and Poultry* Edited by Davies A., Board R. London.

- Gomez D., Arino A., Carraminana J.J, Rota C. and Yanguela J. (2012). Sponge versus Mini-Roller for the Surface Microbiological Control of *Listeria monocytogenes*, Total Aerobic Mesophiles and *Enterobacteriaceae* in the Meat Industry. *Food Control*, 27: 242 – 247.
- Gounadaki A.S., Skandamis P.N., Drosinos E.H. and Nychas G.J.E. (2008). Microbial Ecology of Food Contact Surfaces and Products of Small-scale Facilities Producing Traditional Sausages. *Food Microbiology*, 25: 313 – 323.
- Gustavsson P. and Borch E. (1993). Contamination of Beef Carcasses by Psychrotrophic *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae* at Different Stages Along the Processing Line. *International Journal of Food Microbiology*, 20: 67 – 83.
- Henrici A.T. (1932). Studies of Freshwater Bacteria. I. A Direct Microscopic Technique. *Journal of Bacteriology*, 25: 277 – 287.
- Her N., Amy G. and Jarusutthirak C. (2000). Seasonal Variations of Nanofiltration (NF) Fouling: Identification and Control. *Desalination*, 132: 143 – 160.
- Herzberg M., Kang S. and Elimelech M. (2009). Role of Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Biofouling of Reverse Osmosis Membranes. *Environmental Science & Technology*, 43 (12): 4393 – 4398.
- Heukelekian H. and Heller A. (1940). Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth. *Journal of Bacteriology*, 40: 547 – 558.
- Holah J.T., Bird J. and Hall K.E. (2004). The Microbial Ecology of High-Risk, Chilled Food Factories; Evidence for Persistent *Listeria* spp. and *Escherichia coli* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 68 – 77.
- Hood S.K. and Zottola E.A. (1997). Adherence to Stainless Steel by Foodborne Microorganisms during Growth in Model Food Systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37: 145 – 153.
- Isberg R.R. and Barnes P. (2002). Dancing with the Host: Flow – dependent Bacterial Adhesion. *Cell*, 110 (1): 1 – 4.
- Jay J.M. (2000). *Modern Food Microbiology*. 6th Edition. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Jay J.M., Loessner M.J. and Golden D.A. (2005). *Modern Food Microbiology*. 7th Edition. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA.

- Jones H.C., Roth I.L., Saunders W.M. (1969). III. Electron Microscopic Study of a Slime Layer. *Journal of Bacteriology*, 99: 316 – 325.
- Kaferstein F.K. (2003). Actions to Reverse the Upward Curve of Foodborne Illness. *Food Control*, 14: 101 – 109.
- Karaberi V.K. (2010). Έλεγχος της Μικροβιολογικής Ποιότητας, Δείκτες Υγιεινής και Επιπολασμός τους Μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε Δείγματα Χοίρειου Κιμά – M.Sc. Study, *Agricultural University of Athens*, Athens.
- Katsikogianni M. and Missirlis Y.F. (2004). Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterials and of Techniques Used in estimating Bacteria – Material Interactions. *European Cells & Materials Journal*, 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.
- Kennedy J., Jackson V., Blair I.S., McDowell D.A., Cowan C. and Bolton D.J. (2005). Food Safety Knowledge of Consumers and the Microbiological and Temperature Status of their Refrigerator. *Journal of Food Protection*, 68: 1421 – 1430.
- Koo J.Y., Hong S.P., Kang J.W., Kim J.E., Hyung H., Kim Y.H., Yoon S. and Kim S.S. (2002). Fouling Resistant Reverse Osmosis Membranes. *American Water Works Association Membrane Technology Conference*, 223: 512 -522.
- Koutsoumanis K. and Sofos J.N. (2004). Microbiology of Carcasses and Cuts. In: Jensen W.K., Devine C. and Dikeman M. *Encyclopedia of Meat Sciences*, Oxford, Elsevier.
- Krevvata M. (2010). Study of Adhesion Mechanism of *Staphylococcus epidermidis* Strains on Human Endothelial Cells and Expression of Bioactive Extracellular Molecules (matrix) - Ph.D. Study. *University of Patras*, Patra.
- 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.

- Lambert A.D., Smith J.P. and Dodds K.L. (1991). Shelf Life Extension and Microbiological Safety of Fresh Meat: A Review. *Food Microbiology*, 8: 267 – 297.
- Lee E., Shon H.K. and Cho J. (2010). Biofouling Characteristics Using Flow Field – Flow Fractionation: Effect of Bacteria and Membrane Properties. *Bioresource Technology*, 101 (5): 1487 – 1493.
- Legg S.J., Khela N., Madie P., Fenwick S.G., Quynh V. and Hedderley D.I (1999). A Comparison of Bacterial Adherence to Bare Hands and Gloves Following Simulated Contamination from a Beef Carcass. *International Journal of Food Microbiology*, 53: 69 -74.
- Lens P., O’Flaherty V., Moran A.P., Stoodley P. and Mahony T. (2003). Biofilms in Medicine, Industry and Environmental Biotechnology. *IWA Publishing*, United Kingdom.
- Marriott N.G. and Gravani R.B. (2006). Principles of Food Sanitation. 5th Edition, *Springer*.
- McDonnell G. and Russell A.D. (2001). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (1): 227 – 228.
- Melabianaki Z., Velonakis E. and Vatopoulos A. (2007). Biofilms, Man, Environment. *Archives of Hellenic Medicine*, 24 (5): 411 – 431.
- Mettler E. and Carpentier B. (1998). Variations over Time of Microbial Load and Physicochemical Properties of Floor Materials After Cleaning in Food Industry Premises. *Journal of Food Protection*, 61 (1): 57 – 65.
- Morente E.O., Fernandez – Fuentes M.A., Burgos M.J.G., Abriouel H., Pulido R.P. and Galvez A. (2013). Biocide Tolerance in Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 162 (1): 13 – 25.
- Moretro T., Langsrud S. and Heir E. (2013). Bacteria on Meat Abattoir Process Surfaces after Sanitation: Characterization of Survival Properties of *Listeria monocytogenes* and the Commensal Bacterial Flora. *Advances in Microbiology*, 3: 255 – 264.
- Nychas G.J.E., Marshall D.L. and Sofos J.N. (2007). Meat Poultry and Seafood. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, Edited by M.P. Doyle, L.R. Beuchat, Washington D.C. ASM Press, 105 – 140.
- O’ Toole G., Kaplan H.B. and Kolter R. (2000). Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology*, 54: 49 – 79.

- Pang C.M., Hong P.Y., Guo H.L. and Liu W.T. (2005). Biofilm Formation Characteristics of Bacterial Isolates Retrieved from a Reverse Osmosis Membrane. *Environmental Science and Technology*, 39 (19): 7541 – 7550.
- Papadopoulou O.S. (2013). Assessment of Meat Spoilage with Novel Techniques – Ph.D. Study. *Agricultural University of Athens*, Athens.
- Pasmore M., Todd P., Smith S., Baker D., Silverstein J., Coons D. and Bowman C.N. (2001). Effects of Ultrafiltration Membrane Surface Properties on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Initiation for the Purpose of Reducing biofouling. *Journal of Membrane Science*, 194 (1): 15 – 32.
- Paul A.A., Southgate D.A.T. and Russell J. (1980). First Supplement to MC Canel and Widdowson. The Composition of Foods. *HMSO*, London.
- Potera C. (1999). Forging a Link between Biofilms and Disease. *Science*, 283: 1837 – 1839.
- Ridgway H., Ishida K., Rodriquez G., Safarik J., Knoell T. and Bold R. (1999). Biofouling of Membranes: Membrane Preparation, Characterization and analysis of Bacterial Adhesion. *Biofilms*, 310: 463 – 494.
- Romans J.R., Costello W.J., Carlson C.W., Greaser M.L. and Jones K.W. (2001). The Meat we Eat. 14th Edition, *Intertate Publishers*, Danville, Illinois.
- Sakaridis I. (2011). Βιοπροστασία του Ορνίθιου Κρέατος και των Προϊόντων του από Παθογόνους Μικροοργανισμούς – Ph.D. Study. *Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη*.
- Sauer K., Rickard A.H. and Davies A.G. (2007). Biofilms and Biocomplexity. *Microbe*, 2 (7): 347 – 353.
- Schlegelova J., Babak V., Holasova M., Konstantinova L., Necedova L., Sisak F., Vlkona H., Roubal P. and Jaglic Z. (2010). Microbial Contamination after Sanitation of Food Contact Surfaces in Dairy and Meat Processing Plants. *Czech Journal of Food Science*, 5: 450 – 461.
- Schoder D., Melzner D., Schmalwieser A., Zangana A. Winter P. and Wagner M. (2011). Important Vectors for *Listeria monocytogenes* Transmission at Farm Dairies Manufacturing Fresh Sheep and Goat Cheese from Raw Milk. *Journal of Food Protection*, 74 (6): 919 – 924.
- Sharma M. and Anand S.K. (2002). Biofilms Evaluation as an Essential Component of HACCP for Food / Dairy Processing Industry – A Case. *Food Control*, 13: 469 – 477.

- Staikou E.V. and Voyatzi A.I. (2011). Biofilms in Chronic and Recurrent Otolaryngologic Infections. *Journal of Hellenic Microbiological Society*, 56 (2): 75 – 88.
- Stamou A., Venizelou E.D., Stavropoulou M., Fotakopoulou N., Kapsimali V. and Vrioni G. (2014). Characteristics of Biofilms and their Formation in Biomedical Devices. *Journal of Hellenic Microbiological Society*, 59 (3): 7 – 21.
- Stoodley P., Lewandowski Z., Boyle J.D. and Lappin – Scott H.M. (1999). Structural Deformation of Bacterial Biofilms Caused by Short – term Fluctuations in Fluid Shear: An *in situ* Investigation of Biofilm Rheology. *Biotechnology and Bioengineering*, 65 (1): 83 – 92.
- Stoodley P., Sauer K., Davies D.G. and Costerton J.W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, 56: 187 – 209.
- Sutherland I.W. (2001). Biofilm Exopolysaccharides: A Strong and Sticky Framework. *Microbiology*, 147: 3 – 9.
- Tamine A.Y. (2008). *Cleaning in Place: Dairy, Food and Beverage Operations*. 3rd Edition, *Blackwell Publishing*.
- Vamvacopoulou S., Kolonitsiou F., Dimitracopoulos G and Anastassiou E.D. (2003). Microbial Biofilms. *Journal of Hellenic Microbiological Society*, 48: 328 – 339.
- Varnam A.H. and Sutherland J.P. (1999). Το Κρέας και τα Προϊόντα του. *Εκδόσεις ΙΩΝ και ΣΙΑ, Περιστερί, Αττική*.
- Varnam H.A. and Evans G.M. (2000). *The Nature of Microbial Communities*. *American Society of Microbiology Press*, 2000: 8 – 17.
- Viazis S., Akhtar M., Feirtag J. and Gonzalez F.D. (2011). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 Viability on Hard Surfaces by Treatment with a Bacteriophage Mixture. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 37 – 42.
- Vorst K.L., Todd E.C.D. and Ryser E.T. (2006). Transfer of *Listeria monocytogenes* During Mechanical Slicing of Turkey breast, Bologna and Salami. *Journal of Food Protection*, 69: 619 – 626.
- Wagner M. and McLauchlin J. (2008). *Handbook of Listeria monocytogenes*, CRC Press, USA.

- Watnick P. and Kotler R. (2000). Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology*, 182 (10): 2675 – 2679.
- Wilks S.A., Michels H.T. and 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.
- Wilson M. (2001). Bacterial Biofilms and Human Disease. *Science Progress*, 84 (3): 235 – 254.
- Zobell C.E. (1943). The Effect of Solid Surfaces on Bacterial Activity. *Journal of Bacteriology*, 46: 39 – 56.

Ιστοχώροι

[Anne Camper and Peg Dirckx \(1996\)](#). Montana State University, Center for Biofilm Engineering – Bozeman.

[ASM](#) – *Journal of Bacteriology*

[Brett Towler and Peg Dirckx \(2004\)](#). Montana State University, Center for Biofilm Engineering – Bozeman.

[EFET](#). Hellenic Food Authority

[European Union](#). EUR-Lex – Access to European Union Law

 [Κανονισμός 178/2002](#)

 [Κανονισμός 852/2004](#)

 [Κανονισμός 853/2004](#)

 [Κανονισμός 854/2004](#)

 [Κανονισμός 882/2004](#)

 [Κανονισμός 2073/2005](#)

 [Κανονισμός 1774/2002](#)

[ISO 22000:2005 \(en\)](#). Food Safety Management Systems — Requirements for any Organization in the Food Chain.

[National Institute of Allergy and Infectious Diseases - NIAID](#)

[Paul Stoodley and Peg Dirckx \(2003\)](#). Montana State University, Center for Biofilm Engineering – Bozeman.

[Peg Dirckx \(1997\)](#). Montana State University, Center for Biofilm Engineering – Bozeman.

[Phil Stewart and Peg Dirckx \(2001\)](#). Montana State University, Center for Biofilm Engineering – Bozeman.

[U.S. National Institutes of Health](#)

[U.S. Centers for Disease Control and Prevention](#)

[World Health Organization](#)