

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου**

**Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων**

**Π.Μ.Σ. Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του  
Ανθρώπου**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Εκτίμηση μέσω πολυφασματικής απεικόνισης της αλλοίωσης και  
αξιολόγηση της ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου *Listeria  
monocytogenes* σε προϊόντα κοτόπουλου»**

**ΟΥΡΑΝΙΑ Σ. ΡΑΦΤΟΠΟΥΛΟΥ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

**ΝΥΧΑΣ Ε. ΓΕΩΡΓΙΟΣ- ΙΩΑΝΝΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2019**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου**

**Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων**

**Π.Μ.Σ. Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του  
Ανθρώπου**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Εκτίμηση μέσω πολυφασματικής απεικόνισης της αλλοίωσης και  
αξιολόγηση της ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου *Listeria  
monocytogenes* σε προϊόντα κοτόπουλου»**

**ΟΥΡΑΝΙΑ Σ. ΡΑΦΤΟΠΟΥΛΟΥ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

**ΝΥΧΑΣ Ε. ΓΕΩΡΓΙΟΣ- ΙΩΑΝΝΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2019**



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Εκτίμηση μέσω πολυφασματικής απεικόνισης της αλλοίωσης και αξιολόγηση της ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε προϊόντα κοτόπουλου»**

**ΟΥΡΑΝΙΑ Σ. ΡΑΦΤΟΠΟΥΛΟΥ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Νυχάς Γεώργιος- Ιωάννης, Καθηγητής (επιβλέπων)**

**Πανάγου Ευστάθιος, Αν. Καθηγητής Παππάς**

**Χρήστος, Αν. Καθηγητής**

**ΑΘΗΝΑ 2019**

## Περίληψη

Η παρούσα μελέτη διακρίνεται σε δύο πειραματικές ενότητες, με κοινό σημείο αναφοράς την πρώτη ύλη των προϊόντων τροφίμων που εξετάστηκαν, το κρέας κοτόπουλου. Ο στόχος της πρώτης πειραματικής ενότητας ήταν η συσχέτιση μικροβιολογικών αποτελεσμάτων από πειράματα αλλοίωσης φιλέτου στήθους κοτόπουλου με τα δεδομένα που προέκυψαν από την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης. Με βάση τα δεδομένα αυτά, αναπτύχθηκαν μοντέλα εκμάθησης για την ποσοτική εκτίμηση της OMX και των ψευδομονάδων στο φιλέτο στήθους κοτόπουλου. Όσον αφορά τη δημιουργία των μοντέλων εκμάθησης, τα δεδομένα που αξιοποιήθηκαν ως δείγματα εκπαίδευσης ήταν μικροβιολογικά και πολυφασματικά δεδομένα για θερμοκρασίες συντήρησης 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 και 35 °C. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των μοντέλων εκτίμησης, ήταν η γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS- R). Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίστηκαν τα πολυφασματικά δεδομένα (n= 36) και ως εξαρτημένη ο πληθυσμός της OMX ή των ψευδομονάδων αντίστοιχα. Τα μοντέλο PLS- R εμφάνισε ικανοποιητική επίδοση για την OMX, καθώς για την επικύρωση η τιμή του RMSE ήταν ίση με 0.9013 και η τιμή r ήταν 0.8278 και καλή επίδοση για τις ψευδομονάδες, αφού για την επικύρωση η τιμή του RMSE ήταν ίση με 0.0287 και η τιμή r ήταν 0.9385. Επιπλέον, από τους συντελεστές B φάνηκε ότι τα μήκη κύματος που επηρέασαν περισσότερο την επίδοση και των δύο μοντέλων, ήταν αυτά που σχετίζονται με την μυογλοβίνη και τα παράγωγά της.

Ο στόχος της δεύτερης πειραματικής ενότητας ήταν η αξιολόγηση και ο χαρακτηρισμός της κινητικής συμπεριφοράς της ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes*, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας συντήρησης σε κοτομπουκιές. Οι κοτομπουκιές ενοφθαλμίστηκαν με μίγμα 6 στελεχών *L. monocytogenes* (10- 100 CFU/g) και συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 4, 8, 12, 16 °C και σε δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ (8h στους 4 °C, 8h στους 8 °C και 8h στους 12 °C). Σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα, προσδιορίστηκαν οι πληθυσμοί των OMX και *L. monocytogenes* και πρωτογενή μοντέλα Baranyi & Roberts προσαρμόστηκαν στα μικροβιολογικά δεδομένα που προήλθαν από την εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων ανάπτυξης των μικροβιακών πληθυσμών. Στη συνέχεια, η επίδραση της θερμοκρασίας στο μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης ( $\mu_{max}$ ) μοντελοποιήθηκε, χρησιμοποιώντας το μοντέλο της τετραγωνικής ρίζας και τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν, επικυρώθηκαν με ανεξάρτητα δεδομένα ανάπτυξης που προέκυψαν από τη συντήρηση ενοφθαλμισμένων δειγμάτων κοτομπουκιών υπό συνθήκες του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ. Από την κινητική συμπεριφορά του παθογόνου παρατηρήθηκε παραλλακτικότητα μέσα στο ίδιο το προϊόν καθώς και η επίδραση του πολύ μικρού αρχικού εμβολίου στη δυσκολία ανάπτυξης αποδοτικών μοντέλων. Όσον αφορά τη δευτερογενή μοντελοποίηση, οι εκτιμώμενες τιμές  $T_{min}$  για την OMX ήταν -11.81 °C και για το βακτήριο *L. monocytogenes* -5.80 °C. Από την επικύρωση των μοντέλων με δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις του ίδιου δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ, προέκυψε ότι το δυναμικό μοντέλο της πρώτης επανάληψης ήταν πιο αποδοτικό και άρα επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη αισθητής παραλλακτικότητας μέσα στο προϊόν των κοτομπουκιών.

Λέξεις- κλειδιά: Κοτόπουλο, φιλέτο στήθος κοτόπουλου, κοτομπουκιές, αλλοίωση, πολυφασματική απεικόνιση, μοντέλα, *Listeria monocytogenes*.

## Abstract

The present study is divided into two experimental modules, with a common reference point the raw material of the food products examined, the chicken meat. The objective of the first experimental module was to correlate microbiological results from chicken breast fillet spoilage experiments with the data obtained from the application of multi-spectral imaging. Based on these data, machine learning models were developed to quantify the TVC (total viable counts) and pseudomonas in the chicken breast fillet. With regard to the creation of machine learning models, the data used as training samples were microbiological and multi-spectral data for storage temperatures 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 °C. The algorithm used to construct estimation models was linear partial squares regression (PLS-R). The multi-spectral data (n = 36) were determined as independent variables and the population of TVC or pseudomonas were determined as dependent variables respectively were defined. The PLS-R model showed satisfactory performance for the TVC, since the RMSE value for cross validation was 0.9013 and the r value was 0.8278, while good performance was shown for the pseudomonas, since the RMSE value was 0.0287 and the r value was 0.9385. In addition, the B coefficients showed that the wavelengths which most affected the performance of both models were those associated with myoglobin and its derivatives.

The objective of the second experimental module was to evaluate and characterize the growth behavior of the foodborne pathogen *L. monocytogenes*, as a function of the storage temperature in chicken nuggets. Chicken nuggets were inoculated with a mixture of 6 strains of *L. monocytogenes* (10-100 CFU / g) and stored under aerobic conditions at 4, 8, 12, 16 ° C and at a dynamic temperature profile (8h at 4 ° C, 8h at 8 ° C and 8h at 12 oC). At appropriate time intervals, the TVC and *L. monocytogenes* populations were determined and the primary models of Baranyi & Roberts wre fitted to the derived microbiological data for the estimation of the pathogen's and TVC's kinetic growth parameters. The effect of temperature on maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) was then modeled for TVC and *L. monocytogenes* using the square-root-type model, and the developed models were validated using independent growth data generated during storage of inoculated chicken nuggets samples under the dynamic temperature conditions. Through the pathogen's kinetic behavior, it was observed variability within the product of chicken nuggets, as well as the effect of the low inoculum in making difficult the development of models with good performance. With regard to secondary modelling, the estimated values of Tmin were -11.81 °C for the TVC and -5.80 °C for *L. monocytogenes*. By performing validation of the models with two independent replicates of the same dynamic temperature profile, it emerged that the dynamic model of the first replicate was more efficient and thus the existence of variability within the product of chicken nuggets was confirmed.

Key words: chicken, chicken breast fillet, chicken nuggets, spoilage, multispectral imaging, modelling, *Listeria monocytogenes*.

## Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και σηματοδοτεί την ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Οφείλω ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη στον επιβλέποντα της διπλωματικής μου μελέτης, Καθηγητή κ. Νυχά Γεώργιο- Ιωάννη για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας, την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση καθόλη την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Πανάγου Ευστάθιο, για το ενδιαφέρον του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου και τη συνεισφορά του και την καθοδήγηση του κατά την επεξεργασία των δεδομένων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες πρέπει να δοθούν στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Παππά Χρήστο, του Εργαστηρίου Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων, για την τιμή που μου έκανε να συμμετέχει στην εξέταση της διπλωματικής μου μελέτης και για το χρόνο που αφιέρωσε για την μελέτη της εργασίας και τις συμβουλές του.

Στην εκπόνηση της εργασίας μου είχα τη δυνατότητα να βασιστώ στη Μεταδιδάκτορα Λιανού Αλεξία και την Υποψήφια Διδάκτορα Σπυρέλλη Ευγενία, τις οποίες και ευχαριστώ ιδιαίτερα για τις χρήσιμες και πλήρεις οδηγίες που μου έδωσαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, καθώς και για το χρόνο που αφιέρωσαν για να με βοηθήσουν σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω και όλη την ομάδα του Εργαστηρίου για τη συμπαράσταση και την αρμονική συνύπαρξη στον εργαστηριακό χώρο.

Περίληψη .....	3
Abstract .....	4
Ευχαριστίες .....	5
Γλωσσάριο Ορολογίας.....	8
1. Εισαγωγή .....	9
1.1. Σύσταση κρέατος κοτόπουλου .....	9
1.2. Κατανάλωση κοτόπουλου και ασφάλεια τροφίμων.....	10
1.3. Αλλοίωση κοτόπουλου κατά τη διάρκεια της συντήρησης .....	11
1.3.1. Φυσικοχημικές μεταβολές κατά τη συντήρηση του κρέατος πουλερικών.....	12
1.3.1.1. Μεταβολή του pH κατά τη νεκρική ακαμψία.....	12
1.3.1.2. Πρωτεόλυση.....	13
1.3.1.3. Παραγωγή βιογενών αμινών.....	13
1.3.1.4. Τάγγιση του λίπους- Οξειδωση και υδρόλυση λιπιδίων.....	14
1.3.1.5. Μεταβολές του χρώματος των πουλερικών.....	17
1.4. Τα κύρια βακτήρια στο κρέας κοτόπουλου .....	18
1.4.1. Βακτήρια που συμμετέχουν στην αλλοίωση του κοτόπουλου .....	18
1.4.2. Παθογόνα.....	20
1.5. Επίδραση εξωγενών παραγόντων στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών κατά την διαδικασία αλλοίωσης του κοτόπουλου.....	21
1.6. Σύγχρονες μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης στο κρέας.....	23
1.7. Πολυφασματική απεικόνιση .....	25
1.8. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	26
1.8.1. Γενικά .....	26
1.8.2. Φυλογενετική ταξινόμηση του γένους <i>Listeria</i> .....	26
1.8.3. Ορολογική τυποποίηση .....	27
1.8.4. Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού.....	29
1.8.4.1. Μορφολογία.....	29
1.8.4.2. Απαιτήσεις μικροβιακής ανάπτυξης .....	30
1.8.4.3. <i>Listeria monocytogenes</i> απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης (stress).....	32
1.8.4.4. Μεταβολικά χαρακτηριστικά.....	34
1.8.4.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά.....	35
1.8.4.6. Ανάπτυξη σε θρεπτικά υποστρώματα.....	36
1.8.5. Επιδημιολογικά στοιχεία .....	38
1.8.6. Παθογονικότητα- Είσοδος και διασπορά του παθογόνου στον ανθρώπινο οργανισμό .....	39
1.8.7. Χαρακτηριστικά νόσου στον άνθρωπο .....	41
1.8.8. Νομοθεσία .....	43
2. Σκοπός.....	44
3. Υλικά και Μέθοδοι .....	45

3.1. Πειραματική ενότητα 1: Εκτίμηση της μικροβιολογικής αλλοίωσης φιλέτου στήθους κοτόπουλου με τη μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης .....	45
3.1.1. Πειραματική διαδικασία .....	45
3.1.1.1. Μικροβιολογική ανάλυση.....	45
3.1.1.3. Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (MultiSpectral Imaging, MSI).....	46
3.1.2. Στατιστική ανάλυση- Ποσοτικός προσδιορισμός αλλοίωσης.....	49
3.2. Πειραματική ενότητα 2: Αξιολόγηση και χαρακτηρισμός της ανάπτυξης <i>L. monocytogenes</i> σε κοτομπουκιές .....	51
3.2.1. Σύνθεση κοτομπουκιών.....	52
3.2.2. Στελέχη <i>L. monocytogenes</i> .....	52
3.2.3. Καλλιέργεια στελεχών <i>L. monocytogenes</i> .....	52
3.2.4. Πειραματική Διαδικασία .....	53
3.2.4.1. Προετοιμασία δειγμάτων .....	53
3.2.4.2. Προετοιμασία εμβολίου.....	53
3.2.4.3. Εμβολιασμός των δειγμάτων .....	53
3.2.4.4. Συσκευασία των δειγμάτων .....	54
3.2.4.5. Μικροβιολογικές αναλύσεις .....	54
3.2.4.6. Μέτρηση pH .....	57
3.2.5. Ανάλυση δεδομένων.....	57
3.2.5.1. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων μικροβιακής ανάπτυξης .....	57
3.2.5.2. Προσδιορισμός της επίδρασης της θερμοκρασίας στον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης .....	57
3.2.5.3. Επικύρωση του μοντέλου ανάπτυξης του βακτηρίου <i>L. monocytogenes</i> .....	58
4. Αποτελέσματα.....	60
4.1. Αποτελέσματα από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης.....	60
4.2. Αποτελέσματα για το πείραμα ανάπτυξης <i>Listeria monocytogenes</i> σε κοτομπουκιές πανέ- προψημένες .....	64
4.2.1. Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων.....	64
4.2.2. Αποτελέσματα pH .....	68
4.2.3. Ανάλυση δεδομένων.....	70
4.2.3.1. Πρωτογενή μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης.....	70
4.2.3.2. Επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης.....	72
4.2.3.3. Επικύρωση του μοντέλου ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> ...	73
5. Συμπεράσματα .....	78
6. Βιβλιογραφία .....	80
6.1. Ξένη βιβλιογραφία .....	80
6.2. Ελληνική βιβλιογραφία.....	96
Παράρτημα.....	98



## Γλωσσάριο Ορολογίας

% RE: percent relative error, ποσοστό σχετικού σφάλματος

$A_f$ : Accuracy factor, συντελεστής ακρίβειας

B: B- Coefficient, συντελεστής  $\beta$

$B_f$ : Bias factor, συντελεστής μεροληψίας

BW: B- Coefficient, συντελεστής  $\beta$  ισοσταθμισμένος

$h_0$ : το έργο που απαιτείται για να προσαρμοστούν οι μικροοργανισμοί στο νέο περιβάλλον

LVs: Latent Variables, Λανθάνουσες συνιστώσες

R: Reflectance, ανάκλαση σε nm

r: correlation coefficient, συντελεστής συσχέτισης

$R^2$ : τετραγωνικός συντελεστής παλινδρόμησης

RMSE: Root Mean Square Error, ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος βαθμονόμησης

SD: Standard Deviation for samples

SNV: Standard Normal Variables

$T_{min}$ : ελάχιστη θεωρητική θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε  $^{\circ}C$

$y_{end}$ : τελικός πληθυσμός μικροοργανισμού σε log CFU/g

$y_0$ : αρχικός πληθυσμός μικροοργανισμού σε log CFU/g

$\Theta$ : θερμοκρασία σε  $^{\circ}C$

$\lambda$ : λανθάνουσα φάση προσαρμογής ( lag phase ) σε h

$\mu_{max}$ : μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης σε h<sup>-1</sup>

OMX: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Σύσταση κρέατος κοτόπουλου

Τα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης, όπως το κρέας κοτόπουλου, αποτελούν καλή πηγή θρεπτικών συστατικών (πρωτεΐνες, βιταμίνες, λιπαρά οξέα, μεταλλικά στοιχεία) (Πίνακες 1, 2), τα οποία βρίσκονται σε βιοδιαθέσιμη μορφή, με συνέπεια να διευκολύνουν την αφομοίωση από τον ανθρώπινο οργανισμό.

Πίνακας 1: Θρεπτική σύσταση σε στήθος κοτόπουλου χωρίς δέρμα και κόκαλα (USDA databases, 2018).

<b>Θρεπτικά</b>	<b>Μονάδες</b>	<b>Εκτίμηση στα 100 g</b>
Ενέργεια	kcal	98
Πρωτεΐνη	g	23.21
Συνολικά λιπίδια (λίπος)	g	0.89
Υδατάνθρακες	g	0.00
<b>Ιχνοστοιχεία</b>		
Σίδηρος Fe	mg	1.29
Νάτριο Na	mg	76
<b>Βιταμίνες</b>		
Βιταμίνη C, συνολικό ασκορβικό οξύ	mg	2.1
<b>Λιπίδια</b>		
Λιπαρά οξέα κορεσμένα	g	0.000
Λιπαρά οξέα trans	g	0.000
Χοληστερόλη	mg	67

Πίνακας 2: Περιεκτικότητα νωπού κρέατος κοτόπουλου σε αμινοξέα και λιπαρά οξέα (Ndob et al., 2015).

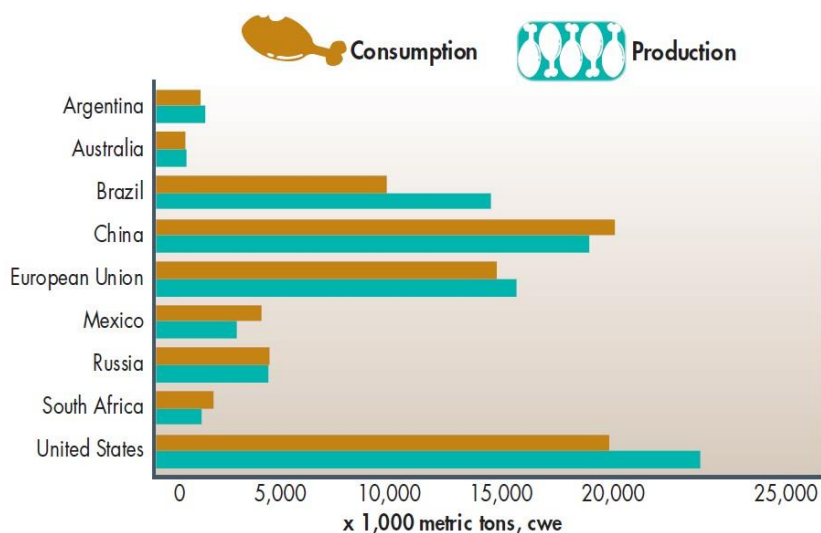
Αμινοξέα	Εκτίμηση σε g ανά 100g κοτόπουλου	Λιπαρά οξέα	Εκτίμηση σε g ανά 100g κοτόπουλου
Αλανίνη	1.266	Μυριστικό οξύ	0.01
Αργινίνη	1.399	Παλμιτικό οξύ	0.280
Ασπαρτικό οξύ	2.068	Στεατικό οξύ	0.130
Γλουταμικό οξύ	3.474	Παλμιτολεϊκό οξύ	0.040
Κυστεΐνη	0.297	Ολεϊκό οξύ	0.340
Γλυκίνη	1.140	Λινολεϊκό οξύ (LA)	0,220
Ιστιδίνη	0.720	α- Λινολεϊκό οξύ (ALA)	0.010
Ισολευκίνη	1.225	Γαδολεϊκό οξύ	0.010
Λευκίνη	1.741	Αραχιδονικό οξύ (AA)	0.060
Λυσίνη	1.971	Εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA)	0.010
Μεθειονίνη	0.642	Εικοσιπενταενοϊκό οξύ (DPA)	0.010
Φαινυλαλανίνη	0.921	Εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA)	0.020
Προλίνη	0.954		
Σερίνη	0.798		
Θρεονίνη	0.980		
Τρυπτοφάνη	0.271		
Τυροσίνη	0.783		
Βαλίνη	1.151		

## 1.2. Κατανάλωση κοτόπουλου και ασφάλεια τροφίμων

Το κρέας κοτόπουλου φαίνεται να είναι ένα από τα είδη κρέατος με τη μεγαλύτερη κατανάλωση για τις τελευταίες δεκαετίες και ειδικότερα για το 2018 (Guide WATT Executive, 2018) (Εικόνα 1). Εξαιτίας της αυξημένης ζήτησης και κατανάλωσης τροφίμων, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) και η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) εξέδωσαν κατευθυντήριες γραμμές για παραγωγούς, διανομείς και εργαζόμενους σε χώρους εστίασης, με στόχο την προστασία των καταναλωτών από τροφιμογενείς επιδημίες (Nychas et al., 2016). Μέσω των κανόνων υγιεινής HACCP στα τρόφιμα (EC 852/2004) και στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης ειδικότερα (EC 853/2004), οι συμμετέχοντες στον τομέα των τροφίμων απαιτείται να συμμορφώνονται με συγκεκριμένες απαιτήσεις, προκειμένου να εξαλειφθούν πιθανοί φυσικοί, βιολογικοί και χημικοί κίνδυνοι (EC 852/2004). Επιπρόσθετα, τα μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα παρατίθενται στον κανονισμό EC 2073/2005, όπου συγκεκριμένα για το κρέας

κοτόπουλου ορίζονται μικροβιολογικά κριτήρια μόνο για το βακτήριο *Salmonella enterica*. και συγκεκριμένα απαιτείται απουσία αυτού σε 25 g.

Η επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου συντήρησης στην ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, κατά τη συντήρηση και διανομή των ζωικών τροφίμων, έχει διερευνηθεί εκτενώς (EFSA BIOHAZ Panel, 2014a), ενώ η ανάπτυξη αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε νωπό κρέας κοτόπουλου για διαφορετικούς συνδυασμούς θερμοκρασίας/χρόνου έχει επίσης αξιολογηθεί (EFSA, 2016), ώστε να ελαχιστοποιηθεί η άσκοπη απόρριψη κρέατος και το κόστος που επιφέρει στις βιομηχανίες κρέατος και παρασκευασμάτων (Nychas et al., 2008, 2016). Τέλος, η EFSA έχει επίσης παράσχει επιστημονική γνωμοδότηση σχετικά με τους κινδύνους για τη δημόσια υγεία που πρέπει να καλύπτονται από την επιθεώρηση του κρέατος πουλερικών (EFSA, 2016).



Εικόνα 1: Εκτιμήσεις παραγωγής και κατανάλωσης κρέατος κοτόπουλου για το 2018 (Guide WATT Executive, 2018).

### 1.3. Αλλοίωση κοτόπουλου κατά τη διάρκεια της συντήρησης

Η ποιότητα του κοτόπουλου, μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου με αποτέλεσμα την υποβάθμισή του. Οι μεταβολές που υφίσταται το κοτόπουλο κατά την επεξεργασία και αποθήκευσή του είναι βιοχημικές, χημικές, φυσικές και μικροβιολογικές μεταβολές και συνδυαστικά επηρεάζουν την ποιότητα και ασφάλεια του συγκεκριμένου προϊόντος.

Μετά τη σφαγή, το κρέας κοτόπουλου θα πρέπει να ψυχθεί ώστε να μειωθεί και να διατηρηθεί η θερμοκρασία του κρέατος κάτω από 4 °C για να εξασφαλιστεί η υψηλή ποιότητα και η ασφάλεια του προϊόντος. Έχει παρατηρηθεί ότι το στήθος αποτελεί το δυσκολότερα ψυχόμενο τμήμα σε ένα σφάγιο κοτόπουλου. Η ψύξη των σφάγιων λαμβάνει χώρα με στόχο την παραγωγή ασφαλούς προϊόντος μέσω της μείωσης της θερμοκρασίας του κρέατος σε ένα σημείο όπου ο ρυθμός ανάπτυξης των αλλοιογόνων μικροοργανισμών να είναι χαμηλός και να παρεμποδίζεται η ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Η ψύξη επιδρά επίσης στους βασικούς δείκτες ποιότητας της γεύσης, του αρώματος, της εμφάνισης και της υφής του κρέατος (James et al., 2006).



χοιρινό κρέας ξεπερνά τις 4 ημέρες, ενώ για τα υπόλοιπα είδη κρέατος είναι μεγαλύτερος της μίας εβδομάδας.

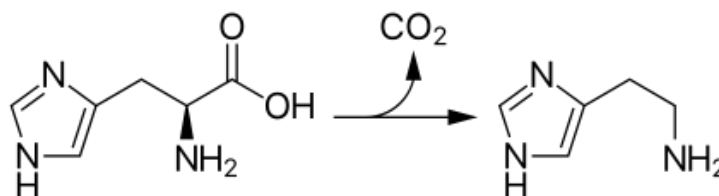
### 1.3.1.2. Πρωτεόλυση

Η πρωτεόλυση είναι μια διαδικασία που καταλύεται από μικροοργανισμούς που παράγουν πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεάσες), όπως είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*. Παρόλα αυτά, η παραγωγή πρωτεασών μπορεί να γίνει μόνο από ορισμένους μικροοργανισμούς και μόνο υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου. Για παράδειγμα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια, παρότι διαθέτουν μηχανισμούς καταβολισμού πρωτεϊνών, έχουν ασθενή πρωτεολυτική δράση.

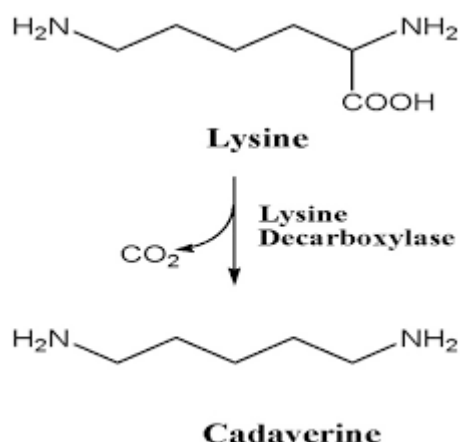
Σε προχωρημένα στάδια αλλοίωσης, γίνεται αποδόμηση των πρωτεϊνών από πρωτεάσες και πεπτιδάσες και παράγονται πεπτίδια και α-αμινοξέα, ως μία πρόσθετη πηγή ενέργειας. Επιπλέον, τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* παρουσία  $O_2$  έχουν την ικανότητα καταβολισμού της κρεατίνης και κρεατινίνης, οι οποίες σε συνδυασμό με τα αμινοξέα, αποτελούν το υπόστρωμα για την ανάπτυξη δύσοσμων μεταβολιτών, όπως αμμωνία, θειούχες ενώσεις, αιθυλεστέρες, κετόνες και βιογενείς αμίνες. Επιπρόσθετα, πολλά πεπτίδια προσδίδουν έντονη πικρή ή γλυκιά γεύση, επιφέροντας τη μεταβολή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των προϊόντων κρέατος (Enfors, 2008).

### 1.3.1.3. Παραγωγή βιογενών αμινών

Όσον αφορά στις βιογενείς αμίνες, πρόκειται για οργανικές βασικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που προκύπτουν μετά από αποκαρβοξυλίωση των ελεύθερων αμινοξέων των τροφίμων λόγω ενζυματικής επίδρασης βακτηρίων της μικροχλωρίδας αυτών. Το είδος και η ποσότητα των βιογενών αμινών εξαρτώνται από τα βακτηριακά είδη, τον πληθυσμό τους και τη θερμοκρασία συντήρησης του τροφίμου (Silva & Gloria, 2002). Οι κυριότερες βιογενείς αμίνες που ανευρίσκονται σε προϊόντα πουλερικών είναι η πουτρεσκίνη, η καδαβερίνη, η τυραμίνη και η ισταμίνη και προσδίδουν πολύ δυσάρεστη οσμή (Silva & Gloria, 2002). Η ισταμίνη παράγεται από ορισμένα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae (*Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Edwardsiella* spp.) και από ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια (*Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. divergens*, *L. carnis*, *L. curvatus* και *L. hilgardii*) (Shalaby et al., 1996), ενώ η τυραμίνη παράγεται από βακτήρια του γένους *Streptococcus*, του είδους *Enterococcus faecalis*, κολοβακτηριοειδή και οξυγαλακτικά βακτήρια (κυρίως *L. divergens* και *L. carnis*). Από την άλλη, η καδαβερίνη παράγεται από βακτηριακά στελέχη της οικογένειας των Enterobacteriaceae και η πουτρεσκίνη είναι η κύρια βιογενής αμίνη που παράγεται από βακτήρια του γένους *Pseudomonas*. Η καδαβερίνη, η πουτρεσκίνη και η ισταμίνη αποτελούν προϊόντα αποκαρβοξυλίωσης της λυσίνης (Εικόνα 2), της ορνιθίνης και της ιστιδίνης (Εικόνα 3), αντίστοιχα.



Εικόνα 2: Παραγωγή ισταμίνης (Voet D. & Voet J.G., 2005).



Εικόνα 3: Παραγωγή καδαβερίνης (Méndez et al., 2018).

Η καδαβερίνη και η πουτρεσκίνη δεν αποτελούν κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή και περιορίζονται κυρίως στην υποβάθμιση της οργανοληπτικής ποιότητας του τροφίμου (Enfors, 2008). Αντίθετα, η ισταμίνη και η τυραμίνη έχουν τοξική δράση και μπορούν να προκαλέσουν διαστολή των περιφερειακών αγγείων, υπόταση και κεφαλαλγία στους καταναλωτές (Silva & Gloria, 2002).

#### 1.3.1.4. Τάγγιση του λίπους- Οξείδωση και υδρόλυση λιπιδίων

Η τάγγιση του λίπους έχει ως προϊόντα ενώσεις που προκαλούν δυσάρεστη οσμή, γεύση, υφή, καταστροφή της συνεκτικότητας του μυϊκού ιστού και την υποβάθμιση της εμφάνισης και της διατροφικής αξίας του κρέατος (Fellenberg & Speisky, 2006).

Η τάγγιση του λίπους προκύπτει μέσω ενός συνόλου πολλών διαφορετικών αντιδράσεων (Enfors, 2008):

Υδρόλυση λιπιδίων:

Αυτοϋδρόλυση

Λιπόλυση

Ενζυματική (με προϊόν ελεύθερα λιπαρά οξέα)

Μικροβιολογική (με προϊόν ελεύθερα λιπαρά οξέα)

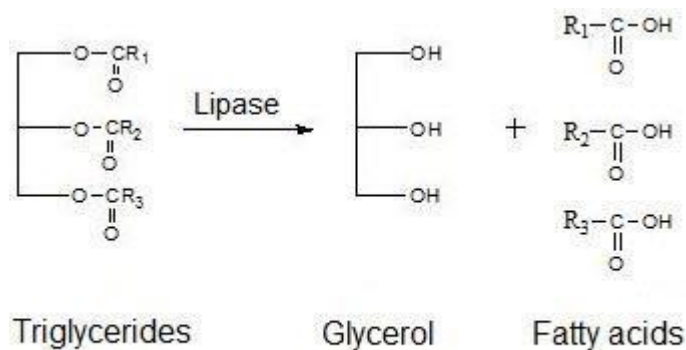
Οξειδωτική τάγγιση:

Αυτοοξείδωση

Καταλυόμενη από λιποξειδάσες (με προϊόντα αλδεΐδες, κετόνες και κυρίως μεθυλ-κετόνες)

β-οξείδωση (με προϊόντα αλδεΐδες, κετόνες και κυρίως μεθυλ-κετόνες)

Υδρόλυση των φωσφολιπιδίων ή σε μικρότερο βαθμό των τριγλυκεριδίων μπορεί να προκαλέσει την τάγγιση και συνεπώς την αλλοίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων (Εικόνα 4).



#### Υδρόλυση των τριγλυκεριδίων

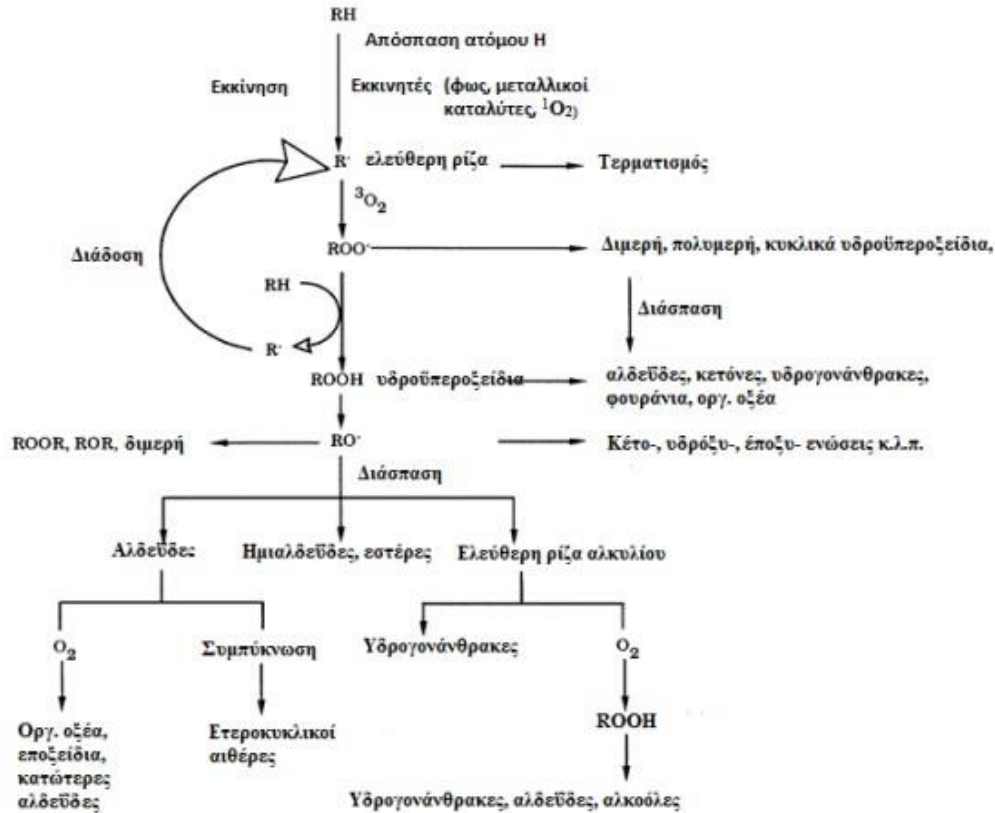
Εικόνα 4: Παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων από την υδρόλυση τριγλυκεριδίων (Diaz et al., 2014).

Η παραγωγή των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) προκαλούν οργανοληπτικές μεταβολές που εξαρτώνται από το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας των οξέων και την ποσότητά τους. Η υδρόλυση των λιπιδίων είναι μία βραδεία διαδικασία, ωστόσο μπορεί να πραγματοποιηθεί με πολύ γρήγορο ρυθμό παρουσία λιπολυτικών ενζύμων (π.χ. παγκρεατική λιπάση) ή λιπολυτικών ενζύμων που παράγονται από τους μικροοργανισμούς αλλοίωσης (*Pseudomonas fragi*, *P. fluorescens*, *Micrococcus* spp., *Serratia marcesans*, *Arthrobacter* spp.) (Pawar et al., 2011).

Η οξειδωτική τάγχιση των λιπαρών οξέων (oxidative rancidification) προϋποθέτει την παρουσία ατμοσφαιρικού  $O_2$ . Η αυτοξειδωση καταλύεται από μεταλλικά ιόντα που δρουν ως προ-οξειδωτικά, και από το φως. Συγκεκριμένα, το μοριακό οξυγόνο αντιδρά με ιχνοστοιχεία μεταλλικών ιόντων  $Fe^{+2}$  και  $Cu^{+2}$  προς την δημιουργία ελευθέρων ριζών.

Κατά την διαδικασία της αυτοξειδωσης (Εικόνα 5), ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίων ( $ROO^*$ ) αντιδρούν γρήγορα με άλλα ελεύθερα λιπαρά οξέα (RH) παράγοντας ασταθείς ενώσεις, τα υδροϋπεροξειδία ( $R-OOH$ ) που αποτελούν τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης. Η παραγωγή των υδροϋπεροξειδίων μπορεί μεταβάλλει το χρώμα του κρέατος του κοτόπουλου προκαλώντας πρασίνισμα, καστανές ή γκριζές αποχρώσεις (Pawar et al., 2011). Έπειτα, γίνεται διάσπαση των  $R-OOH$  σε αλδεϋδες, κετόνες, υδρογονάνθρακες ή φουράνια (δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης) δίνοντας ταγή γεύση στο κρέας και δυσάρεστη οσμή (Cortinas et al., 2005). Κατά το τελευταίο στάδιο σχηματίζονται πολυμερή επηρεάζοντας το χρώμα, την υφή και την γεύση του προϊόντος καθώς και την ασφάλειά του, αφού σχηματίζονται τοξικά προϊόντα (Βουδούρης & Κοντομηνάς, 2002).



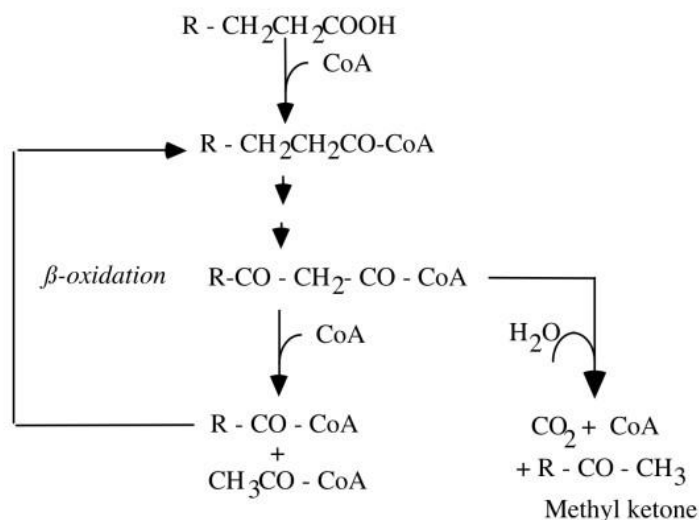


Εικόνα 5: Διαδικασία της αυτοξειδωσης των λιπαρών οξέων (Γιατράκου, 2010).

Κατά την διατροφή των πουλερικών, συχνά γίνεται εμπλουτισμός των σιτηρεσιών με έλαια (π.χ. ιχθυέλαια) που είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), και ιδιαίτερα στα ευπαθή στην οξειδωτική τάγγιση ω-3 λιπαρά οξέα. Αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου μπορεί να γίνει με την προσθήκη αντιοξειδωτικών στην δίαιτα των πουλερικών (Fellenberg & Spreisky, 2006).

Η αιμοσφαιρίνη κατέχει καθοριστικό ρόλο στην εκκίνηση της αυτοξειδωσης των λιπιδίων στο κρέας πουλερικών, καθώς ο αιμικός σίδηρος έχει καταλυτική επίδραση στην οξειδωτική αποδόμηση των PUFA. Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης στο κρέας κοτόπουλου είναι σημαντική (0.24 mg/g στο στήθος και 0.67 mg/g στο μπούτι), οπότε κατά τη σφαγή ξεκινούν βιοχημικές αντιδράσεις που καταλύουν τη συμμετοχή της αιμοσφαιρίνης στη οξειδωτική τάγγιση (Fellenberg & Spreisky, 2006). Τα φωσφολιπίδια είναι γενικά πιο επιρρεπή σε φαινόμενα αυτοξειδωσης σε σχέση με άλλες κατηγορίες λιπιδίων, λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητάς τους σε ω-6 λινελαϊκό οξύ.

Η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και στη δεδομένη περίπτωση του αραχιδονικού οξέος (υπεύθυνο για την χαρακτηριστική γεύση των πουλερικών) είναι ουσιαστικά η μεταβολική πορεία της αποδόμησης του που οδηγεί στην παραγωγή ενός acetyl-CoA και ενός νέου λιπαρού οξέος με δύο άνθρακες λιγότερους στην ανθρακική του αλυσίδα από την αρχική του μορφή (Εικόνα 6). Στο τελευταίο στάδιο της β-οξείδωσης του αραχιδονικού οξέος, γίνεται παραγωγή υπεροξυ-εικοσιτετρανοϊκού (μεθυλ-κετόνη) που προσδίδει χαρακτηριστική οσμή και γεύση τάγγισης, οδηγώντας έτσι σε υποβάθμιση της οργανοληπτικής ποιότητας του κρέατος (Pawar et al., 2011).



Εικόνα 6: Β- οξειδωση των λιπαρών οξέων (Enfors, 2008).

Οι λιποξυγενάσες αποτελούν ένζυμα στο μυϊκό ιστό του κρέατος, τα οποία όμως μπορούν να παραχθούν και από ορισμένους μύκητες. Τα συγκεκριμένα ένζυμα οξειδώνουν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα λινελαϊκό, λινολενικό και αραχιδονικό οξύ σε υδροπεροξειδία, τα οποία με την σειρά τους διασπώνται σε αλδεϋδες και κετόνες με δυσάρεστη οσμή και γεύση.

### 1.3.1.5. Μεταβολές του χρώματος των πουλερικών

Το φυσιολογικό χρώμα του μυϊκού ιστού των κοτόπουλων μετά την σφαγή, ποικίλει από λευκό-ροζ έως σκούρο κόκκινο, ενώ το αντίστοιχο του δέρματος είναι λευκό-κρεμ ή κίτρινο. Το χρώμα αυτό μπορεί να επηρεαστεί από παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, η φυλή, η διατροφή, η λιποπεριεκτικότητα, και ο τρόπος σφαγής-επεξεργασίας (Enfors, 2008). Το χρώμα του κρέατος ευθύνεται στη χρωστική μυοσφαιρίνη (Mb), η οποία είναι σύνθετη πρωτεΐνη του μυός, παρόμοια ως προς τη λειτουργικότητα με την αιμοσφαιρίνη, με τη διαφορά ότι η Mb αποτελεί το ¼ στερεοχημικά της αιμοσφαιρίνης. Η Mb έχει πορφυρό ερυθρό-ιώδες χρώμα (purple-red) και σε αυτή οφείλεται το επιθυμητό χρώμα του κρέατος μετά την σφαγή του ζώου. Οι μεταβολές στο χρώμα που παρατηρούνται κατά την διάρκεια της συντήρησης του κρέατος οφείλονται: α) στην πρόσληψη μοριακού οξυγόνου από την Mb (οξυγονώση) με αποτέλεσμα την μετατροπή της σε οξυμυοσφαιρίνη (MbO<sub>2</sub>), η οποία έχει φωτεινό κόκκινο χρώμα, β) στην περαιτέρω οξείδωση της MbO<sub>2</sub> σε μεταμυοσφαιρίνη (αύξηση του σθένους του αιμικού σιδήρου από Fe<sup>+2</sup> σε Fe<sup>+3</sup>), η οποία έχει καστανέρυθρο χρώμα. Όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου στο περιβάλλον του κρέατος είναι υψηλή (φρέσκο κρέας) τότε η Mb οξυγονώνεται προς την MbO<sub>2</sub> που έχει ελκυστικό χρώμα, αλλά η συνεχής κατανάλωση του οξυγόνου από την μικροβιακή χλωρίδα οδηγεί σε μείωση της σχετικής πίεσης και σε διείσδυση του οξυγόνου στο εσωτερικό του μυϊκού ιστού, ευνοώντας το σχηματισμό της καφέ μεταμυοσφαιρίνης.

## 1.4. Τα κύρια βακτήρια στο κρέας κοτόπουλου

Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) αντιπροσωπεύει ποικίλα βακτηριακά είδη, που αυξάνονται κατά την αποθήκευση, και ποικίλουν σημαντικά μεταξύ των δειγμάτων. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί προηγουμένως ότι η OMX σε πόδια κοτόπουλου των οποίων η δειγματοληψία έγινε μετά από αποθήκευση στους 4°C στα 2/3 της διάρκειας ζωής τους, κυμαινόταν από 3 έως 8 log CFU/g (Rouger et al., 2017).

Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* που συχνά ανευρίσκονται σε κρέας κοτόπουλου, αντιπροσωπεύονται κυρίως από τα είδη *P. fragi*, *P. lundensis* και *P. fluorescens* (Arnaut-Rollier et al., 1999a; Arnaut-Rollier et al., 1999b). Αναφορικά με βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae, τα κύρια γένη είναι *Hafnia* (*Hafnia alvei*, *H. paralvei*), *Serratia* (*Serratia fonticola*, *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *S. proteamaculans* και *S. quinivorans*), *Rahnella*, *Yersinia* και *Buttiauxella* (Säde et al., 2013). Είδη των γενών *Enterococcus* και *Lactobacillus*, όπως *Enterococcus viikkiensis*, *E. saigonensis* και *Lactobacillus oligofermentans*, έχουν επίσης εντοπιστεί σε προϊόντα κρέατος κοτόπουλου (Koort et al., 2005; Rahkila et al., 2011; Harada et al., 2016). Το βακτηριακό είδος *Brochothrix thermosphacta* έχει επίσης καταγραφεί σε κρέας κοτόπουλου. Μεταξύ των ποικίλων καταγραφών που βρίσκονται στη βιβλιογραφία, κάποιες στοχεύουν πιο συγκεκριμένα σε βακτήρια αλλοίωσης, ενώ άλλες επικεντρώνονται σε παθογόνα.

### 1.4.1. Βακτήρια που συμμετέχουν στην αλλοίωση του κοτόπουλου

Η ανάπτυξη βακτηρίων αλλοίωσης οδηγεί σε υποβάθμιση της ποιότητας του κρέατος κοτόπουλου και συγκεκριμένα σε ανεπιθύμητη γεύση, χρώμα, οσμή, υφή ή όψη (Πίνακας 3). Υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί αλλοίωσης και μπορούν να προκύψουν από την παραγωγή ποικίλων μεταβολιτών όπως πτητικών ουσιών ή εξωπολυσακχαριτών (Πίνακας 4). Αφότου τα βακτηρια αποικίσουν το κρέας και συστήσουν μια αρχική μικροχλωρίδα, οι συνθήκες αποθήκευσης και οι διάφορες εφαρμοζόμενες επεξεργασίες επηρεάζουν την ανάπτυξη αυτής της μικροχλωρίδας. Η θερμοκρασία της αποθήκευσης όπως και η φύση και η συγκέντρωση των αερίων που χρησιμοποιούνται στα μίγματα αερίων για συσκευασία είναι επιλεκτικά για κάποιους βακτηριακούς πληθυσμούς. Η αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία ευνοεί την ανάπτυξη ψυχρότροφων και ψυχρόφιλων βακτηρίων, ενώ το CO<sub>2</sub> έχει ανασταλτική επίδραση στα βακτήρια *Pseudomonas* spp. Κάποια είδη μπορούν να επιβιώσουν κατά την επεξεργασία όπως η *Shewanella putrefaciens*, που βρίσκεται συχνά σε σφάγια κατά τη διαδικασία σφαγής αλλά ακόμα και μετά από 14 ημέρες αερόβιας αποθήκευσης (Hinton et al., 2004). Κατά την αποθήκευση, το βακτηριακό φορτίο αυξάνεται αλλά η μικροβιακή ποικιλότητα μειώνεται σε σχέση με τα αρχικά δεδομένα (Chaillou et al., 2015; Höll et al., 2016). Η μικροβιακή αλλοίωση προκύπτει ως συνέπεια της ανάπτυξης και της μεταβολικής δραστηριότητας των βακτηρίων αλλοίωσης. Στις περισσότερες μελέτες, τα βακτήρια που κυριαρχούν στα αλλοιωμένα τρόφιμα έχουν θεωρηθεί ως για την αλλοίωση, και σε κάποιες μελέτες το κριτήριο της μικροβιολογικής αποδοχής (η OMX πλησιάζει τους 7 log CFU/g) έχει χρησιμοποιηθεί για να καθορίσει την αλλοίωση (Höll et al., 2016; Zhang et al., 2012).

Το βακτήριο *B. thermosphacta*, τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae και εκείνα του γένους *Pseudomonas* θεωρούνται δυνητικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί του κρέατος κοτόπουλου. Η παραλλακτικότητα στους μικροβιολογικούς επιμολυντές που βρίσκονται σε αλλοιωμένο κρέας κοτόπουλου απεικονίζει τη δυσκολία του να αναγνωριστούν σαφώς τα βακτήρια αλλοίωσης. Συνεπώς, ο καθορισμός των

αλλοιογόνων βακτηρίων του κρέατος πουλερικών πρέπει να γίνει προσεχτικά. Τα βακτήρια *B. thermosphacta*, *P. fluorescens* και *S. putrefaciens* είναι μεταξύ των αλλοιογόνων βακτηριακών ειδών που βρίσκονται πιο συχνά σε αλλοιωμένα προϊόντα κοτόπουλου (Russell, 2008; Hinton et al., 2004; Zhang et al., 2012). Η δυνητική αλλοίωση από *Aeromonas salmonicida*, *P. fluorescens*, *P. fragi* και *S. liquefaciens* έχει επίσης εκτιμηθεί από δοκιμές πρόκλησης (challenge tests) και εκτίμηση με αισθητήρες (sensory evaluation) (Wang et al., 2017). Τα βακτηριακά είδη *Aeromonas hydrophila* και *A. sobria* έχουν καταγραφεί ως ψυχρότροφα βακτήρια που θα μπορούσαν να προκαλέσουν αλλοίωση καθώς και να είναι δυνητικά παθογόνα για τους ανθρώπους (Hinton et al., 2004). Μοριακή ταυτοποίηση αποικιών που απομονώθηκαν από μαριναρισμένο αλλοιωμένο κρέας κοτόπουλου έδειξε την ανάμειξη διαφόρων ειδών LAB και συγκεκριμένα των *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* και *Lactobacillus oligofermentans* (Nieminen et al., 2012 a, b; Koort et al., 2005; Björkroth et al., 2005). Περαιτέρω έρευνα βασισμένη σε αναλύσεις με αισθητήρες και μοριακές αναλύσεις ή χαρακτηρισμός της μεταβολικής δραστηριότητας αυτών των ειδών LAB επιβεβαίωσαν το ρόλο τους στην αλλοίωση (Andreevskaya et al., 2015; Jääskeläinen et al., 2013; Jääskeläinen et al., 2015). Έχει επίσης εφαρμοστεί MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectroscopy) σε αποικίες που απομονώθηκαν από στήθος κοτόπουλου συντηρημένο κάτω από δύο διαφορετικές τροποποιημένες ατμόσφαιρες (MAPs) και σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, ώστε να αναγνωριστούν τα αλλοιογόνα βακτήρια (Höll et al., 2016). Τα βακτήρια *B. thermosphacta*, *H. alvei* και βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Carnobacterium*, *Janthinobacterium*, *Pseudomonas* και *Serratia* ταυτοποιήθηκαν ανάμεσα στους κυρίαρχους επιμολυντές. Παρόλα αυτά, σε αυτή τη μελέτη, αλλοίωση θεωρήθηκε ότι συμβαίνει όταν η OMX έφτανε 7 log CFU/g, χωρίς όμως να υπάρχει ένδειξη για αλλοίωση με ανάλυση με αισθητήρες (Höll et al., 2016).

Πίνακας 3: Οργανοληπτικές μεταβολές που σχετίζονται με την δράση των μικροοργανισμών αλλοίωσης (Nychas et al., 2008).

<b>Οργανοληπτική μεταβολή</b>	<b>Βακτηριακό γένος/είδος</b>
Μεταβολή της υφής/σηματισμός γλοιώδους επικάλυψης (slime)	<i>Pseudomonas</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Weissella</i> , <i>Brochothrix</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , πράσινο χρώμα (greening)	<i>Weissella</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
H <sub>2</sub> S, πράσινο χρώμα (greening)	<i>Shewanella</i>
Οσμή σουλφιδίων	<i>Clostridium</i> , <i>Hafnia alvei</i>

Πίνακας 4: Προϊόντα μεταβολισμού των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων σε προϊόντα κρέατος (Nychas et al., 2008).

ΟΜΑΔΑ ΕΝΩΣΕΩΝ	ΕΝΩΣΕΙΣ
Θειούχες ενώσεις	σουλφίδια, διμεθυλοσουλφίδια, διμεθυλοδισουλφίδια, τριμεθυλοδισουλφίδια, μεθυλομερκαπτάνη, υδρόθειο, διμεθυλοτρισουλφίδια
Εστέρες	μεθυλεστέρες, αιθυλεστέρες
Κετόνες	ακετόνη, 2-βουτανόνη, ακετοΐνη, διακετύλιο
Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες	δισουλφ-βενζόλιο, τριμεθυλ-βενζόλιο
Αλειφατικοί Υδρογονάνθρακες	εξάνιο, 2,4-διμεθυλ-εξάνιο
Αλδεΐδες	2-μεθυλ-βουτανάλη
Αλκοόλες	μεθανόλη, αιθανόλη, 2-μεθυλ-προπανόλη, 2-μεθυλ-βουτανόλη, 3-μεθυλ-βουτανόλη
Βιογενείς αμίνες-άλλες ενώσεις	καδαβερίνη, πούτρεσκίνη, αμμωνία, μεθυλαμίνη

#### 1.4.2. Παθογόνα

Πολλές μελέτες έχουν διερευνήσει την επικράτηση ποικίλων παθογόνων σε κρέας κοτόπουλου. Μεταξύ αυτών, τα βακτήρια των γενών *Campylobacter* και *Salmonella* αποτελούν τη μεγάλη πλειοψηφία των καταγραφών. Αυτά τα δύο ανθρώπινα παθογόνα μπορούν να απαντηθούν σε υψηλούς πληθυσμούς στο γαστρεντερικό σωλήνα των πουλερικών, αλλά μετά από τη μόλυνση του κρέατος, είναι σημαντικό να ανιχνεύεται η παρουσία τους ακόμα και σε πολύ χαμηλό επίπεδο. Συνεπώς, κάποιες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην καθιέρωση συσχετίσεων μεταξύ της εμφάνισης στα ζώα και το κρέας (Hue et al., 2011). Η εμφάνιση της αντιμικροβιακής αντοχής ανάμεσα στα τροφιμογενή παθογόνα είναι επίσης εκτενώς καταγεγραμμένη (Harshem & Parveen., 2016). Επιπρόσθετα, το αντίκτυπο της εκτροφής στην παρουσία και αντιμικροβιακή αντοχή στο *Campylobacter* έχει καθοριστεί (Economou et al., 2015). Μέθοδοι για ταχεία και ακριβή ανίχνευση και ταυτοποίηση του *Campylobacter* έχει προταθεί (Fontanot et al., 2014). Παρόλα αυτά, δεδομένα που έχουν αποκτηθεί από διαφορετικές μεθόδους θα πρέπει να μεταφράζονται προσεχτικά. Για παράδειγμα, η αναλογία σε κοπάδια πουλερικών προσδιορίστηκε με μοριακές αναλύσεις και με επίστρωση σε διάφορα επιλεκτικά για το *Campylobacter* θρεπτικά υποστρώματα δίνοντας πολύ διαφορετικά αποτελέσματα (Oakley et al., 2012). Τόσο το βακτηριακό είδος *Campylobacter jejuni* όσο και το *Campylobacter coli* μπορούν να απομονωθούν από κρέας πουλερικών (Hue et al., 2011), αλλά ακόμα και από κλινικές περιπτώσεις ανθρώπων που μπορεί να προκλήθηκαν από κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου (Wassenaar & Newell, 2006). Συχνά δεν είναι δυνατή η αναγνώριση σαφούς συσχέτισης μεταξύ της παρουσίας του γένους *Campylobacter* σε κρέας πουλερικών και στο επίπεδο της βακτηριακής μόλυνσης σε τεμάχια κοτόπουλου (Fontanot et al., 2014). Το βακτηριακό είδος *Salmonella enterica* είναι μεταξύ των πιο μελετημένων ανθρώπινων παθογόνων, με τον ορότυπο Enteritidis να είναι ο κύριος συνδεδεμένος ορότυπος με κρούσματα σε κρέας πουλερικών (Jackson et al., 2013). Άλλα

τροφιμογενή παθογόνα για τον άνθρωπο που είναι παρόντα σε ποικίλα προϊόντα κρέατος έχουν επίσης διερευνηθεί, όπως το βακτήριο *Listeria monocytogenes* (Capita et al., 2001; Gudbjörnsdóttir et al., 2004; Van Nierop et al., 2005; Cohen et al., 2007; Alonso-Hernando et al., 2012). Η παρουσία του βακτηρίου *Listeria* spp. σε κρέας πουλερικών είναι αξιοσημείωτη, με το είδος *Listeria innocua* να είναι το κυρίαρχο είδος και να ακολουθείται από το είδος *L. monocytogenes* και διάφορα άλλα είδη *Listeria* (*L. welshimeri*, *L. grayi* και *L. ivanovii*). Η παρουσία του είδους *Staphylococcus aureus* σε προϊόντα κρέατος πουλερικών έχει επίσης αναφερθεί, όμως η περισσότερη βιβλιογραφία έχει επικεντρωθεί στην αντοχή στα αντιβιοτικά και στην τυποποίηση των απομονώσεων (Waters et al., 2011; Akbar & Anal, 2013; Krupa et al., 2014). Παρότι υπάρχουν μερικές καταγραφές για την ανίχνευση του βακτηρίου *Clostridium perfringens* σε κρέας πουλερικών (Cohen et al., 2007), η περισσότερη βιβλιογραφία επικεντρώνεται στην εκτίμηση και δημιουργία μοντέλων της ανάπτυξης του στο κρέας μετά από εκβλάστηση σπορίων που ακολουθεί της διαδικασίας της σφαγής (Juneja et al., 2013; Mohr et al., 2015; Huang, 2016). Τέλος, η εμφάνιση του γένους *Aeromonas* σε προϊόντα κρέατος πουλερικών ως μολυσματικός παράγοντας για τον άνθρωπο έχει επίσης καταγραφεί (Praveen et al., 2016). Μεταξύ των ειδών *Aeromonas* που έχουν ανιχνευθεί σε σφάγια πουλερικών, τα είδη *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida-masoucida* και *A. schuberti* έχει καταγραφεί ότι επιβιώνουν ακόμα και μετά από 14 ημέρες συντήρησης του προϊόντος (Hinton et al., 2004).

### **1.5. Επίδραση εξωγενών παραγόντων στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών κατά την διαδικασία αλλοίωσης του κοτόπουλου**

Οι παράγοντες που σχετίζονται με το περιβάλλον στο οποίο το τρόφιμο συντηρείται αναφέρονται ως εξωγενείς παράγοντες και περιλαμβάνουν (Hamad, 2012):

Τη θερμοκρασία αποθήκευσης

Τη σύσταση των αερίων και τη σχετική υγρασία στην ατμόσφαιρα που περιβάλλει το τρόφιμο.

Δεδομένου ότι στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εξετάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης στην ανάπτυξη των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών του στήθους κοτόπουλου, παρακάτω παρατίθενται περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη συγκεκριμένη περιβαλλοντική παράμετρο.

Η θερμοκρασία συντήρησης διδραματίζει τον πιο καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στο κρέας και στα τρόφιμα γενικότερα. Με στόχο την ελαχιστοποίηση των πιθανοτήτων επιμόλυνσης από μικροοργανισμούς καθώς και της περαιτέρω αύξησης των παθογόνων μικροοργανισμών, απαιτείται η τήρηση των κανόνων ορθής υγιεινής, όπως ορίζονται από τους 852/2004 και 853/2004 και ο διεξοδικός έλεγχος της θερμοκρασίας του ιστού και του χώρου συντήρησης σε όλα τα στάδια επεξεργασίας του νωπού κρέατος (Nychas et al., 2008).

Έχει αποδειχθεί ότι η φάση προσαρμογής (lag phase) των μικροοργανισμών σε συνθήκες ψύξης κρέατος (-1 έως 5 °C), παρατείνεται σε σημαντικό βαθμό σε σχέση με αυτή που καταγράφεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες, καθώς και ότι οι συνθήκες αυτές ευνοούν κυρίως τους ψυχρότροφους και ψυχρόφιλους μικροοργανισμούς (Gill & Newton, 1978). Ειδικότερα, όταν το κρέας πουλερικών συντηρείται αερόβια και από συνθήκες ψύξης, οι οργανισμοί που κυριαρχούν στην αλλοίωση είναι βακτήρια του γένους *Pseudomonas* που συνοδεύονται από

χαμηλότερους αριθμητικά πληθυσμούς Gram (-) βακτηρίων (Πίνακας 5). Χρησιμοποιώντας την αριθμητική ταξινόμηση, οι Arnaut-Rollier et al. (1999), εντόπισαν τέσσερις κύριες ομάδες ψευδομονάδων: τους *P. fragi*, *P. lundensis*, *P. fluorescens* βιότυπους και ένα μη αναγνωρισμένο είδος που ομοιάζει στο *P. fluorescens*. Άλλα βακτήρια που μερικές φορές είναι παρόντα είναι το βακτηριακό είδος *Shewanella putrefaciens* και ψυχρότροφα στελέχη της οικογένειας Enterobacteriaceae. Οι παραπάνω οργανισμοί απαντώνται συχνά στο έδαφος και στο νερό, και θεωρείται ότι προέρχονται από το περιβάλλον που ζουν τα πουλερικά. Ζύμες επίσης μπορεί να εμπλέκονται στην αλλοίωση και μπορεί να είναι πιο σημαντικές ως προς την αλλοίωση από ότι θεωρούνταν αρχικά (Mead, 2004).

Πίνακας 5: Τα κυρίαρχα γένη μικροοργανισμών που συνδέονται με την αλλοίωση του συντηρημένου υπό ψύξη κρέατος κοτόπουλου σε αερόβιες συνθήκες (Mead, 2004).

<b>Βακτήρια</b>	<b>Ζύμες</b>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Candida</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Yarrowia</i>
<i>Moraxella</i>	Άλλες ζύμες
<i>Psychrobacter</i>	

Πέρα των συμβατικών μικροβιολογικών ερευνών, γίνεται και εφαρμογή της ποσοτικής μικροβιολογίας με στόχο την ερμηνεία της επίδρασης της θερμοκρασίας στην αλλοίωση του κρέατος, κατά την συντήρηση και την διανομή του (McMeekin, 2007). Πραγματοποιούνται έρευνες σχετικά με το αντίκτυπο της θερμοκρασίας, ισοθερμοκρασιακά ή και δυναμικά, στην ανάπτυξη των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε πολλά είδη κρέατος, με βάση διάφορα δευτερογενή μοντέλα (Zwietering et al., 1992; Ross & Dalgaard, 2003; Koutsoumanis & Taoukis, 2005). Η καθοριστικής σημασίας επιρροή της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των ειδών *Pseudomonas* επιβεβαιώθηκε από την δημιουργία μοντέλου, που μελετούσε την επίδραση πολλών ενδογενών παραγόντων (pH, ενεργότητα νερού, περιεκτικότητα σε συστατικά) και της θερμοκρασίας για την αλλοίωση κρέατος κοτόπουλου (Bruckner, 2010; Bruckner et al., 2012, 2013). Μοντέλο έχει κατασκευαστεί και για την πρόβλεψη της ανάπτυξης στελεχών *P. fragi* και *P. fluorescens* συναρτήσει της θερμοκρασίας, του pH και της ενεργότητας νερού σε διάφορα είδη κρέατος (Lebert et al., 1998). Ακόμη, έχει γίνει συσχέτιση μεταξύ της θερμοκρασίας και του χρόνου ημι-ζώης σε κοτόπουλο, μέσω ενός μοντέλου κατά Ratkowsky, όπου προσδιορίζεται ο πληθυσμός των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* και μελών της οικογένειας Enterobacteriaceae (Rooni & Mead, 1984).

Καταλήγοντας, είναι εμφανής η ανάγκη τήρησης χαμηλών θερμοκρασιών κατά μήκος όλης της εφοδιαστικής αλυσίδας: κατά την πρώτη ψύξη του κρέατος στο σφαγείο πριν την αφαίρεση του δέρματος, κατά τον καθαρισμό και τεμαχισμό του, την αποθήκευση, τη διανομή, τη συντήρηση στα σημεία πώλησης και τέλος κατά την συντήρηση στο ψυγείο του καταναλωτή (Nychas et al., 2008). Σε ένα τέτοιο πλαίσιο, και προκειμένου να προσδιοριστεί ο βέλτιστος συνδυασμός θερμοκρασίας ψύξης και χρόνου συντήρησης για την αποφυγή της σύντομης μικροβιακής αλλοίωσης του κρέατος, η επιστημονική επιτροπή της EFSA κατασκεύασε μοντέλα πρόβλεψης της ανάπτυξης βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* σε κρέας κοτόπουλου (EFSA, 2016).

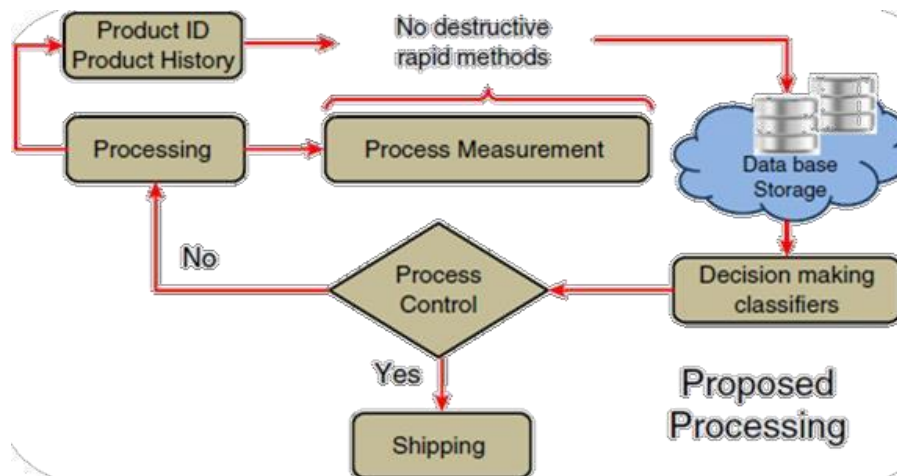
## 1.6. Σύγχρονες μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης στο κρέας

Λόγω της ταχείας αλλοίωσης του κρέατος κοτόπουλου και της άσκοπης σπατάλης του, αναδύεται η ανάγκη εύρεσης ταχείων, μη επεμβατικών και οικονομικών σύγχρονων μεθόδων προσδιορισμού της μικροβιολογικής του ποιότητας.

Μέχρι στιγμής, το σύστημα διαχείρισης ασφάλειας τροφίμων βασίζεται κυρίως στην επιθεώρηση και τον έλεγχο μέσω δειγματοληψιών των πρώτων υλών και των τελικών προϊόντων με χημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις (συμβατικές ή μοριακές) (Nychas et al., 2016). Αυτές οι αναλύσεις παρουσιάζουν ορισμένα σημαντικά μειονεκτήματα, αφού είναι χρονοβόρες και κοστοβόρες διαδικασίες που απαιτούν εξειδικευμένο και έμπειρο προσωπικό και δεν είναι δυνατή η χρήση τους πάνω στην γραμμή παραγωγής, καθώς καταστρέφουν το προϊόν στο οποίο γίνεται η ανάλυση (Papadopoulou et al., 2011). Επιπλέον, στην περίπτωση μεθόδων όπως είναι οι μοριακές τεχνικές, τα αποτελέσματα μπορεί να είναι παραπλανητικά, εφόσον εστιάζουν στην ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών και όχι τόσο σε μικροβιακές ομάδες που συμβάλλουν στην αλλοίωση που εξαρτάται από τη συντήρηση και τις συνθήκες εντός της συσκευασίας (Doulgeraki et al., 2012; Ropodi et al., 2016).

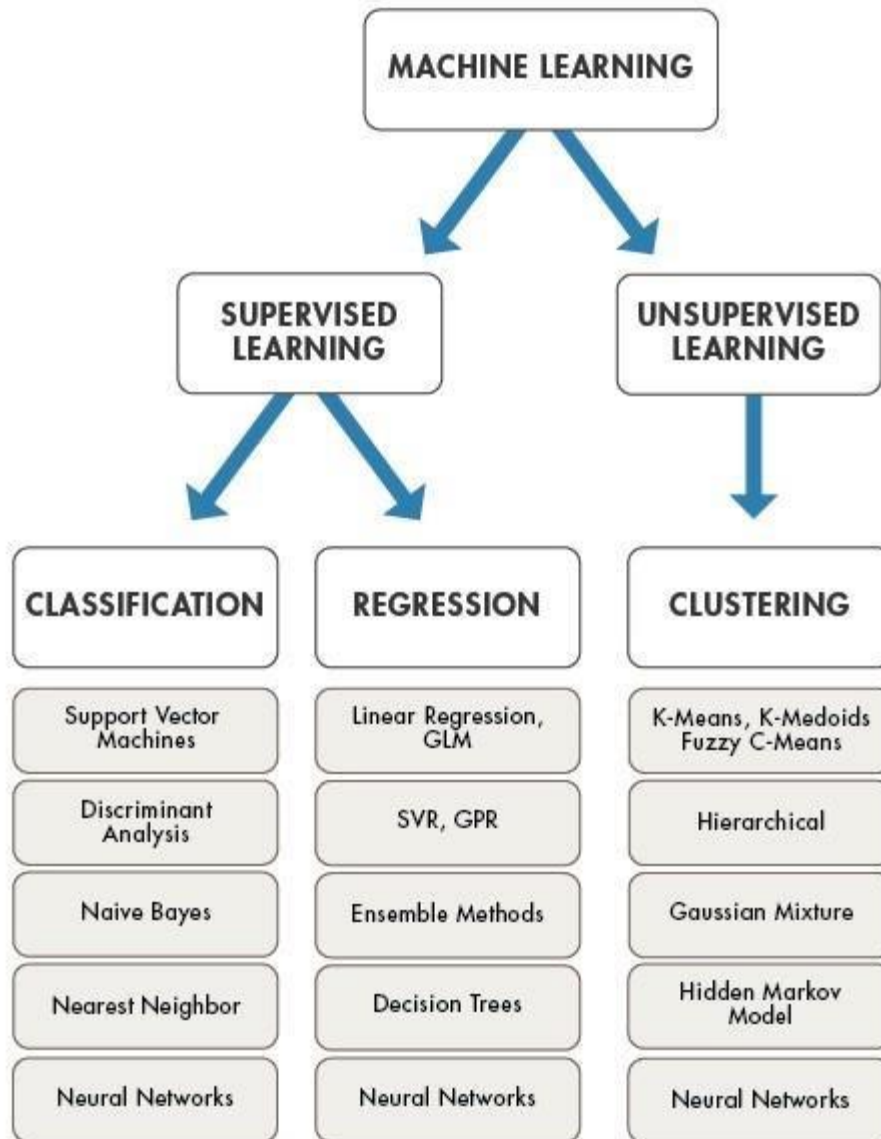
Γενικότερα, ένα σύγχρονο σύστημα διασφάλισης της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων δε θα πρέπει να βασίζεται μόνο σε αναλύσεις του τελικού προϊόντος. Αντ' αυτού, θα πρέπει να στηρίζεται στην πρόληψη, μέσω της παρακολούθησης, της καταγραφής και του ελέγχου των κρίσιμων παραμέτρων από την παραγωγή έως και την κατανάλωση του τροφίμου. Με αυτό το όραμα, γίνονται προσπάθειες για τη δημιουργία ενός δικτύου διεργασιών αναλυτικής τεχνολογίας (Process Analytical Technology, PAT) (Εικόνα 7), το οποίο μέσω αλγορίθμων, μοντέλων και βάσεων δεδομένων (χημικών, βιοχημικών, μικροβιολογικών) για τα αντίστοιχα τρόφιμα, θα έχει την ικανότητα: (i) να ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μέσω ταχείας αναγνώρισης και ελέγχου των δυνητικών πηγών κινδύνου, (ii) να μειώνει το χρόνο αποδέσμευσης του προϊόντος προς την αγορά, και (iii) να αυξάνει τα κέρδη των παραγωγών στην αγορά μέσω της αύξησης της ικανοποίησης των πωλητών και διανομέων και της καθησύχασης των καταναλωτών για την ασφάλεια και ποιότητα των προϊόντων που πρόκειται να αγοράσουν (Nychas et al., 2016). Μέχρι στιγμής, η εφαρμογή του PAT στις βιομηχανίες τροφίμων, περιορίζεται στην αξιοποίηση μη επεμβατικών μεθόδων φασματοσκοπίας (Ropodi et al., 2016), όπως είναι η φασματοσκοπία δονήσεων (NIR-φθορισμού, Raman, FTIR) (Ellis et al., 2004; Ammor et al., 2009; Papadopoulou et al., 2011; Argyri et al., 2014), η υπερφασματική και η πολυφασματική απεικόνιση (Tsakanikas et al., 2016; Feng et al., 2018) και βιομμημητικοί αισθητήρες οσμής και γεύσης (Ropodi et al., 2016).





Εικόνα 7: Διάγραμμα αποφάσεων για το δίκτυο PAT (Nychas et al., 2016).

Με βάση τις συνδυαστικές βιβλιοθήκες δεδομένων, οι οποίες προκύπτουν από τις αναλύσεις στα τρόφιμα που αναφέρθηκαν παραπάνω, κατασκευάζονται αλγόριθμοι μηχανικής εκμάθησης (Gromski et al., 2015), που καθοδηγούν τον αισθητήρα ή το όργανο στο να αποφασίσει αν μία παρτίδα τροφίμου είναι η αποδεκτή βάσει των απαιτήσεων της νομοθεσίας ή και του αγοραστή (Ropodi et al., 2016). Πολλές κατηγορίες αλγορίθμων μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην επεξεργασία των δεδομένων (Εικόνα 8) και η επιλογή του κατάλληλου γίνεται ανάλογα με τον αριθμό των δεδομένων, την τάση τους και την περιττή πληροφορία που αυτά μπορεί να περιέχουν (MathWorks, 2019). Παρόλα αυτά, ο μόνος τρόπος επιλογής κατάλληλου αλγόριθμου είναι η συνεχής δοκιμή και η απόρριψη όσων δε λειτουργούν. Αξίζει να αναφερθεί ότι ήδη υπάρχουν στην βιβλιογραφία μελέτες με αλγορίθμους για την αλλοίωση κρέατος, που έχουν προκύψει από δεδομένα φασματοσκοπίας (Papadopoulou et al., 2011; Barbin et al., 2013; Panagou et al., 2014; Tsakanikas et al., 2015; Estelles- Lopez et al., 2017). Ως εκ τούτου, μελλοντικός στόχος είναι η χρήση ικανοποιητικά επικυρωμένων μοντέλων στο δίκτυο PAT για την εξασφάλιση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου του κρέατος κοτόπουλου και των προϊόντων του.



Εικόνα 8: Μοντέλα μηχανικής εκμάθησης (MathWorks, 2019).

## 1.7. Πολυφασματική απεικόνιση

Η πολυφασματική απεικόνιση (multispectral imaging, MSI) είναι μία τεχνική που συνδυάζει τη συμβατική απεικόνιση με τη φασματοσκοπία, με στόχο την ταυτόχρονη απόκτηση χωρικής και φασματικής πληροφορίας (Gowen et al., 2015). Πρόκειται για ένα συνδυασμό της φασματοσκοπίας του ορατού, της φασματοσκοπίας δονήσεων και της υπολογιστικής όρασης (computer vision) (Ropodi et al., 2016). Μέσω της φασματοσκοπίας του ορατού, η ενέργεια της δέσμης φωτός που απορροφάται από την επιφάνεια του τροφίμου προκαλεί μεταπτώσεις των ηλεκτρονίων στα ενεργειακά επίπεδα του ατόμου (Σπυρέλλη, 2018). Από την άλλη, η φασματοσκοπία δονήσεων προσδιορίζει την ενέργεια που απορροφάται από τα δονούμενα-περιστρεφόμενα μόρια, κατά την εφαρμογή μίας δέσμης φωτός πάνω στο δείγμα (Dufour, 2009). Η υπολογιστική όραση (computer vision) επιστρατεύεται για να αποκτηθεί χωρική πληροφορία

και ουσιαστικά λειτουργεί στο φάσμα του ορατού φωτός (350-800 nm) προσδιορίζοντας χαρακτηριστικά όπως το σχήμα, το χρώμα, η υφή και το μέγεθος του δείγματος τροφίμου (Ropodi et al., 2016). Το εύρος του φάσματος που χρησιμοποιείται συνήθως για τα τρόφιμα είναι τα 400-1000 nm (ElMasry et al., 2012), αφού οι δεσμοί των ενώσεων στα τρόφιμα είναι κυρίως δεσμοί άνθρακα (οργανικές ενώσεις), πεπτιδικοί (πρωτεΐνες, αμινοξέα) και υδρογόνου (νερό, λίπος, υδατάνθρακες) (Dufour, 2009). Η MSI είναι μία μη επεμβατική, ταχεία και εύκολη στην εφαρμογή μέθοδος, εφόσον δεν απαιτεί προεργασία του δείγματος, οπότε και καθίσταται κατάλληλη για παρακολούθηση της γραμμής παραγωγής μίας μονάδας επεξεργασίας κρεάτων (Nychas et al., 2016).

## **1.8. *Listeria monocytogenes***

### **1.8.1. Γενικά**

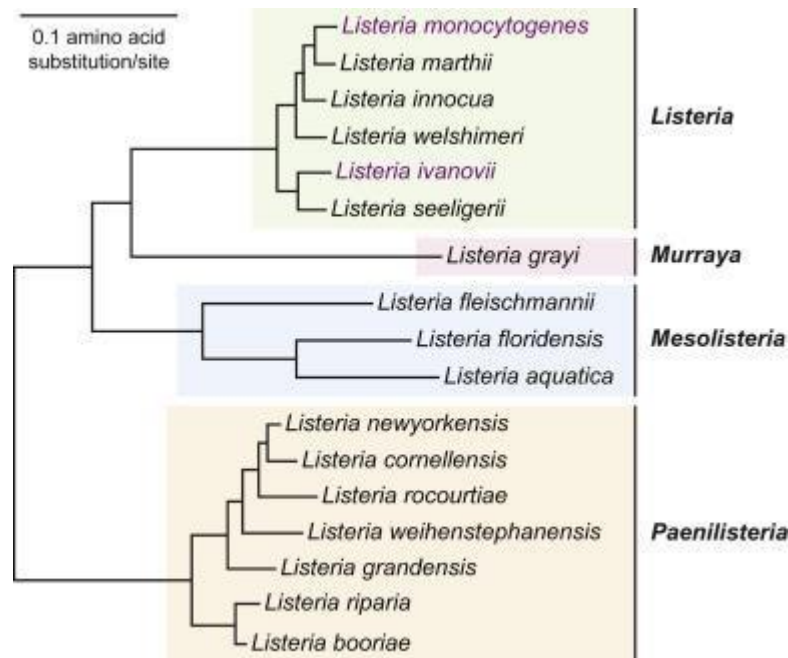
Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* αναγνωρίστηκε πρώτη φορά ως επικίνδυνος για τον άνθρωπο λοιμογόνος παράγοντας, μόλις το 1966 από τους Gray & Killinger (Farber & Peterkin, 1991). Έκτοτε η *L. monocytogenes* έχει ταυτοποιηθεί ως η αιτία πολλών περιπτώσεων τροφιμογενών λοιμώξεων, σε παγκόσμια κλίμακα, με αποτέλεσμα να αποτελεί έναν από τους πλέον σημαντικούς και περισσότερο μελετημένους παθογόνους μικροοργανισμούς, που σχετίζονται με τη Μικροβιολογία Τροφίμων και ενδιαφέρουν άμεσα το χώρο της βιομηχανίας (Farber & Peterkin, 1991).

Η περιγραφή του παθογόνου μικροοργανισμού έγινε αρχικά από τους Murray et al. (1926), οι οποίοι τον ονόμασαν *Bacterium monocytogenes*, λόγω του χαρακτηριστικού του να προκαλεί μονοκυττάρωση (Hof, 2003). Το 1927 ο μικροοργανισμός ονομάστηκε από τον Pirie *Listerella hepatolytica*, για να καταλήξει στο σημερινό του όνομα το 1940 από τον ίδιο επιστήμονα. Απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά, από νοσούντα άνθρωπο, το 1929 από τον Nyfeldt (Farber and Peterkin, 1991; Hof, 2003). Η επιστημονική κοινότητα άρχισε να στρέφει το ενδιαφέρον στο μικροοργανισμό αυτό τη δεκαετία του 1980, αφού συνδέθηκε με τροφιμογενείς λοιμώξεις και διαπιστώθηκε η ικανότητά μετάδοσής του στον άνθρωπο και τα ζώα μέσω των τροφίμων (McLauchlin et al., 2004).

Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου σε παγκόσμιο επίπεδο αυξήθηκε σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες, ενώ παρατηρείται αύξηση του αριθμού των καταγεγραμμένων περιστατικών στις ΗΠΑ και την Ευρώπη (EFSA, 2018). Η παρατηρούμενη αύξηση της συχνότητας της νόσου θα μπορούσε εν μέρει να αιτιολογηθεί από την αυξημένη επαγρύπνηση απέναντι στη νόσο καθώς και από τη βελτιστοποίηση των μεθόδων διάγνωσης και απομόνωσης. Ταυτόχρονα, αυξήθηκαν πληθυσμιακά οι ευαίσθητες ομάδες στη νόσο. Επιπρόσθετα τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί ραγδαία πρόοδος στην πρωτογενή παραγωγή τροφίμων, με την ανάπτυξη και εφαρμογή ηπιότερων μεθόδων κατεργασίας, την εισαγωγή νέων τεχνολογιών και τη μακροχρόνια συντήρηση υπό θερμοκρασίες ψύξης. Επιπλέον, έχουν αλλάξει οι διατροφικές συνήθειες των ανθρώπων και έχει καλλιεργηθεί η ανάγκη για έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα, τα οποία έχουν παρασκευαστεί με ελάχιστη ή καθόλου επεξεργασία, ενώ διατηρούν τα φυσικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους (Roccourt & Cossart, 1997; Lianou & Sofos, 2007).

### **1.8.2. Φυλογενετική ταξινόμηση του γένους *Listeria***

Το γένος *Listeria* έχει πλέον ταξινομηθεί μαζί με το γένος *Brochothrix* στην οικογένεια Listeriaceae. Και τα δύο γένη ανήκουν στην τάξη Bacillales της ομοταξίας Bacilli, η οποία περιλαμβάνει όλους τους βακίλους, και η οποία με τη σειρά της εντάσσεται στο φύλο Firmicutes του βασιλείου Bacteria (Garrity et al., 2004). Αρχικά το γένος περιλάμβανε μόνο το είδος *L. monocytogenes*. Έπειτα όμως από αριθμητικές ταξινομικές έρευνες διαπιστώθηκε ότι το βακτήριο *L. monocytogenes* δεν αποτελούσε μια αυτοτελή ταξινομική βαθμίδα (taxon), όπως ορίστηκε στην όγδοη έκδοση του Εγχειριδίου Προσδιοριστικής Βακτηριολογίας του Bergey (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*) (Rocourt & Buchrieser, 2007). Το γένος *Listeria* μέχρι στιγμής περιέχει 17 είδη: *L. aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. newyorkensis*, *L. riparia*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis* και *L. welshimeri* (Weller et al., 2015)(Εικόνα 9). Από τα προηγούμενα ταυτοποιημένα είδη, δύο θεωρούνται παθογόνα, τα *L. monocytogenes* και *L. ivanovii*. Μόνο η *L. monocytogenes*, που είναι τροφιμογενές παθογόνο, αποτελεί μία σημαντική απειλή για την υγεία του κοινού (Weller et al., 2015). Ο Trinad Chakraborty (Justus-Liebig University of Giessen, Germany) μαζί με τον Sukhadeo Barbuddhe (Indian Council of Agricultural Research, Raipur, India), απομόνωσαν ένα καινούργιο είδος *Listeria* από ένα μαγκρόβιο σε βαλτώδες περιβάλλον, το *Listeria goaensis* (Mukherjee et al., 2010). Παρόλο που φυλογενετικά απέχει από τα *L. monocytogenes* και *L. ivanovii*, το είδος αυτό εμφανίζει αιμολυτικές ιδιότητες και είναι πιο μολυσματικό από το *Listeria innocua* στο μοντέλο μόλυνσης *Galleria melonella* (Barbuddhe et al., 2016).



Εικόνα 9: Φυλογενετικό δέντρο των ειδών *Listeria* (Lebreton et al., 2016). Τα δύο παθογόνα είδη *Listeria monocytogenes* και *Listeria ivanovii* είναι επισημασμένα με μωβ γράμματα. Τα ονόματα των προτεινόμενων καινούργιων γενών παρουσιάζονται στα δεξιά. Αυτό το δέντρο δεν περιλαμβάνει το νέο είδος *Listeria goaensis*, που προτάθηκε από τους T. Chakraborty & S. Barbuddhe.

### 1.8.3. Ορολογική τυποποίηση

Τα είδη του γένους *Listeria* κατέχουν πολλαπλούς δείκτες επιφάνειας, όπως τα σωματικά αντιγόνα O και τα αντιγόνα μαστιγίου H, οι οποίοι προσδίδουν εξειδίκευση στην εκάστοτε ομάδα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στόχοι για την ανοσολογική αναγνώριση και την ορολογική τους τυποποίηση, με τη χρήση αντίστοιχων μονόκλωνων και πολύκλωνων αντιγόνων (Seeliger, 1979). Τα σωματικά (O) αντιγόνα των βακτηρίων του γένους *Listeria* έχουν διαχωριστεί σε 15 υπό-τύπους (I-XV), ενώ τα αντιγόνα μαστιγίου σε 4 υπό-τύπους (A-D). Με τους μοναδικούς συνδυασμούς των O και H αντιγόνων εξακριβώνονται οι ορότυποι των μεμονωμένων στελεχών των βακτηρίων *Listeria* spp. Έτσι έχουν διακριθεί τουλάχιστον 13 ορότυποι για το είδος *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e και 7) οι οποίοι ανήκουν σε τέσσερις εξελικτικές καταγωγές (lineages) (Ward et al., 2008). Συγκεκριμένα, στην πρώτη εξελικτική καταγωγή (lineage I) εντάσσονται οι ορότυποι 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e και 7, στη δεύτερη (lineage II) οι ορότυποι 1/2a, 1/2c, 3a και 3c, στην τρίτη (lineage III) οι ορότυποι 4b, 1/2a, 4a και 4c και στην τέταρτη (lineage IV) οι ορότυποι 4a και 4c (Hyden et al., 2016)(Πίνακας 6). Κάθε εξελικτική καταγωγή χαρακτηρίζεται από γονίδια τα οποία αποτελούν συγκεκριμένους δείκτες για τα στελέχη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* που ανήκουν σε αυτές (Doumith et al., 2004).

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* φαίνεται να παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία στην παρουσία των οροτύπων του με παθογονικότητα. Παρότι όμως πολλά στελέχη έχουν είναι εξαιρετικά μολυσματικά και συχνά θανατηφόρα, άλλα στελέχη εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα να προκαλέσουν λοίμωξη και είναι σχετικά μη μολυσματικά (Conner et al., 1989; Tabouret et al., 1991). Συγκεκριμένα, από τους 13 οροτύπους του είδους *L. monocytogenes* μόνο τέσσερις ορότυποι (1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b) έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση ανθρώπινης λιστερίωσης, αφού σε αυτούς ανήκει πάνω από το 96% των απομονώσεων από κλινικές περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης. Από τους τέσσερις αυτούς ορότυπους, τα στελέχη που ανήκουν στην εξελικτική καταγωγή II απαντώνται ευρέως στα τρόφιμα και στο περιβάλλον, ενώ απομονώνονται συχνά από περιπτώσεις ζωικής λιστερίωσης και σποραδικά από κλινικές περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης. Ωστόσο, τα στελέχη της εξελικτικής καταγωγής I φαίνεται να συνδέονται με τα περισσότερα κρούσματα λιστερίωσης στον άνθρωπο (Orsi et al., 2011). Από την άλλη, τα στελέχη των εξελικτικών καταγωγών III και IV δεν παρουσιάζονται συχνά και απομονώνονται κυρίως από ζώα, ενώ συσχετίζονται σπάνια με την ανθρώπινη λιστερίωση (Roche et al., 2008; Orsi et al., 2011).

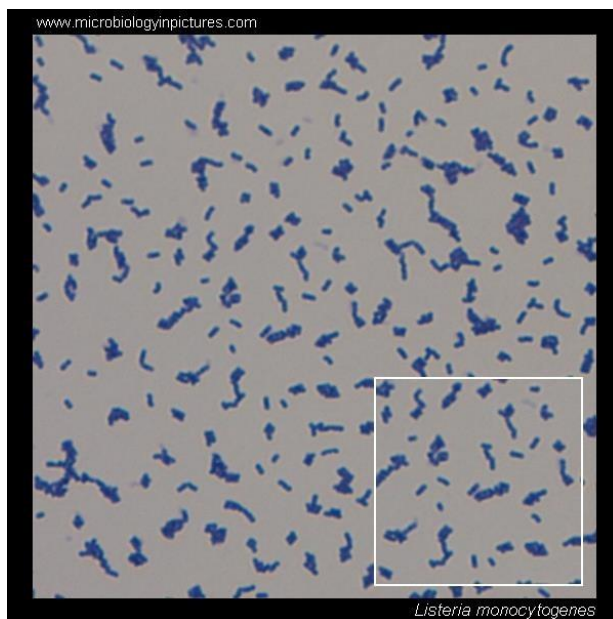
Πίνακας 6: Lineages της *L.monocytogenes* (Orsi et al., 2011).

Lineage	Πρώτη αναφορά	Ορότυποι	Γενετικά χαρακτηριστικά	Εξάπλωση
<b>I</b>	Περιγράφηκε αρχικά σε μία μελέτη MLEE από τους Piffaretti et al. (1989)	1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e, 7	Χαμηλότερη ποικιλία μεταξύ των lineages; τα χαμηλότερα επίπεδα ανασυνδυασμού μεταξύ των lineages	Συνήθως απομονώνεται από διάφορες πηγές; υπερεκπροσώπηση των ανθρώπινων στελεχών
<b>II</b>	Περιγράφηκε αρχικά σε μία μελέτη MLEE από τους Piffaretti et al. (1989)	1/2a, 1/2c, 3a, 3c	Τα πιο ποικίλα, υψηλότερα επίπεδα ανασυνδυασμού	Συνήθως απομονώνεται από διάφορες πηγές; υπερεκπροσώπηση μεταξύ των τροφίμων και των συνδεόμενων με τα τρόφιμα περιβαλλόντων, καθώς και στο φυσικό περιβάλλον
<b>III</b>	Περιγράφηκε αρχικά χρησιμοποιώντας αναλύσεις δεδομένων μερικής αλληλουχίας από τους Rasmussen et al. (1995)	4a, 4b, 4c	Μεγάλη ποικιλία; επίπεδα ανασυνδυασμού μεταξύ εκείνων για τις lineage I και lineage II	Οι περισσότερες απομονώσεις προέρχονται από μηρυκαστικά
<b>IV</b>	Αρχικά περιγράφηκε ως IIIB χρησιμοποιώντας αναλύσεις δεδομένων μερικής αλληλουχίας από τους Roberts et al. (2006); πρωτοαναφέρθηκε ως lineage IV από τους Ward et al. (2008)	4a, 4c	Λίγες απομονώσεις μέχρι σήμερα	Οι περισσότερες απομονώσεις προέρχονται από μηρυκαστικά

## 1.8.4. Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού

### 1.8.4.1. Μορφολογία

Τα είδη που ανήκουν στο γένος *Listeria* σχηματίζουν συμμετρικές, βραχείες ράβδους διαστάσεων από 0.4-0.5 έως 1-2  $\mu\text{m}$ , με παράλληλες πλευρές και στρογγυλεμένα άκρα. Τα κύτταρα παρουσιάζονται είτε σε μεμονωμένες μονάδες, είτε σε μικρές αλυσίδες, είτε διατάσσονται σε V, Y και πιο πολύπλοκους σχηματισμούς (palisades). Σε παλαιότερες, τραχείες καλλιέργειες και ύστερα από οσμωτικό σοκ μπορούν να αναπτυχθούν μακριά, λεπτά και νηματοειδή κύτταρα μήκους 6  $\mu\text{m}$  (Gutekunst et al., 1992; Jorgensen et al., 1995). Πρόκειται για Gram-θετικά βακτήρια αλλά μερικά κύτταρα, κυρίως των παλαιότερων καλλιεργειών, χάνουν την ικανότητά τους να διατηρήσουν τη χρώση Gram και περιστασιακά μπορεί να θεωρηθούν λανθασμένα ως *Hemophilus* (Rocourt & Buchrieser, 2007; Wagner & McLauchlin, 2008). Στην Εικόνα 10, παρουσιάζεται το παρασκεύασμα της χρώσης Gram του βακτηρίου *L. monocytogenes* όπου και παρατηρούνται τα μπλε-ιώδη κύτταρα. Το γένος *Listeria* είναι μη σποριογόνο και δε δημιουργεί κάψες (Seeliger & Bockemühl, 1968). Εμφανίζει κινητικότητα χάρη στα περιτρίχα μαστίγια όταν καλλιεργείται μεταξύ των θερμοκρασιών 20 και 25°C, ενώ στους 37°C παρουσιάζει μείωση ή απουσία κινητικότητας (Galsworthy et al., 1990).



Εικόνα 10: Χρώση κατά Gram του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*. ([www.microbiologyinpictures.com](http://www.microbiologyinpictures.com)) .

#### 1.8.4.2. Απαιτήσεις μικροβιακής ανάπτυξης

##### *Απαιτήσεις σε οξυγόνο (O<sub>2</sub>)*

Το βακτήριο *L. monocytogenes* είναι μικροοργανισμός, για τον οποίο η ευνοϊκότερη συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα για ανάπτυξη είναι 5-10% (Rocourt & Buchrieser, 2007). Επίσης, κατέχει το ένζυμο καταλάση που αποσυνθέτει το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Οι Friedman & Alm (1962) παρατήρησαν ότι η δραστηριότητα της καταλάσης είναι χαμηλή σε θρεπτικό μέσο που έχει συγκέντρωση γλυκόζης 10% (v/v). Ακόμη, το βακτήριο *L. monocytogenes* είναι προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός και τα γονίδια που κωδικοποιούν την αναερόβια οδό της είναι: *cbiD*, *cbiG* και *cbiK*.

##### *Θερμοκρασία*



Η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται από τους 1-2 °C έως και τους 45 °C, με βέλτιστη ανάπτυξη στους 30-37 °C (Seeliger & Jonesy, 1986; Junttila et al., 1988). Έχει παρατηρηθεί ότι αυξημένη ανθεκτικότητα σε έναν μικροοργανισμό σε μεταγενέστερη έκθεση σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως το pH, άλας και απολύμανση μπορεί να προσφέρει η βέλτιστη ανάπτυξη σε αυξημένες θερμοκρασίες (Kastberg et al., 2009; Kagkli et al., 2009; Cole et al., 1990; Patchet et al., 1991). Η δυνατότητα ανάπτυξης αυτού του μικροοργανισμού σε θερμοκρασίες ψύξης (0- 4 °C), δημιουργεί πρόβλημα στις βιομηχανίες τροφίμων, καθώς έχει μελετηθεί παρατεταμένη επιβίωση του και ανάπτυξη στους 4 °C (Chan et al., 2007; Wilkins et al., 1972). Η μικροβιακή αύξηση όμως είναι σχετικά αργή στις χαμηλές θερμοκρασίες, καθώς τα στελέχη αναπτύσσονται με χρόνο διπλασιασμού 20-30 h και 100-186 h στους 3 και 0 °C, αντίστοιχα (Swaminathan, 2001). Έχει εκτιμηθεί ότι το βακτήριο *L. monocytogenes* απαιτεί 35 h στους 4 °C και 41 min στους 35 °C ως χρόνο διπλασιασμού στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Marth et al., 1986). Οι Wood & Woodbine (1979) ανακάλυψαν ένα στέλεχος *L. monocytogenes* με υψηλότερη μολυσματικότητα μετά από ανάπτυξη στους 4 αντί 37 °C. Συνεπώς, υπάρχει η πιθανότητα η συντήρηση σε χαμηλές θερμοκρασίες να ενισχύει την μολυσματικότητα του *L. monocytogenes*.

Η θερμοκρασία θανάτωσης, όπως και κάθε διαδικασία αδρανοποίησης, είναι στοχαστική, με την ταχύτητα αδρανοποίησης να αυξάνεται κατά 10% για κάθε 6 °C αύξηση της θερμοκρασίας (Mackey & Bratchell, 1989). Επιπλέον, ο ρυθμός αδρανοποίησης επηρεάζεται και από το μέγεθος του αρχικού εμβολίου, καθώς και από άλλες ιδιότητες του μέσου ανάπτυξης (Mackey & Bratchell, 1989). Σύμφωνα με μελέτες, με ένα εμβόλιο περίπου 10 CFU/ g, οι θερμοκρασίες 67- 69 °C θα προκαλέσουν 90% μείωση του πληθυσμού μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα, και τη θανάτωση όλου του πληθυσμού σε 30- 60 sec (Gaze et al, 1989; Farber, 1989; Mackey & Bratchell, 1989).

### **pH**

Σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα το βακτήριο *L. monocytogenes* πολλαπλασιάζεται σε pH 4.5-9.2, ενώ έχει βέλτιστη τιμή pH 7 (Parish & Higgins, 1989; George & Lund, 1992). Τιμές pH μικρότερες του 5.5 οδηγούν σε σημαντική μείωση του ρυθμού αύξησης του μικροοργανισμού (Adams & Moss, 2008), ενώ σε τιμές μικρότερες του 4.3 ο μικροοργανισμός επιβιώνει αλλά δεν πολλαπλασιάζεται (Swaminathan, 2001). Η οξεοανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την επιβίωσή της στο έντερο ανθρώπων και ζώων. Μια σειρά παραγόντων όμως μπορεί να επηρεάσει τα όρια του pH ως προς την ανάπτυξη και την επιβίωση του *L. monocytogenes*, συμπεριλαμβανομένων διασταυρούμενων παραγόντων προστασίας από άλλες καταπονήσεις όπως τη θερμοκρασία, το μέγεθος εμβολίου και τις ιδιότητες του μέσου ανάπτυξης (Tienungoon et al., 2000; Vermeulin et al., 2009). Σε περίπτωση που το βακτήριο εκτεθεί σε όξινο περιβάλλον πριν από τον εμβολιασμό του (acid adaptation), ιδιαίτερα εάν προετοιμάζεται σε ηπιότερες τιμές pH, μπορεί να παρουσιάσει μεγάλη ανθεκτικότητα σε φυσιολογικές καταπονήσεις, όπως αυτές που εφαρμόζονται σε επίπεδα επεξεργασίας τροφίμων (Giotis et al., 2008).

### **Ενεργότητα νερού ( $a_w$ )**

Η *L. monocytogenes* μπορεί να αναπτύσσεται σε τιμές ενεργότητας νερού χαμηλότερες του 0.93, όπως πολύ λίγα τροφιμογενή παθογόνα (Petran & Zpttola, 1989; Farber & Addison, 1994). Η ανάπτυξή του πραγματοποιείται σε τιμές  $a_w$  από 0.90 έως 0.99, με βέλτιστη ανάπτυξη στο 0.97. Ακόμα, έχει την ικανότητα επιβίωσης για μεγάλο χρονικό διάστημα σε τιμές έως 0.83 (Shahamat et al., 1980), ενώ σε τιμές έως 0.90 επιβιώνει απλώς χωρίς να αναπτύσσεται (FSAI, 2011). Έχει δειχθεί ότι μετά από έκθεση σε άλλες καταπονήσεις, όπως pH και NaCl, η ανοχή στη



μειωμένη ενεργότητα νερού αυξάνεται (Giotis et al., 2008; Vogel et al., 2010). Πρέπει να υπογραμμιστεί ότι η ανοχή σε μειωμένη ενεργότητα νερού, θεωρείται σημαντικός παράγοντας για την επιβίωση των στελεχών του γένους *Listeria* (Vogel et al., 2010).

### **Επίδραση NaCl**

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* παρουσιάζει ικανότητα ανάπτυξης σε συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου έως 10% (w/v), ενώ επιβιώνει σε ακόμα υψηλότερες συγκεντρώσεις (Seeliger & Jonesy, 1986). Μελέτες έδειξαν ότι σε αυξημένες συγκεντρώσεις NaCl, η μέγιστη πυκνότητα πληθυσμού (MPD-maximal population density) μειώθηκε και ο χρόνος διπλασιασμού αυξήθηκε. Η μέγιστη συγκέντρωση που επέτρεπε την αύξηση του μικροοργανισμού στους 30 °C ήταν 12% NaCl, ενώ σε χαμηλότερες παρατηρήθηκε μείωση στο MPD και αύξηση του χρόνου που απαιτείται για επίτευξη της μέγιστης συγκέντρωσης των κυττάρων. Συγκεκριμένα, στους 4 °C τα βακτήρια χρειάζονται δύο ή τρεις φορές περισσότερο χρόνο για να φθάσουν στην MPD από εκείνο στους 30 °C. Επιπρόσθετα, συγκεντρώσεις NaCl μεγαλύτερες από 10% προκάλεσαν μείωση της μολυσματικότητας του παθογόνου στους 30 °C, ενώ η *L. monocytogenes* που αναπτύχθηκε στους 4 °C και σε συγκέντρωση NaCl 3- 12% διατηρούσε ακόμη κάποιο επίπεδο μολυσματικότητας (Faleiro et al., 2003). Τέλος, η επιβίωσή σε χαμηλές τιμές pH και υψηλές συγκεντρώσεις άλατος εξαρτάται σημαντικά από την θερμοκρασία (Cole et al., 1990).

### **1.8.4.3. *Listeria monocytogenes* απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης (stress)**

#### **Θερμική καταπόνηση**

Η θερμοανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα ποικίλει (Kenney & Beuchat, 2004; Mackey et al., 1990). Οι Doyle et al. (2001) έχουν εξετάσει τη θερμική ανοχή στη *L. monocytogenes* τόσο σε μέσα καλλιέργειας όσο και στα τρόφιμα. Υποδηλώνεται ότι η θερμική αντίσταση της *L. monocytogenes* εξαρτάται από το στέλεχος του παθογόνου, την ηλικία της καλλιέργειας, τις συνθήκες ανάπτυξης, μέσα αποκατάστασης, και τα χαρακτηριστικά των τροφών (περιεκτικότητα σε αλάτι,  $a_w$ , η οξύτητα, η παρουσία αναστολέων). Οι μικροοργανισμοί είναι γνωστό ότι αυξάνουν την θερμοανοχή τους όταν εκτίθενται σε διάφορους περιβαλλοντικούς παραγόντες καταπόνησης, όπως υποθανάτιο θερμικό σοκ, ωσμωτική καταπόνηση, έλλειψη θρεπτικών συστατικών, έκθεση σε οξύ, αλκαλική κατεργασία, έκθεση σε αιθανόλη ή υπεροξειδίο του υδρογόνου (Farber & Brown, 1990; Jorgensen et al., 1995; Lou & Yousef, 1997; Mazzotta & Gombas, 2001). Η απόκριση των βακτηρίων σε θερμικό σοκ οδηγεί σε μια προσωρινή επαγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSPs), που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *hsp70* και *hsp90* και προφυλάσσουν τα κύτταρα από στρεσογόνους παράγοντες (Lindquist & Craig, 1988). Οι Pagan et al. (1997) παρατήρησαν επταπλάσια αύξηση στην θερμοανοχή της *L. monocytogenes* μετά από έκθεση σε 45 °C για 180 min των κυττάρων. Το πόσο υψηλότερη πάνω από τα βέλτιστα επίπεδα είναι η θερμοκρασία έκθεσης των κυττάρων, καθώς και το μέσο ανάπτυξης πιστεύεται ότι επηρεάζουν την έκταση της παρατηρούμενης θερμοανοχής (Sergelidis & Abraham, 2009).

#### **Οξίνη καταπόνηση**

Το παθογόνο *L. monocytogenes* έχει αναπτύξει ποικιλία κυτταρικών μηχανισμών προκειμένου να επιτύχει προσαρμογή και επιβίωση σε όξινα περιβάλλοντα και να διατηρηθεί η ομοιόσταση του pH. Η προσαρμογή της *L. monocytogenes* σε όξινα περιβάλλοντα περιλαμβάνει μηχανισμούς που διατηρούν ενδοκυτταρική ομοιοστασία pH. Οι μικροοργανισμοί διατηρούν το ενδοκυτταρικό τους pH μέσω του μηχανισμού ομοιόστασης με μεταφορά πρωτονίων διαμέσου

της κυτταρικής μεμβράνης. Στους αερόβιους οργανισμούς, η ενεργή μεταφορά των  $H^+$  συνδέεται με την μεταφορά των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Αντίθετα, τα αναερόβια βακτήρια επιτυγχάνουν τη μεταφορά των  $H^+$  με την βοήθεια των μορίων  $H^+$  - ATPάσης, με ταυτόχρονη κατανάλωση ενέργειας από την υδρόλυση ATP (Gandhi & Chikindas, 2007). Το βακτήριο *L. monocytogenes*, όντας προαιρετικά αναερόβιο, μπορεί να χρησιμοποιήσει και τις δύο αυτές διαδικασίες για να διατηρήσει σταθερό το pH (Shabala et al., 2002). Η προσαρμοστική απόκριση που επάγει οξεανθεκτικότητα (acid tolerance response-ATR), περιλαμβάνει τη σύντομη έκθεση σε ήπια όξινη συνθήκες. Η ενεργοποίηση αυτού του συστήματος οδηγεί στην παραγωγή πρωτεϊνών όξινης καταπόνησης (Acid Shock Proteins-ASPs) όταν υποβάλλεται σε συνθήκες έντονης καταπόνησης ή ακόμα και σε θανατηφόρο pH (Foster et al., 1994; O'Driscoll et al., 1997). Η έκθεση της *L. monocytogenes* σε όξινο pH μπορεί να επιφέρει διάφορες μεταβολές στο κύτταρο, όπως αλλαγές στη σύνθεση της μεμβράνης, αύξηση των πρωτονίων εκροής, αύξηση σε αμινοξέα καταβολισμού και επαγωγή των ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA (Beales, 2004; Yousef & Courtney, 2003). Οι Phan-Thanh & Mahouin (1999) ανέφεραν αυξημένη παραγωγή πρωτεϊνών, όπως η GroEL, η ATP-συνθάση και διάφοροι μεταγραφικοί ρυθμιστές, σε βακτήρια που εκτέθηκαν σε όξινη συνθήκες καταπόνησης. Η ATR διαφέρει μεταξύ των κυττάρων που βρίσκονται στην εκθετική και τη στατική φάση, αλλά και μεταξύ των διαφόρων βακτηριακών στελεχών. Ταυτόχρονα, στο παθογόνο *L. monocytogenes* έχει αναγνωριστεί ένα ρυθμιστικό σύστημα που βασίζεται στα γονίδια *lisR* και *lisK*, τα οποία κωδικοποιούν το ρυθμιστικό παράγοντα  $\sigma^B$  και την ιστιδίνη-κινάση, αντίστοιχα. Το σύστημα αυτό έχει την ικανότητα να αντιλαμβάνεται τις μεταβολές στο περιβάλλον του κυττάρου, όπως το χαμηλό pH, με τη βοήθεια της ιστιδίνης-κινάσης και έπειτα να αυξάνει την έκφραση του γονιδιώματος με τη βοήθεια του ρυθμιστικού παράγοντα (Gandhi & Chikindas, 2007). Ακόμη, το βακτήριο *L. monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει εκτός του χαμηλού pH τροφών και κατά τη διάρκεια της γαστρικής διέλευσης ή μετά από έκθεση σε λιπαρά οξέα στο έντερο, και τελικά στα φαγοσώματα των μακροφάγων, όπου απαιτείται μια πτώση του pH, ώστε να ενεργοποιηθεί η αιμολυσίνη που επιτρέπει την διαφυγή του από το φαγόσωμα. Εκτεθειμένα σε συνθήκες καταπόνησης (ή σε οξύ) κύτταρα είναι πολύ πιο ανεκτικά σε θανατηφόρα υπό φυσιολογικές συνθήκες επίπεδα pH. Μόλις καταναλωθεί λοιπόν, το *L. monocytogenes* μαζί με την τροφή, πρέπει να επιβιώσει έως ότου να φθάσει τον εντερικό επιθήλιο, όπου μπορεί να εισβάλει και στη συνέχεια να διαδοθεί διασυστηματικά. Σημειώνεται ότι το ανθρώπινο pH στο στομάχι κυμαίνεται από 1-3 έως και άνω του 6.0 μετά την κατανάλωση τροφών.

Το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes* χρησιμοποιεί επίσης το σύστημα της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού (GAD) για να επιβιώσει σε καταπόνηση οξέος, το οποίο αποτελείται από 3 γονίδια: *gadA*, *gadB* και *gadC*. Τα *gadA* και *gadB* γονίδια κωδικοποιούν δύο αποκαρβοξυλάσες γλουταμινικού και το *gadC* γονίδιο κωδικοποιεί μια γλουταμικό-γ-αμινοβουτυρικό (GABA) αντιμεταφορέα (Cotter et al., 2001). Ένας ειδικός μεταφορέας παραλαμβάνει το γλουταμινικό από το κύτταρο, και στη συνέχεια η αποκαρβοξυλίωση πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα. Έπειτα, παράγεται γ-αμινοβουτυρικό με κατανάλωση πρωτονίου και εξάγεται από το κύτταρο μέσω ενός αντιμεταφορέα που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη. Εξαιτίας της απώλειας πρωτονίων, παρατηρείται αυξημένο κυτταροπλασματικό pH (Waterman & Small, 1998). Ο ρόλος του GAD συστήματος στην οξεανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* κατά τη γαστρική διέλευση, έχει μελετηθεί από τους Cotter et al. (2001), και βρέθηκε ότι η προσθήκη του γλουταμινικού αύξησε την επιβίωση του άγριου στελέχους στο γαστρικό υγρό. Κατάργηση των *gadA*, *gadB* και *gadC* γονιδίων προκάλεσε αυξημένη ευαισθησία

σε χαμηλό pH. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα προκύπτει η σημασία του GAD συστήματος στην ανοχή σε οξύ.

#### **Διασταυρούμενη προστασία**

Η μικροβιακή προσαρμογή στην καταπόνηση προκαλεί εκτεταμένη ανοχή σε πολλούς άλλους θανατηφόρους στρεσογόνους παράγοντες. Αυτό έχει ονομαστεί «διασταυρούμενη προστασία» (cross-protection) (Begley et al., 2002). Οι μικροοργανισμοί επιστρατεύουν τη διασταυρούμενη προστασία για να επιβιώσουν κατά των ακραίων καταπονήσεων των διαφόρων μεθόδων συντήρησης των τροφίμων (Rodriguez-Romo & Yousef, 2005). Εκτός από το ATR, έχει επίσης δειχθεί να δημιουργούν μία διασταυρούμενη προστασία έναντι σε θερμικές και οσμωτικές καταπονήσεις. Ο Foster (2001), ανέφερε ότι η επαγωγή πρωτεϊνών της όξινης καταπόνησης προστατεύει τα μικροβιακά κύτταρα έναντι θανατηφόρων πρωτεϊνών οξέος ή άλλες καταπονήσεις, όπως η υψηλή θερμοκρασία, οξειδωτική βλάβη και υψηλή ωσμωτικότητα. Η προσαρμοσμένη σε οξύ *L. monocytogenes* (pH 5.5, 2 h) είχε μια αυξημένη ανοχή έναντι θερμικής (52 °C) και ωσμωτικής (25-30% NaCl) καταπόνησης καθώς και έναντι καταπόνησης λόγω έκθεσης σε αλκοόλη (15%) (Koutsoumanis et al. , 2003).

#### **1.8.4.4. Μεταβολικά χαρακτηριστικά**

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι θετικός στην αντίδραση της καταλάσης και αρνητικός στην αντίδραση της οξειδάσης (Rocourt & Buchrieser, 2007). Πρόκειται για έναν ομοζυμωτικό μικροοργανισμό που οξειδώνει τα ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης και διαθέτει τα ένζυμα οξειδάση της γλυκόζης και οξειδάση του NADH (Patchett et al., 1991). Έχει την ικανότητα ανάπτυξης παρουσία γλυκόζης και υπό αερόβιες συνθήκες σχηματίζει γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ και ακετοΐνη ως κύρια τελικά προϊόντα (Romick et al., 1996). Αντίθετα, υπό αναερόβιες συνθήκες η ακετοΐνη δεν παράγεται και η ανάπτυξη πραγματοποιείται μόνο παρουσία εξοζών και πεντοζών. Σε αντιδιαστολή με τη σακχαρόζη, η μαλτόζη και η λακτόζη υποστηρίζουν την ανάπτυξη κάποιων στελεχών υπό αναερόβιες συνθήκες (Pine et al., 1989). Τέλος, ο καταβολισμός της γλυκόζης πραγματοποιείται μέσω του βιοχημικού μονοπατιού των Embden-Meyerhof, τόσο αερόβια όσο και αναερόβια (Seeliger & Jonesy, 1986), ενώ ο καταβολισμός άλλων σακχάρων συντελεί στην παραγωγή οξέων αλλά όχι αερίων (Wagner & McLauchlin, 2008). Τα μεταβολικά χαρακτηριστικά της *L. monocytogenes* παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Μεταβολικά χαρακτηριστικά της *L. monocytogenes* (Orsi et al., 2016).

	Voges-Proskauer	Methyl red	Νιτρική αναγωγή	Αιμόλυση	PIPLC	Arylamidase	A- Mannosidase
	+	+	-	+	+	-	+
	Ζύμωση						
	D-arabitol	D-xylose	L-rhamnose	a-methyl-D-glucoside	D-ribose	Glucose-1-phosphate	D-tagatose D-mannitol
	+	-	+	+	-	-	-
	Sucrose	Turanose	Glycerol	D-galactose	L-sorbose	Inositol	Methyl-a-D-mannose Maltose
	+	-	V	V	V!	-	- +
	Lactose	Melibiose	Inulin	D-Melezitose	D-Lyxose	D-glucose	
	+	V!	V!	V	V	V!	

*L.  
monocytogenes*

\*PIPLC: phosphatidylinositol-specific phospholipase C, +: θετικό, -: αρνητικό, V: ποικίλλει μεταξύ των επαναλήψεων ή/ και των στελεχών, V!: διαφέρει μεταξύ των μελετών

#### 1.8.4.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Τα κύτταρα της μεμβράνης των μικροοργανισμών του γένους *Listeria* αποτελούνται κυρίως από πεπτιδογλυκάνη (η οποία αποτελεί το 35% του ξηρού βάρους του κυτταρικού τοιχώματος), τειχοϊκά οξέα (τα οποία αποτελούν το 60-70% του ξηρού βάρους του κυτταρικού τοιχώματος και συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς με το μουραμικό οξύ στην πεπτιδογλυκάνη) και λιποτειχοϊκά οξέα (τα οποία χρησιμεύουν στην αγκίστρωση του κυτταρικού τοιχώματος στην υποκείμενη πλασματική μεμβράνη). Τα τειχοϊκά οξέα φαίνεται ότι αποτελούν το 20% του βάρους του κυτταρικού τοιχώματος του στελέχους *L. monocytogenes* EGD, το οποίο αποτελείται από N-ακετυλογλυκοζαμίνη, ραμνόζη, ριβιτόλη και φώσφορο σε μοριακή αναλογία 0.95:1.0:0.97:0.98. Το μοριακό βάρος των τειχοϊκών οξέων στο συγκεκριμένο στέλεχος έχει υπολογιστεί περίπου στα 120 kDa, ενώ η ανοσολογική τους δραστηριότητα αποδίδεται στα υπολείμματα ραμνόζης που δρουν ως σημαντικός αντιγονικός προσδιοριστής (Ο-παράγοντας ή σωματικό αντιγόνο) (Wagner & McLauchlin, 2008).

Τα είδη του γένους *Listeria* έχουν μαστίγια που τους επιτρέπουν την *in vitro* κινητικότητα, ενισχύοντας έτσι την πρόσφυση και τη διείσδυση στα επιθηλιακά κύτταρα των ξενιστών. Στο παθογόνο *L. monocytogenes* παράγονται πέντε με έξι περίτριχα μαστίγια, των γονιδίων των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται από τη ρυθμιστική πρωτεΐνη MogR, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *mogR* (Wagner & McLauchlin, 2008). Στο περιβάλλον, τα βακτήρια χρησιμοποιούν τα

μαστίγια για να κινηθούν προς τα θρεπτικά συστατικά. Η σημασία των μαστιγίων είναι επίσης μεγάλη στα παθογόνα είδη για την πρόκληση ασθενειών. Παρόλα αυτά, μετά την είσοδο του βακτηρίου στον ανθρώπινο οργανισμό, η φλαγγελίνη διεγείρει το ανοσοποιητικό του σύστημα. Για αυτό το λόγο, πολλά βακτήρια μειώνουν την παραγωγή μαστιγίων αμέσως μετά την μόλυνση (Shen & Higgins, 2006). Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* ρυθμίζει την παραγωγή αυτή μέσω της πρωτεΐνης MogR, η οποία προσφύεται στην περιοχή εκκίνησης του γονιδίου *flaA* και προκαλεί μείωση της έκφρασής του, καθώς και άλλων γονιδίων κινητικότητας (Wagner & McLauchlin, 2008).

Στην *L. monocytogenes* παράγεται επίσης μία μεγάλη σειρά από εξειδικευμένες πρωτεΐνες που υποστηρίζουν την επιβίωση του μικροοργανισμού σε στρεσογόνες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και αλάτων (π.χ. BetL, Bsh, Lmo1421, OpuB και OpuC), αλλά και πρωτεΐνες που τον βοηθούν να εισάγεται στα κύτταρα των ξενιστών, να διαφεύγει από τα κενοτόπια, να αντιγράφεται στο κυτταρόπλασμα και να εξαπλώνεται σε γειτονικά κύτταρα (π.χ. InlA, InlB, LLO, PLCs, Mpl, ActA).

Κατά την επαφή με τον εισβολέα *L. monocytogenes*, το θηλαστικό ξενιστής εκτοξεύει μη ειδικές επιθέσεις ανοσίας οι οποίες χαρακτηρίζονται από ενεργοποίηση και επέκταση κυττάρων natural killer (NK) βοηθητικών κυττάρων CD4 T εκκινηθέντων από δενδριτικά κύτταρα. Αυτοί οι κυτταρικοί τύποι είναι ισχυροί παραγωγοί ιντερφερόνης γάμμα (IFN- $\gamma$ ), η οποία ενεργοποιεί αντιμικροβιακούς μακροφάγους για την έκκριση του παράγοντα άλφα νέκρωσης όγκων (TNF- $\alpha$ ) και της ιντερλευκίνης 12 (IL-12). Οι TNF- $\alpha$  και IL-12 με τη σειρά τους ωθούν τα κύτταρα NK να καταστρέψουν τα μολυσμένα κύτταρα. Η *L. monocytogenes* που έχει επιβιώσει χρησιμοποιεί μία τοξίνη που σχηματίζει πόρους, την LLO, για να διακόψει την κενοτοπική μεμβράνη, η οποία ενισχύει περαιτέρω την έκφραση της IFN- $\gamma$  από τα κύτταρα NK και CD4 T και ρυθμίζει την αύξηση μορίων στην παρουσία αντιγόνου και την ενεργοποίηση αντιμικροβιακών μακροφάγων. Αυτό οδηγεί σε επέκταση αντιγονο-ειδικών, κυτταροτοξικών CD8 T κυττάρων και επακόλουθη απομάκρυνση βακτηρίων *L. monocytogenes*.

Επιπρόσθετα, πολλές πρωτεΐνες που συνδέονται με την εισβολή και την παθογονικότητα της *L. monocytogenes* (LLO, InlA, InlD, InlC2, IspA-E) αναγνωρίζονται από το χυμικό ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή μέσω της παραγωγής ειδικών αντισωμάτων. Το γεγονός ότι οι ιντερναλίνες InlA, InlD, και InlC2 και οι επιφανειακές πρωτεΐνες IspA-E της *L. monocytogenes* αναγνωρίζονται από μολυσμένα κουνέλια, υποδηλώνει ότι αυτές οι πρωτεΐνες επάγονται ή ρυθμίζονται η αύξησή τους σημαντικά *in vivo* κατά τη διάρκεια της μόλυνσης και μπορεί να παίζουν κρίσιμους ρόλους στην παθογένεση. Επακόλουθη ανάλυση υποδεικνύει ότι η IspC είναι μία 86-kDa πρωτεΐνη στην επιφάνεια του κυττάρου που αποτελείται από 774 αμινοξέα με αυτολυτική δραστηριότητα (υδρολάση του πεπτιδογλυκανίου) και δραστηριότητα δέσμευσης του κυτταρικού τοιχώματος, που αποδίδεται στις N- και C- τελικές περιοχές της, αντίστοιχα. Έτσι, η IspC μπορεί να αποτελεί μέλος των αυτολυσινών της *L. monocytogenes* που περιλαμβάνουν τις P45, P60, NamA (ή MurA), Ami1, και Auto, οι οποίες έχει δειχθεί προηγουμένως ότι συμβάλλουν στην παθογένεια της *L. monocytogenes*.

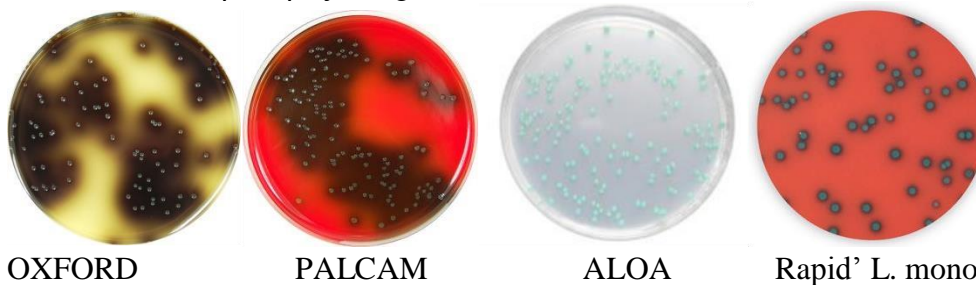
#### 1.8.4.6. Ανάπτυξη σε θρεπτικά υποστρώματα

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, εκτός από τις γνωστές πηγές άνθρακα και αζώτου (γλυκόζη και γλουταμίνη), για την βέλτιστη ανάπτυξή του συνήθως απαιτεί τα αμινοξέα κυστίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, αργινίνη, μεθειονίνη, βαλίνη, κυστεΐνη και τις βιταμίνες ριβοφλαβίνη, βιοτίνη, θειαμίνη και θειοκτικό οξύ ( $\alpha$ -λιποϊκό οξύ) (Premaratne et al., 1991). Η αύξηση προωθείται επιπλέον και από την ύπαρξη τρισθενούς σιδήρου ( $Fe^{3+}$ ) και φαινολαλανίνης στο θρεπτικό υπόστρωμα (Premaratne et al., 1991).

Ο μικροοργανισμός γενικά αναπτύσσεται καλά σε έναν αριθμό μη επιλεκτικών θρεπτικών μέσων που υποστηρίζουν την ανάπτυξη βακτηρίων. Μπορεί να αναπτυχθεί τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες σε μη επιλεκτικά τεχνητά μέσα, όπως οι ζωμοί Tryptone Soy Broth (TSB) και Brain Heart Infusion (BHI)(Wagner & McLauchlin, 2008).

Υπάρχει μία σειρά από στερεά και υγρά επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα για την απομόνωση των ειδών του γένους *Listeria* από δείγματα τροφίμων, περιβάλλοντος και περιττωμάτων. Αρχικά, τα επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα άγαρ Polymyxin Acriflavine Lithium chloride Ceftazidone Aesculin Mannitol (PALCAM) και OXFORD (Εικόνα 11) προτάθηκαν από τα ISO 11290-1:1996 και ISO 11290-2:1998 ως κύρια μέσα επίστρωσης για την ανίχνευση και αρίθμηση όλων των ειδών του γένους *Listeria*. Τα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα διαφοροποιούν τα είδη του γένους αυτού από τα άλλα βακτήρια, με βάση την υδρόλυση του γλυκοζιτη εσκουλίνης, η οποία υδρολύεται από όλα τα είδη του γένους *Listeria* και το προϊόν υδρόλυσής του, η εσκουλετίνη ή 6,7-διϋδροξυκουμαρίνη αντιδρά με το τρισθενές κιτρικό σίδηρο που εμπεριέχεται στο υπόστρωμα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία σκουρόχρωμου γκρι-λαδί συμπλόκου (Εικόνα 11). Υπάρχουν ακόμη επιλεκτικά μέσα για την ανίχνευση του είδους *L. monocytogenes* με βάση χρωμογόνα υποστρώματα. Το *Listeria* άγαρ, όπως περιγράφηκε από τους Ottaviani και Agosti (ALOA) (Ottaviani et al., 1997) ήταν το πρώτο χρωμογόνο υλικό που προτάθηκε στις τροπολογίες του 2004 του ISO 11290-1 και 11290-2 (ISO 11290-1/Amd.1:2004 & ISO 11290-2/Amd.1:2004) (ISO, 1996; ISO, 1998). Η διαφοροποίηση μέσω του ALOA έγκειται στην παρουσία του χρωμογόνου συστατικού 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γλυκοκυρανοσίδιο που συντελεί στον εντοπισμό του ενζύμου β-D-γλυκοσιδάση, το οποίο παράγεται από όλα τα είδη του γένους *Listeria*. Προϊόν της αντίδρασης μεταξύ του ενζύμου και του χρωμογόνου συστατικού είναι η ανάπτυξη αποικιών χρώματος μπλε-τιρκουάζ με μέση διάμετρο 1 χιλιοστό στην επιφάνεια του άγαρ (Εικόνα 11). Επίπλέον, χάρη στην παρουσία της L-α-φωσφατιδυλινοσιτόλης, η οποία υδρολύεται από την φωσφολιπάση C, έναν παράγοντα μόλυσματικότητας που παράγεται από τα δύο παθογόνα είδη *L. monocytogenes* και *L. ivanovii*, είναι εφικτό να διαφοροποιηθούν οι αποικίες των βακτηρίων *Listeria* spp. που εμφανίζονται με μπλε-τιρκουάζ απόχρωση, από τις αποικίες των στελεχών της *L. monocytogenes* που εμφανίζονται με μπλε-τιρκουάζ απόχρωση περιβαλλόμενες από μία αδιαφανή άλω.

Επιπρόσθετα, κάποια χρωμογόνα μέσα στηρίζονται μόνο στην ανίχνευση της φωσφολιπάσης C, οπότε η διαφοροποίηση του παθογόνου γίνεται μέσω του σχηματισμού αποικιών χρώματος μπλε-τιρκουάζ έναντι των άσπρων αποικιών που σχηματίζουν τα υπόλοιπα είδη του γένους *Listeria* (Εικόνα 11). Η χρήση επιλεκτικών χρωμογόνων θρεπτικών μέσων καλλιέργειας οδηγεί στην ανίχνευση δυνητικών στελεχών *L. monocytogenes* εντός 24 ή 48 h επώασης στους 37 °C. Ωστόσο, περαιτέρω δοκιμές για την επαλήθευση της ταυτότητας των απομονώσεων είναι απαραίτητες (Wagner & McLauchlin, 2008).



Εικόνα 11: Αποικίες της *L. monocytogenes* στα θρεπτικά υποστρώματα Oxford ([www.eolabs.com](http://www.eolabs.com)), Palcam ([www.eolabs.com](http://www.eolabs.com)), Aloa ([www.emdmillipore.com](http://www.emdmillipore.com)), Rapid' L.mono (<https://labolytic.no/produkter/mikrobiologi>).

### 1.8.5. Επιδημιολογικά στοιχεία

Λόγω του ότι το βακτήριο *L. monocytogenes* είναι παντού στο περιβάλλον, υπάρχουν πολλές ευκαιρίες μόλυνσης με το συγκεκριμένο παθογόνο κατά τη διάρκεια επεξεργασίας στην παραγωγή τροφίμων. Για παράδειγμα, μπορεί να εντοπίζεται σε άγρια και κατοικίδια ζώα, πτηνά, έντομα, στο έδαφος, στο νερό και σε λύματα, και στη χλωρίδα. Επιβιώνει σε φυτικές ύλες για 10-12 χρόνια (Beuchat, 1996), στο έδαφος και στο νερό η επιβίωσή του μπορεί να διαρκέσει μέχρι και 1-2 χρόνια, ενώ στα κόπρανα των ζώων μπορεί να διαρκέσει 1-6 χρόνια (Sauders & Wiedmann, 2007). Εφόσον βρίσκεται στο έδαφος και τη χλωρίδα, το βακτήριο *L. monocytogenes* μπορεί εύκολα να μεταδοθεί από ζώα που ζουν σε κοπάδια. Το βακτήριο συχνά απομονώνεται από χοίρους, πρόβατα και πουλερικά, και βρίσκεται επίσης στα γαλακτοκομικά προϊόντα, στα φρούτα και στα λαχανικά. Βακτήρια του γένους *Listeria* βρίσκονται σε περιοχές βόσκησης, σε μη ανανεούμενες συχνά πηγές νερού και σε φτωχά προετοιμασμένες ζωοτροφές. Μπορεί να ζήσει στο γαστρεντερικό σύστημα ανθρώπων, ζώων και πτηνών για μεγάλες χρονικές περιόδους, χωρίς να προκαλέσει μόλυνση και έχει βρεθεί στο 5% υγιών ατόμων ή και σε περισσότερους, συνήθως στο εντερικό επιθήλιο. Γι' αυτό το λόγο, η έκθεση στο βακτήριο είναι αναπόφευκτη. Έχει το ασυνήθες χαρακτηριστικό να είναι ικανό να αναπτύσσεται, αν και αργά, σε θερμοκρασίες τόσο χαμηλές όσο στους 0 °C.

Η κατανόηση της λιστερίωσης ως τροφικής ασθένειας και των παραγόντων κινδύνου της μόλυνσης που προκαλείται από τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία 30 χρόνια, χάρη στις μελέτες των επιδημιολογικών και σποραδικών περιπτώσεων λοίμωξης που έχουν εκδηλωθεί. Η νόσος, αν και σπάνια, είναι συχνά πολύ σοβαρή και προκαλεί υψηλά ποσοστά νοσηλείας και θνητότητας. Σε σύγκριση δε με άλλες τροφιμογενείς ασθένειες που προκαλούνται από βακτήρια, τα διάφορα χαρακτηριστικά της λιστερίωσης, συμπεριλαμβανομένων και της σχετικά χαμηλής συχνότητας εμφάνισης αλλά και της μακράς περιόδου επώασης, δυσχεραίνουν τον εντοπισμό των εστιών της λοίμωξης. Παρ' όλα αυτά, οι βελτιωμένες εργαστηριακές μελέτες βοηθούν στο να ξεπεραστούν οι δυσκολίες αυτές (Painter & Slutsker, 2007).

Η έντονη ερευνητική δραστηριότητα για τον εντοπισμό των εστιών της νόσου, ξεκίνησε μετά από το κρούσμα λιστερίωσης που συνδέθηκε με κατανάλωση λαχανοσαλάτας το 1981. Από τότε κι έπειτα, με την εμφάνιση περιστατικών λιστερίωσης οργανώνονται μελέτες από ερευνητικές ομάδες, με στόχο τον αμεσότερο εντοπισμό της πηγής μόλυνσης της νόσου και τον εντοπισμό όλων των κρουσμάτων που σχετίζονται με αυτήν. Το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) εκτιμά ότι στις ΗΠΑ, 3500 άνθρωποι ασθενούν σοβαρά με λιστερίωση κάθε χρόνο και από αυτούς 500-600 πεθαίνουν (CDC, 2013). Η EFSA ανέφερε το 2017 στην Ευρωπαϊκή Ένωση 2480 επιβεβαιωμένα ανθρώπινα κρούσματα λιστερίωσης σε 27 χώρες-μέλη της και η δηλούμενη επίπτωση ήταν 0.48 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα, ενώ το ποσοστό θνησιμότητας ήταν 13.8% (EFSA & ECDC, 2018). Συνολικά, το διάστημα 2004-2017 δηλώθηκαν 158 κρούσματα λιστερίωσης στη χώρα μας. Ο μέσος ετήσιος αριθμός των κρουσμάτων ήταν 11,3 και η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση ήταν 1,03 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού. Από το 2015 έως και το 2017 όμως παρατηρήθηκε αύξηση των κρουσμάτων λιστερίωσης (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2018).

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είχε αναγνωριστεί ως ανθρώπινο παθογόνο από το 1924 (Nyfeldt, 1929). Ωστόσο, ο τρόπος μετάδοσής του ήταν αδιευκρίνιστος μέχρι τη δεκαετία του 1980, όταν μία σειρά από κρούσματα υπέδειξαν τη μετάδοση του παθογόνου μέσω τροφίμων (Goulet et al., 1995). Πλέον είναι γνωστό ότι σχεδόν όλες οι περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης είναι τροφιμογενείς (Adak et al., 2002) και η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων θεωρείται ο κυριότερος τρόπος διάδοσης της μόλυνσης. Πουλερικά, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, κρέας και κρεατοσκευάσματα, φρέσκα φρούτα και λαχανικά καθώς και ψάρια και οστρακοειδή, έχουν ενοχοποιηθεί κατά καιρούς ως μέσα διάδοσης της ασθένειας (EFSA & ECDC, 2015). Η δε επιμόλυνση των παραπάνω τροφίμων από τον μικροοργανισμό, πραγματοποιείται είτε απευθείας από τα μολυσμένα ζώα, είτε μέσω των κοπράνων ανθρώπων και ζώων, είτε έπειτα από διαμείανση (cross-contamination) των έτοιμων προς κατανάλωση τελικών προϊόντων. Ωστόσο, πέραν των τροφίμων, στον άνθρωπο η ασθένεια μεταδίδεται και μέσω της άμεσης επαφής είτε με το μολυσμένο περιβάλλον και τα ζώα, είτε μέσω διαμείανσης μεταξύ ασθενών (McLauchlin, 1996).

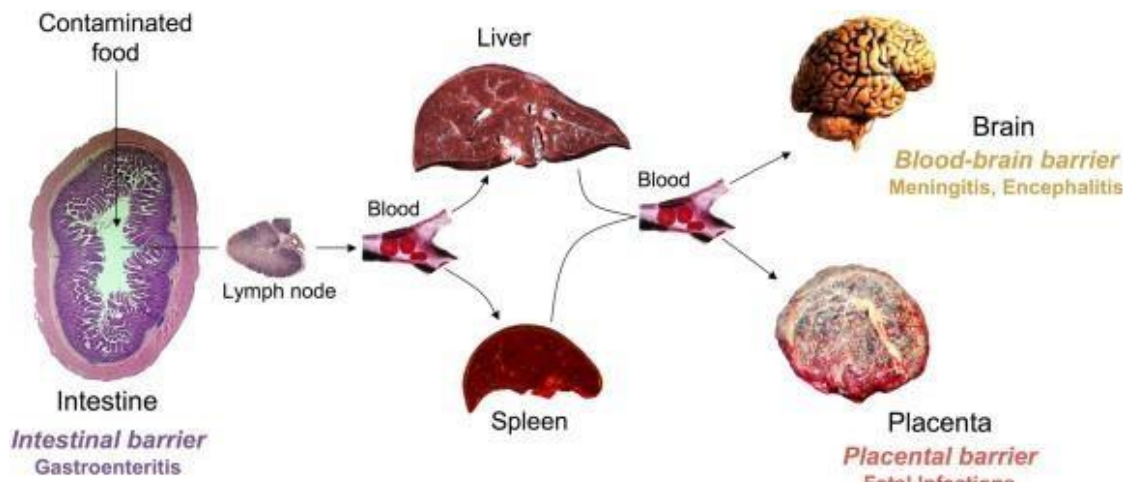
### **1.8.6. Παθογονικότητα- Είσοδος και διασπορά του παθογόνου στον ανθρώπινο οργανισμό**

Η *L. monocytogenes* όντας προαιρετικά ενδοκυτταρικό βακτήριο μπορεί να εισέρχεται, να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται σε φαγοκυτταρικά και μη-φαγοκυτταρικά συστήματα, αλλά και να διηθείται μέσα από τα εντερικά, αιματο-εγκεφαλικά και εμβρυοπλακουντιακά εμπόδια (Cossart & Lecuit, 1998).

Η εισβολή του παθογόνου λαμβάνει χώρα στο λεπτό έντερο, όπου διαπερνώντας τον εντερικό φραγμό, διεισδύει στον εντερικό βλεννογόνο και μέσω της ενεργούς ενδοκύττωσης εισέρχεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα δενδριτικά κύτταρα στις πλάκες του Peyer πιστεύεται ότι είναι τα πρωταρχικά κύτταρα, όπου εισχωρεί και πολλαπλασιάζεται το βακτήριο (Kolb-Maurer et al., 2000). Στη συνέχεια, το παθογόνο προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα, εντός των οποίων μπορεί να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται. Ταυτόχρονα, με την κυκλοφορία του αίματος φθάνει στα επιχώρια λεμφογάγγλια, ενώ η πλειοψηφία των κυττάρων θανατώνονται σύντομα όταν φτάσουν στο ήπαρ και στο σπλήνα (Εικόνα 12).

Ανάλογα με την ανταπόκριση των T-κυττάρων τις πρώτες ημέρες μετά την μόλυνση, μπορεί να ακολουθήσει διασπορά του βακτηρίου μέσω του αίματος στον εγκέφαλο ή, σε περίπτωση εγκυμοσύνης, στον πλακούντα. Συνεπώς, η μόλυνση δεν περιορίζεται στο σημείο της αρχικής εστίας, αλλά ακολουθεί η είσοδος του βακτηρίου και ο πολλαπλασιασμός του σε άλλα κύτταρα και ιστούς, με αποτέλεσμα μια πληθώρα συμπτωμάτων ανάλογα με τους ιστούς και τα όργανα που προσβάλλονται (Swaminathan, 2001).

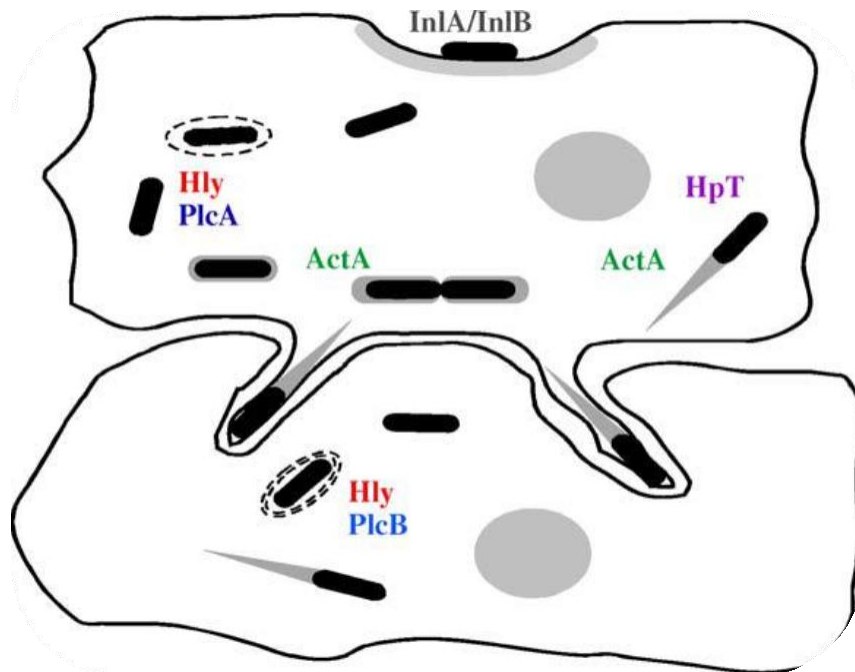




Εικόνα 12: Είσοδος του βακτηρίου *L. monocytogenes* μέσω τροφής στον ανθρώπινο οργανισμό και διασπορά του στα διάφορα όργανα (Lecuit, 2007).

Όσον αφορά στον ενδοκυτταρικό κύκλο ζωής του παθογόνου, ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* προσφύεται και εισέρχεται στα κύτταρα ξενιστές είτε παθητικά με φαγοκύτωση, είτε ενεργητικά μέσω των ιντερναλινών. Τα μακροφάγα κύτταρα προσλαμβάνουν ενεργά το βακτήριο, αλλά η ενδοκύττωσή του από μη φαγοκύτταρα προκαλείται από τον ίδιο τον παθογόνο. Εκτός του σταδίου της ενδοκύττωσης, ο ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής του βακτηρίου σε φαγοκύτταρα και μη, είναι παρόμοιος.

Ύστερα από την είσοδό του εντός του κυττάρου, ο μικροοργανισμός βρίσκεται αρχικά μέσα σε ένα κενοτόπιο, το οποίο όμως λύεται, δίνοντας τη δυνατότητα έτσι στο παθογόνο να διαφύγει μέσα στο κυτταρόπλασμα. Στο κυτταρόπλασμα τα περισσότερα από τα βακτήρια αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται, ενώ εκείνα που παραμένουν εντός των φαγοσωμάτων θανατώνονται και πέπτονται. Παράλληλα με την έναρξη της ενδοκυτταρικής αντιγραφής, το παθογόνο επάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης προς σχηματισμό ουράς στον ένα πόλο του βακτηριακού κυττάρου με σκοπό την κίνηση του βακτηρίου μέσα στο κυτταρόπλασμα. Έπειτα, τα βακτήρια που φτάνουν εσωτερικά στην επιφάνεια του μολυσμένου κυττάρου-ξενιστή επάγουν το σχηματισμό ψευδοποδιών στο ένα άκρο του βακτηρίου, με σκοπό την κίνηση από μολυσμένα κύτταρα σε γειτονικά υγιή κύτταρα. Τέλος, το βακτήριο εισέρχεται στα γειτονικά κύτταρα εντός κενοτοπίου, το οποίο περιβάλλεται από μια διπλή μεμβράνη, η οποία υποβάλλεται σε λύση προς απελευθέρωση του παθογόνου μέσα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή επαναλαμβάνοντας τον ενδοκυτταρικό κύκλο ζωής (Εικόνα 13)(Kuhn & Goebel, 2007).



Εικόνα 13: Ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής της *L. monocytogenes*-Σχηματική απεικόνιση των παραγόντων παθογένειας που εμπλέκονται στη διαδικασία μόλυνσης το κυττάρου (Hain et al., 2006).

### 1.8.7. Χαρακτηριστικά νόσου στον άνθρωπο

Η *L. monocytogenes* μολύνει τους ανθρώπους με την κατάποση μολυσμένων τροφίμων. Είναι σε θέση να διασχίσει το εντερικό φράγμα και θεωρείται ότι διασπείρεται από τους μεσεντερικούς λεμφαδένες προς τη σπλήνα και το ήπαρ. Αν δεν εμποδιστεί από το ανοσοποιητικό σύστημα, κυρίως στο ήπαρ και τη σπλήνα, η μόλυνση από *L. monocytogenes* μπορεί να προκαλέσει παρατεταμένη εμφάνιση ασυμπτωματικής βακτηραιμίας και να φθάσει στον εγκέφαλο ή στον πλακούντα, προκαλώντας μηνιγγίτιδα ή εγκεφαλίτιδα κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, αποβολές σε έγκυες γυναίκες και γενικευμένες λοιμώξεις σε μολυσμένα νεογνά (σηπτική κοκκιωμάτωση του νεογνού).

Η λήψη πολύ μολυσμένων τροφίμων από υγιή άτομα μπορεί να οδηγήσει σε αυτοπεριοριζόμενη εμπύρετη γαστρεντερίτιδα (Wing et al., 2002). Μελέτες του CDC έδειξαν ότι το 11% των δειγμάτων τροφίμων που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια προγραμμάτων παρακολούθησης τροφίμων, ήταν επιμολυσμένα με *L. monocytogenes* και ότι το βακτήριο αναπτύχθηκε από τουλάχιστον ένα δείγμα από ψυγεία του 64% των ασθενών με λιστερίωση (Pinner et al., 1992). Η εντερική φάση της μόλυνσης θεωρούνταν προηγουμένως σχεδόν πάντα κλινικά σιωπηλή. Ωστόσο, αποδείχθηκε ότι θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη συμπτωμάτων κατά την πέψη όπως ναυτία, διάρροια, κοιλιακό άλγος και πυρετό που αντιστοιχούν στη γαστρεντερίτιδα, με ρυθμό επίθεσης έως 70%, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις υψηλού αρχικού πληθυσμού (Aureli et al., 2000; Schlech et al., 1997). Η σημασία του μεγέθους του αρχικού πληθυσμού στην εμφάνιση των εν λόγω πρώιμων κλινικών συμπτωμάτων υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα μελετών σε υγιή ζώα, στα οποία το επίπεδο έπρεπε να είναι υψηλότερο από  $10^9$  κύτταρα /ζώο για την πρόκληση ανιχνεύσιμου κλινικού αποτελέσματος (Farber et al., 1991). Εάν

αυτά τα πεπτικά κλινικά συμπτώματα αντιπροσωπεύουν ως επί το πλείστον τοξικές επιδράσεις του *L. monocytogenes* στον εντερικό ιστό ή/ και τη διέλευση και εισβολή του φραγμού του βλεννογόνου από το βακτήριο, παραμένει άγνωστο. Αυτές οι πεπτικές εκδηλώσεις συνήθως αυτοπεριορίζονται και επιλύονται αυθόρμητα.

Στον πληθυσμό που κινδυνεύει από λιστερίωση, και κυρίως στα ανοσοκατασταλμένα άτομα, τα συμπτώματα αντιπροσωπεύουν γενικευμένη μόλυνση που εμφανίζεται συχνότερα μετά από μια περίοδο επώασης που μπορεί να είναι πολύ μεγάλη (10-70 ημέρες), καθιστώντας έτσι δύσκολη την απομόνωση της πηγής της μόλυνσης σε σποραδικές περιπτώσεις. Η βακτηριαιμία από *L. monocytogenes* μπορεί να είναι υπεύθυνη για μια φλεγμονώδη νόσο όπως η γρίπη, με μυαλγίες, αρθραλγίες, κεφαλαλγία και οσφυαλγία, αλλά μπορεί επίσης να είναι κλινικά σιωπηλή (Goulet & Marchetti, 1996).

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ιδιαίτερα το τρίτο τρίμηνο, όταν η συνδεόμενη με την εγκυμοσύνη ανοσοκαταστολή θεωρείται ότι είναι πιο έντονη, κοινά συμπτώματα κρουολογήματος μπορεί να αντανakλούν μια βακτηριαιμία που σχετίζεται με τη *L. monocytogenes*, και έτσι δικαιολογείται η συνταγογράφηση αμοξικιλίνης σε γυναίκες με εμπύρετες εγκυμοσύνες. Οι ειδικές επιπλοκές της λιστερίωσης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης έγκεινται στην ικανότητα της *L. monocytogenes* να διασχίζει το φράγμα του πλακούντα, οδηγώντας σε φλεγμονή των χοριοκλών φατνωμάτων και αποστήματα του πλακούντα, σε χοριοαμνιονίτιδα και τελικά σε συστηματική μόλυνση του εμβρύου. Η λιστερίωση από τη μητέρα στο έμβρυο είναι υπεύθυνη για πρόωρο τοκετό, θάνατο του εμβρύου, αποβολή και νεογνική μόλυνση με υψηλή θνησιμότητα (Lecuit, 2005). Η γενικευμένη μόλυνση του εμβρύου καλείται επίσης σηπτική κοκκιωμάτωση και χαρακτηρίζεται από την ευρέως διαδεδομένη παρουσία κοκκιωμάτων στο ήπαρ, τη σπλήνα και το δέρμα. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του βακτηρίου *L. monocytogenes* συναντώνται στο έντερο και στους πνεύμονες, η λοίμωξη πιθανότατα ενισχύεται μέσω της κατάποσης μολυσμένου αμνιακού υγρού και όχι μόνο μέσω της διαπλακουντικής μεταφοράς αίματος (Schlech, 2000). Σε περιπτώσεις μόλυνσης του νεογνού κατά τη διάρκεια του τοκετού, παρατηρείται σηψαιμικό σύνδρομο παρόμοιο με εκείνο που προκαλείται από τον *Streptococcus agalactiae*, μερικές φορές συνοδεύεται από πυώδη επιπεφυκίτιδα, διάχυτο εξάνθημα και μηνιγγίτιδα. Συνολικά, το βακτήριο *L. monocytogenes* είναι μία από τις τρεις κύριες αιτίες της μηνιγγίτιδας στα νεογνά (Mylonakis et al., 1998).

Το βακτήριο *L. monocytogenes*, εκτός από την ικανότητά να διασχίζει αρχικά τον εντερικό φραγμό και έπειτα τον πλακούντα στις έγκυες γυναίκες, έχει την ικανότητα να παραβιάζει το φράγμα του εγκεφάλου και να μολύνει το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Η ικανότητά του να προκαλεί μηνιγγίτιδα και παρεγχυματική εγκεφαλική λοίμωξη, διαφοροποιεί το παθογόνο από άλλα είδη βακτηρίων συχνά υπεύθυνα για μηνιγγίτιδα, όπως τα βακτήρια *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* και *Haemophilus influenzae*. Εάν αυτό αντικατοπτρίζει την ικανότητά του παθογόνου να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται ενδοκυτταρικά παραμένει μια ανοιχτή ερώτηση. Μεταξύ όλων των βακτηριακών μηνιγγιτιδών, η μηνιγγίτιδα από *L. monocytogenes* έχει το υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας (22%). Σε πρόσφατη μελέτη, η μηνιγγίτιδα από *L. monocytogenes* αντιπροσώπευε το 11% των βακτηριακών μηνιγγιτιδών και ήταν η δεύτερη πιο συχνή αιτία της μηνιγγίτιδας μετά το βακτήριο *S. pneumoniae* σε ασθενείς άνω των 50 ετών (Lecuit & Cossart, 2001). Τα κλινικά χαρακτηριστικά της μηνιγγίτιδας από *L. monocytogenes* διαφέρουν από εκείνα άλλων βακτηριακών μηνιγγιτιδών, αφού η μηνιγγίτιδα από *L. monocytogenes* μπορεί να έχει υπο-οξεία πορεία και συνδέεται με μη φυσιολογικές κινήσεις, επιληπτικές κρίσεις και αλλοίωση συνείδησης. Η εμφάνιση τέτοιων συμπτωμάτων υποδηλώνει τη μόλυνση του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Δύο διαφορετικοί τύποι διάδοσης στον εγκέφαλο

μπορούν να εμφανισθούν: εγκεφαλίτιδα ή ενδοπαρεγχυματικά εγκεφαλικά αποστήματα (Maezawa et al., 2002; Bartt, 2000). Η εγκεφαλίτιδα συνήθως αφορά ιδιαίτερα το πίσω τμήμα του εγκεφάλου και κλινικά εκδηλώνεται ως ένα μηνιγγιτικό σύνδρομο μαζί με ανεπάρκεια κρανιακών νεύρων, ένα παρεγκεφαλικό σύνδρομο ή ανεπάρκεια ευαισθησίας. Στα δύο τρίτα των περιπτώσεων, οι καλλιέργειες αίματος είναι θετικές, ενώ η εγκεφαλονωτιαία υγρή καλλιέργεια είναι θετική μόνο σε λιγότερο από το μισό των περιπτώσεων. Η εμφάνιση της λοίμωξης του πίσω τμήματος του εγκεφάλου δεν περιορίζεται στους ανοσοκατασταλμένους ξενιστές και μπορεί επίσης να εμφανιστεί και σε υγιείς ενήλικες (Armstrong & Fung, 1993). Σε μικρή αναλογία οι λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος από *L. monocytogenes* (10% εκ του οποίου το ήμισυ είναι ασθενείς με ανοσοκαταστολή) παρατηρούνται μακροσκοπικά αποστήματα στον εγκεφαλο. Τα αποστήματα εγκεφάλου από *L. monocytogenes* βρίσκονται συνήθως σε υποφλοιώδεις περιοχές, θαλάμους, στις γέφυρες του εγκεφάλου ή στο μυελό, και τέτοιες ασυνήθιστες θέσεις υποδηλώνουν τη λιστερίωση (Schlech, 2000). Η εγκεφαλίτιδα και τα παρεγχυματικά αποστήματα σχετίζονται με υψηλά ποσοστά νευρολογικών επιπτώσεων και θνησιμότητας (Mylonakis et al., 1998).

Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας από *L. monocytogenes*, που αντιστοιχούν σε λιγότερο από το 10% όλων των μολύνσεων από *L. monocytogenes* και εμφανίζονται σε ασθενείς με κίνδυνο εμφάνισης ενδοκαρδίτιδας. Λοιμώξεις σε σπάνιες εντοπισμένες θέσεις σε ασθενείς που κινδυνεύουν από λιστερίωση έχουν αναφερθεί και περιλαμβάνουν λοιμώξεις που οφείλονται στον άμεσο εμβολιασμό (επιπεφυκίτιδα, δερματική λοίμωξη ή λεμφαδενίτιδα), σε κατάποση (περιτονίτιδα ή χολοκυστίτιδα) ή σε μετάγγιση αίματος (μακροσκοπικά αποστήματα σε ήπαρ και σπλήνα, πλευροπνευμονική μόλυνση, λοίμωξη στις αρθρώσεις και οστεομυελίτιδα, περικαρδίτιδα, μυοκαρδίτιδα, αρτηρίτιδα ή ενδοφθαλμίτιδα) (Lecuit & Cossart, 2001).

### 1.8.8. Νομοθεσία

Ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 καθιερώνει μικροβιολογικά κριτήρια σε τρόφιμα. Για το βακτήριο *L. monocytogenes* στην κατηγορία των βρεφικών τροφών και των τροφών ειδικής χρήσης θα πρέπει να υπάρχει απουσία του μικροοργανισμού σε 25 g προϊόντος στα σημεία πώλησης και καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Όσον αφορά στα έτοιμα για κατανάλωση τρόφιμα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του συγκεκριμένου βακτηρίου, υπάρχουν δύο μικροβιολογικά όρια: (i) 100 CFU/ g προϊόντος στα σημεία πώλησης και καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του προϊόντος, (ii) απουσία στα 25 g του προϊόντος πριν το τρόφιμο απομακρυνθεί από τον άμεσο έλεγχο του υπευθύνου της επιχείρησης τροφίμων, ο οποίος το έχει παράγει. Η εφαρμογή είτε του πρώτου είτε του δεύτερου κριτηρίου εξαρτάται από το αν ο κατασκευαστής είναι σε θέση να αποδείξει ότι το επίπεδο του *L. monocytogenes* στο προϊόν του δεν θα υπερβαίνει τα 100 CFU/ g σε όλη την διάρκεια ζωής του στο ράφι. Η απόδειξη αυτή πρέπει να βασίζεται στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του προϊόντος με τη διαβούλευση της επιστημονικής βιβλιογραφίας, όταν είναι απαραίτητο, ή μέσω ποσοτικών μοντέλων ή δοκιμών προσομοιώσεων. Επίσης σε τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του *L. monocytogenes*, υπάρχει όριο 100 CFU/ g στα σημεία πώλησης και καθόλη τη διάρκεια ζωής του προϊόντος.

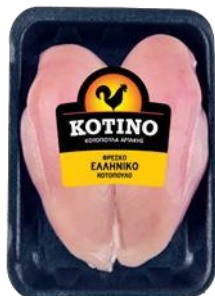
## 2. Σκοπός

Τα βασικά αντικείμενα της παρούσας μελέτης ήταν δύο, και εξετάστηκαν στα πλαίσια δύο διακριτών πειραματικών ενότητων, με κοινό σημείο αναφοράς την πρώτη ύλη των προϊόντων τροφίμων που εξετάστηκαν, το κρέας κοτόπουλου. Ο στόχος της πρώτης πειραματικής ενότητας ήταν η συσχέτιση μικροβιολογικών και φασματικών δεδομένων που προκύπτουν από τη σύγχρονη μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης, προκειμένου να γίνει ανάπτυξη μοντέλου μηχανικής εκμάθησης για την ταχεία εκτίμηση της μικροβιολογικής αλλοίωσης σε φιλέτο στήθους κοτόπουλου. Ο στόχος της δεύτερης πειραματικής ενότητας ήταν η αξιολόγηση και ο χαρακτηρισμός της κινητικής συμπεριφοράς της ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes*, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας συντήρησης σε κοτομπουκιές.

### 3. Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1. Πειραματική ενότητα 1: Εκτίμηση της μικροβιολογικής αλλοίωσης φιλέτου στήθους κοτόπουλου με τη μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης

Συσκευασμένα (υπό αερόβιες συνθήκες) δείγματα νωπού φιλέτου στήθους κοτόπουλου, χωρίς κόκαλα και δέρμα, προμηθεύτηκαν από την KOTINO A.E.B.E. (Εικόνα 14) και τοποθετήθηκαν σε θαλάμους συντήρησης (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan) με θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15 °C. Γινόταν παρακολούθηση της θερμοκρασίας με χρήση ηλεκτρονικών καταγραφικών (COX TRACER®, Cox Technologies Inc., Belmont, NC, USA) που είχαν τοποθετηθεί στο εσωτερικό των θαλάμων συντήρησης. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (Πίνακας 8), δύο δείγματα λαμβανόντουσαν από κάθε θάλαμο, ούτως ώστε να μελετηθεί το μικροβιακό φορτίο τους με τις κλασσικές μεθόδους μικροβιολογικής ανάλυσης καθώς και με σύγχρονη φασματοσκοπική μέθοδο (πολυφασματική απεικόνιση χρησιμοποιώντας το σύστημα VideometerLab). Στο χρόνο μηδέν, πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση σε δύο τυχαία δείγματα, εφαρμόστηκε η μέθοδος της πολυφασματικής απεικόνισης και μετρήθηκε το pH. Σε διαφορετικό χρόνο διεξάχθηκε αντίστοιχο πείραμα στο οποίο η συντήρηση των δειγμάτων έγινε σε θαλάμους με θερμοκρασίες 20, 25, 30 και 35 °C.



Εικόνα 14: Συσκευασμένο φιλέτο στήθους κοτόπουλου της εταιρείας KOTINO A.E.B.E.

#### 3.1.1. Πειραματική διαδικασία

##### 3.1.1.1. Μικροβιολογική ανάλυση

Η μικροβιακή ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια άλλης μελέτης του εργαστηρίου. Παρόλα αυτά, κρίνεται απαραίτητο να σημειωθεί ότι όπως και για την ανάλυση των δειγμάτων με Videometer, έτσι και για τις μικροβιολογικές αναλύσεις γινόταν παραλαβή δύο δειγμάτων (συσκευασμένα φιλέτα στήθους κοτόπουλου) από κάθε θερμοκρασία συντήρησης ανά τακτά χρονικά διαστήματα (Πίνακας 8). Επίσης, πρέπει να τονιστεί ότι η λήψη των δειγμάτων έγινε με τέτοιο τρόπο, ώστε τελικά να προσδιοριστεί το μέγεθος του μικροβιακού πληθυσμού της OMX ή των βακτηρίων *Pseudomonas* ανά μονάδα επιφάνειας (log (CFU/ cm<sup>2</sup>)).

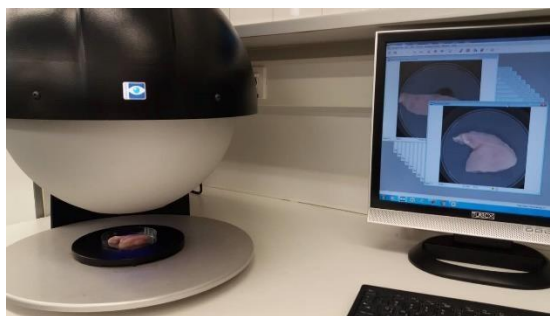
Πίνακας 8: Πρόγραμμα δειγματοληγιών.

Χρόνος (h)	Θερμοκρασία Συντήρησης							
	0 °C	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
0			×				×	
4						×	×	×
6					×			×
8						×	×	×
10					×			×
12						×	×	×
14	×	×	×	×	×	×		×
24	×	×	×	×	×	×	×	×
28							×	×
32					×	×	×	
36							×	×
38	×	×	×	×				
48	×	×	×	×	×	×	×	
56					×	×		
62	×	×	×	×				
72	×	×	×	×	×	×		
86	×	×	×	×				
96					×			
110	×	×	×	×				
120					×			
134	×	×	×	×				
144					×			
158	×	×	×	×				
182	×	×	×					
206	×	×	×					
230	×	×	×					
254	×	×						
278	×	×						
302	×	×						
326	×	×						
350		×						
374	×							
470	×							
518	×							

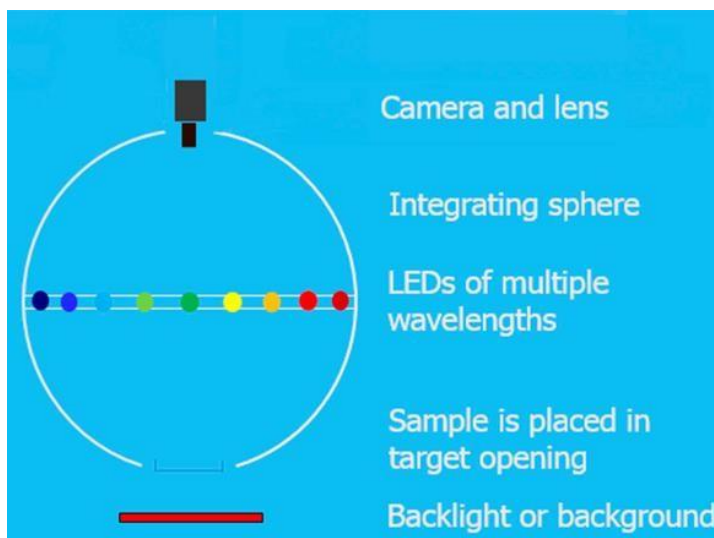
### 3.1.1.3. Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (MultiSpectral Imaging, MSI)

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης είναι το σύστημα VideometerLab της Videometer A/S (Carstensen and Hansen, 2003) (Εικόνα 15). Αποτελείται από μία τυπική μονοχρωματική συσκευή συζευγμένου φορτίου (charge coupled device chip, CCD chip), η οποία είναι τοποθετημένη μέσα σε μία κάμερα τύπου Point Grey

Scorpiion στην οροφή μίας σφαίρας Ulbricht με εσωτερική ματ επίστρωση, προκειμένου να εξασφαλίζεται η ομοιογενής ανάκλαση του φωτός, περιμετρικά της οποίας είναι τοποθετημένες αντιδιαμετρικά και με ομοιόμορφη κατανομή δίοδοι εκπομπής φωτός (Light emitting diodes, LEDs) (Εικόνα 16). Τα LED παρέχουν φωτισμό διαδοχικά στα ακόλουθα 18 μήκη κύματος: 405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 780, 850, 870, 940 και 970 nm (Carstensen & Hansen, 2003; Panagou et al., 2014) και η ανάκλαση του συγκεκριμένου μήκους κύματος καταγράφεται από την κάμερα μέσα στην σφαίρα. Τα δεδομένα που προκύπτουν είναι μία μονοχρωματική εικόνα με 32-bit ακρίβεια για κάθε τύπο LED, καταλήγοντας σε έναν υπερφασματικό κύβο με διαστάσεις 1280×960×19 (Dissing et al., 2013; Tsakanikas et al., 2015).



Εικόνα 15: Σύστημα VideometerLab της Videometer A/S (Carstensen and Hansen, 2003).



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση του εσωτερικού της σφαίρας του συστήματος VideometerLab ([www.videometer.com](http://www.videometer.com))

Πριν την χρήση του VideometerLab για την καταγραφή πολυφασματικών εικόνων, είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται light set up με στόχο την προετοιμασία των δίοδων εκπομπής φωτός με βάση τον τύπο του αντικειμένου προς απεικόνιση. Ειδικότερα, κατά την πρώτη χρήση του VideometerLab για το συγκεκριμένο αντικείμενο δημιουργείται ένα αρχείο με την πρώτη απεικόνιση του αντικειμένου (διαδικασία του autolight), το οποίο ανακαλείται κατά το light set up. Μετά την διαδικασία του light set up, το όργανο πρέπει να βαθμονομείται με απόλυτη



ανάκλαση χρησιμοποιώντας μία ανοιχτόχρωμη και μία σκουρόχρωμη πλάκα αναφοράς και ευθυγραμμίζεται γεωμετρικά με μία διάστικτη πλάκα. Με τις παραπάνω διαδικασίες διασφαλίζεται ένα μέσο δυναμικό εύρος φωτός και ελαχιστοποιούνται φαινόμενα όπως οι σκιές, η παραμόρφωση των ειδώλων κ.α. (Panagou et al., 2014).

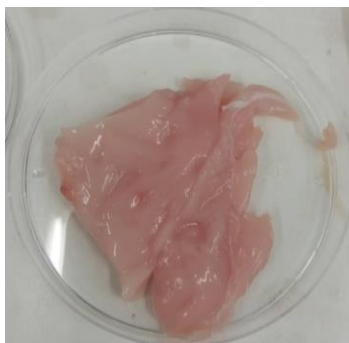
Στις απεικονίσεις που προκύπτουν περιλαμβάνονται και πληροφορίες που δε σχετίζονται με την ανάλυση του δείγματος, όπως το τρυβλίο Petri και ο περιβάλλον χώρος του, καθώς και το λίπος ή ο συνδετικός ιστός του κρέατος κοτόπουλου (Εικόνα 17). Με στόχο τη διασφάλιση της μη παρέμβασης αυτών των μη σχετικών (με τη μικροβιολογική αλλοίωση) πληροφοριών στην ανάλυση και την απομόνωση του προς εξέταση δείγματος (main region of interest, ROI), πραγματοποιείται ένα στάδιο προεπεξεργασίας (Ropodi et al., 2013; Tsakanikas et al., 2015). Η προεπεξεργασία πραγματοποιείται με μεγιστοποίηση της αντίθεσης μεταξύ του δείγματος (ιστός κρέατος κοτόπουλου) και των άλλων μη σχετικών αντικειμένων, επιτρέποντας έτσι μια λειτουργία κατωφλίου (Daugaard et al., 2010). Η επεξεργασία αυτή πραγματοποιείται από το λογισμικό πρόγραμμα του VideometerLab (VideometerLab version 2.12.39, Videometer A/S, Denmark) και η αρχή στην οποία βασίζεται είναι η κανονική διακριτική ανάλυση (Canonical Discriminal Analysis, CDA). Η μέθοδος ανάλυσης αυτή, διαχωρίζει τις απεικονίσεις με βάση τις περιοχές ενδιαφέροντος και ουσιαστικά προσδιορίζει το μέγιστο δυνατό διαχωρισμό δύο ή περισσότερων κλάσεων σύμφωνα με τον αριθμό των ανεξάρτητων μεταβλητών (Εξίσωση 1) (Daugaard et al., 2010).

$$R(a) = \frac{\alpha^T \Sigma_S}{\alpha} \quad (\text{Εξίσωση 1}) \quad (\text{Carstensen et al., 2009})$$

Όπου:  $\frac{\alpha^T \Sigma_N}{\alpha}$

$\Sigma_S = A$  η διασπορά μεταξύ των κλάσεων,

$\Sigma_N = W$  η διασπορά μέσα στις κλάσεις .



Εικόνα 17: Δείγμα σε τρυβλίο προς ανάλυση με πολυφασματική απεικόνιση (MSI).

Μετά τον διαχωρισμό αυτό, υπολογίζεται για κάθε εικόνα η μέση φασματοσκοπική ανάκλαση σε κάθε μήκος κύματος, όπως αυτή προκύπτει από τον υπολογισμό του μέσου όρου έντασης των εικονοστοιχείων (pixels) της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI). Παράλληλα, υπολογίζεται και η τυπική απόκλιση της έντασης των εικονοστοιχείων ανά μήκος κύματος. Τα τελικά δεδομένα που προκύπτουν από τους δύο παραπάνω υπολογισμούς είναι 18 μέσοι όροι ανάκλασης, 18 τυπικές αποκλίσεις ανάκλασης και τα αντίστοιχα 18 μήκη κύματος (Estelles-Lopez et al., 2017), τα οποία χρησιμοποιούνται για την κατασκευή μοντέλων μηχανικής εκμάθησης.

### 3.1.2. Στατιστική ανάλυση- Ποσοτικός προσδιορισμός αλλοίωσης

Για τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης του μικροβιακού πληθυσμού με βάση τα δεδομένα που λήφθηκαν από τις πολυφασματικές εικόνες, έγινε παλινδρόμηση με χρήση της μεθόδου των μερικών ελαχιστών τετραγώνων (Partial Least Squares Regression, PLSR). Η μέθοδος αυτή συσχετίζει τα δεδομένα από δύο σύνολα δεδομένων X (ανεξάρτητες μεταβλητές) και Y (μεταβλητές απόκρισης, εξαρτημένες), με ένα γραμμικό πολυπαραγοντικό μοντέλο. Πιο συγκεκριμένα, βρίσκει ένα νέο σύνολο-χώρο ανεξάρτητων και εξαρτημένων μεταβλητών (X-scores), με ορθογώνια διάταξη, καθώς και ορίζει έναν αριθμό κύριων συνιστωσών (Latent variables, LVs) για τον νέο χώρο αυτό (Wold et al., 2001; Romia & Bernardez, 2009; Panagou et al., 2014). Με στόχο την απαλλαγή από τις πολυάριθμες και συσχετιζόμενες ανεξάρτητες μεταβλητές που συνεπάγονται το overfitting, κάθε λογισμικό PLSRS δίνει τη δυνατότητα εκπαίδευσης του μοντέλου και της πρόβλεψης της σημαντικότητας κάθε παράγοντα, τη διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation). Μέσω της διασταυρούμενης επικύρωσης, γίνεται διάκριση των δεδομένων σε κάποιες ομάδες, από τις οποίες μετά από διαδοχική χρήση δημιουργούνται μοντέλα με τα δεδομένα που απομένουν. Ύστερα από τη δημιουργία ενός μοντέλου, καταμετρώνται οι διαφορές μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της μεταβλητής Y. Το άθροισμα των τετραγώνων αυτών των διαφορών δίνει μια εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης του μοντέλου. Είναι αναγκαίο να πραγματοποιείται επικύρωση κάθε μοντέλου πριν τη χρήση του για πρόβλεψη του μικροβιακού πληθυσμού. Αυτό ιδανικά θα πρέπει να γίνεται με ανεξάρτητα, αντιπροσωπευτικά δείγματα, εφόσον αυτά υπάρχουν. Ειδικότερα, υπάρχει δυνατότητα επανεκτίμησης του μοντέλου μετά από τυχαιοποίηση των δεδομένων (Wold et al., 2001).

Έγινε επιλογή της συγκεκριμένης μεθόδου, καθώς επιτρέπει την ανάλυση δεδομένων με πολλές ανεξάρτητες μεταβλητές X και με πολύ «θόρυβο» (Wold et al., 2001; Abdi, 2003). Επιπλέον, η PLSR ξεχωρίζει από τις άλλες μεθόδους στατιστικής ανάλυσης, αφού με τη χρήση της διατηρείται η ασυμμετρία μεταξύ των προβλεπόμενων και των εξαρτημένων μεταβλητών (Abdi, 2003).

Για την εφαρμογή της PLSR, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα The Unscrambler© ver.9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Norway) και κατασκευάστηκαν μοντέλα για την ανάπτυξη της OMX και των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* υπό αερόβιες συνθήκες συσκευασίας με διαφορετική προ-επεξεργασία των πρωτογενών δεδομένων (18 Mean και 18 SD), όπως αυτά προκύπτουν από το Videometer-Lab version 2.12.39 (Videometer A/S, Denmark).

Το μοντέλο που εξάγεται εφαρμόζοντας PLSR μπορεί να περιγραφεί από μία εξίσωση που έχει τη μορφή:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + \dots + B_iX_i + \varepsilon_j \text{ (Εξίσωση 2)}$$

Όπου:

$B_1, B_2, \dots, B_i$ , οι συντελεστές παλινδρόμησης είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους και εκφράζουν την αναμενόμενη μεταβολή της μεταβλητής  $Y_i$ , όταν η  $X_i$  μεταβληθεί κατά μία μονάδα και οι υπόλοιπες μεταβλητές X παραμένουν σταθερές.

$B_0$ , ο σταθερός όρος (τιμή του Y για  $X=0$ )

$\varepsilon_j$ , το σφάλμα που αντιστοιχεί στη διαφορά της τιμής που προβλέπεται από την ευθεία παλινδρόμησης για το δείγμα i και της πραγματικής τιμής που έχει το συγκεκριμένο δείγμα.

Για το μοντέλο της ανάπτυξης της OMX, ως δείγματα (n=190) για την ανάπτυξη (calibration) και την επικύρωση (cross-validation), θεωρήθηκαν αυτά που συντηρήθηκαν στους 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 και 35 °C (δύο δείγματα για κάθε χρόνο δειγματοληψίας). Επίσης, ως X μεταβλητές ορίστηκαν τα δεδομένα (n=36), των μέσων όρων και των τυπικών αποκλίσεων, από τα 18 φάσματα, αφού πρώτα έγινε προεπεξεργασία τους με “weighting”, δηλαδή διαίρεση με την τυπική απόκλιση τους (SD). Αυτή η προεπεξεργασία που ονομάζεται και τυποποίηση, χρησιμοποιείται για να δώσει σε όλες τις μεταβλητές την ίδια διακύμανση. Έτσι δίνεται σε όλες τις μεταβλητές η ίδια πιθανότητα να επηρεάσουν την εκτίμηση των συνιστωσών (CAMO Software AS, 2016). Ως Y μεταβλητές (n=1) ορίστηκαν τα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX.

Για το μοντέλο της ανάπτυξης των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*, τα δείγματα (n=190) για την ανάπτυξη (calibration) και την επικύρωση (cross-validation) ήταν όσα συντηρήθηκαν στους 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 και 35 °C (δύο δείγματα για κάθε χρόνο δειγματοληψίας). Οι μεταβλητές X που επιλέχθηκαν, σε αυτή την περίπτωση ήταν τα δεδομένα (n=36) των μέσων όρων και των τυπικών αποκλίσεων από τα 18 φάσματα, αφού πρώτα αυτά μετασχηματίστηκαν με τον μετασχηματισμό τυπικής κανονικής μεταβλητής (Standard Normal Variate, SNV) (Εξίσωση 3). Ο μετασχηματισμός αυτός χρησιμοποιείται συχνά σε φασματοσκοπικά δεδομένα, επειδή μειώνει την αλληλοεπικάλυψη των πληροφοριών μεταξύ των φασμάτων και ελαχιστοποιεί τον «θόρυβο» (Σπυρέλλη, 2018; Tsakanikas et al., 2016). Ως Y μεταβλητές (n=1) θεωρήθηκαν τα αντίστοιχα μικροβιολογικά δεδομένα για τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*.

$$S_i - \frac{S_i - S}{S} \quad (\text{Εξίσωση 3}) \quad (\text{Tsakanikas et al., 2016})$$

Όπου:

S το σύνολο των εικονοστοιχείων (pixels) για τα φάσματα (pixel-wise spectra),

S<sub>i</sub> η πληροφορία του συγκεκριμένου φάσματος και

$\frac{S_i - S}{S}$  η πληροφορία του μετασχηματισμένου φάσματος.

Για τα μοντέλα προσδιορισμού της OMX με την μέθοδο PLSR, υπολογίστηκαν και λήφθηκαν υπόψη, η ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος ανάπτυξης (Root Mean Square Error, RMSE<sub>C</sub>), επικύρωσης (RMSE<sub>V</sub>) (Romia & Bernardez, 2009; Bi et al., 2016), και οι συντελεστές συσχέτισης για την ανάπτυξη r<sub>c</sub> (correlation coefficient in calibration) και επικύρωση (r<sub>v</sub>) (Dissing et al., 2013; Panagou et al., 2014; Ropodi et al., 2016). Οι παράγοντες συσχέτισης r και το RMSE υπολογίζονται αυτόματα κατά την εφαρμογή των λογισμικών που χρησιμοποιήθηκαν. Όταν r = ±1, η σχέση μεταξύ των ανεξάρτητων και των εξαρτημένων μεταβλητών είναι αιτιοκρατική και όχι πιθανοκρατική, καθώς γνωρίζοντας την τιμή της μίας μεταβλητής γνωρίζουμε και την τιμή της άλλης. Όταν το r είναι κοντά στο ±1, τότε η γραμμική συσχέτιση των δύο μεταβλητών είναι ισχυρή, ενώ όταν είναι κοντά στο 0 οι μεταβλητές είναι μη συσχετιζόμενες.

### 3.2. Πειραματική ενότητα 2: Αξιολόγηση και χαρακτηρισμός της ανάπτυξης *L. monocytogenes* σε κοτομπουκιές

Για την μελέτη της ανάπτυξης του βακτηρίου *L. monocytogenes* ως συνάρτηση της θερμοκρασίας σε κοτομπουκιές, χρησιμοποιήθηκε προϊόν μαριναρισμένου, παναρισμένου και προψημένου φιλέτου στήθους κοτόπουλου της εταιρείας KOTINO A.E.B.E. (Εικόνα 18). Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των δειγμάτων με έξι στελέχη του παθογόνου, και αερόβια συντήρησή τους σε τέσσερις διαφορετικές ισόθερμες συνθήκες: 4, 8, 12 και 16 °C. Λίγα μη ενοφθαλμισμένα δείγματα κοτομπουκιών συντηρήθηκαν επίσης στις παραπάνω ισόθερμες συνθήκες, ώστε να υπόκεινται σε μικροβιολογικές αναλύσεις και να επιβεβαιώνεται σε αυτά η απουσία *L. monocytogenes*. Στα μη ενοφθαλμισμένα δείγματα γινόταν παράλληλα μικροβιολογικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό της OMX και των ζυμών και μυκήτων. Ωστόσο, αυτές οι μικροβιολογικές αναλύσεις δεν αποτελούν αντικείμενο της παρούσας μελέτης (Παράρτημα). Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (Πίνακας 9), δύο δείγματα από κάθε θερμοκρασία αναλύονταν μικροβιολογικά για την καταμέτρηση της μικροχλωρίδας (OMX) καθώς και του βακτηρίου *L. monocytogenes*. Σε λίγους χρόνους και για κάθε θερμοκρασία συντήρησης, έγιναν και μικροβιολογικές αναλύσεις για την καταμέτρηση ζυμών και μυκήτων, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η υπόθεση για ύπαρξη μεγάλων πληθυσμών τους στις ενοφθαλμισμένες με *L. monocytogenes* κοτομπουκιές. Αυτή η υπόθεση γεννήθηκε μέσω της παρατήρησης αποτελεσμάτων μικροβιολογικών αναλύσεων σε μη ενοφθαλμισμένες κοτομπουκιές (Παράρτημα). Συλλέχθηκαν δεδομένα από δύο ανεξάρτητα πειράματα, όπου τόσο το εμβόλιο όσο και οι παρτίδες των κοτομπουκιών ήταν διαφορετικές. Εν συνεχεία, έγινε επεξεργασία των μικροβιολογικών δεδομένων για την OMX και το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes* από τα δύο πειράματα και αναπτύχθηκαν πρωτογενή και δευτερογενή μοντέλα για την περιγραφή της ανάπτυξης του παθογόνου ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Για την επικύρωση (external validation) του μοντέλου που προέκυψε, έλαβαν χώρα δύο ανεξάρτητα πειράματα εμβολιασμού και συντήρησης των κοτομπουκιών υπό αερόβιες συνθήκες σε δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ (εναλλαγή θερμοκρασίας ανά 8ώρο, από 4 °C σε 8 °C και σε 12 °C).



Εικόνα 18: Συσκευασμένες παναρισμένες και προψημένες κοτομπουκιές από φιλέτο στήθος κοτόπουλου, της εταιρείας KOTINO A.E.B.E.

### 3.2.1. Σύνθεση κοτομπουκιών

- Φιλέτο κοτόπουλου 80%: φιλέτο κοτόπουλου (85%), νερό, αλάτι, καρυκεύματα, πρωτεΐνη σόγιας, άμυλο πατάτας, πρωτεΐνες γάλακτος, ορός γάλακτος, καρυκεύματα με σιτάρι, αρωματικές ύλες με μουστάρδα, αρωματικές ύλες, εκχύλισμα μαγιάς
- Πανάρισμα 20%: νερό, άμυλο σίτου, άμυλο αραβοσίτου, τροποποιημένο άμυλο σίτου, αλάτι, πρωτεΐνη σόγιας, λιπαρά σόγιας, αυγό σε σκόνη, διογκωτικά (ανθρακικό νάτριο, διφωσφορικό δινάτριο)

### 3.2.2. Στελέχη *L. monocytogenes*

Τα στελέχη του βακτηρίου *L. monocytogenes* που επιλέχθηκαν από την τράπεζα μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων (EMBT, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Σχολή Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών) για τον ενοφθαλμισμό των δειγμάτων ήταν τα ακόλουθα:

- 1) B-124 (κλινική απομόνωση/ ορότυπος 4b),
- 2) B-125 (κλινική απομόνωση/ ορότυπος 4b) (Chorianopoulos et al., 2008),
- 3) B-127 (απομόνωση από σαλάτα με κοτόπουλο),
- 4) B-129 (απομόνωση από κατεψυγμένο γεύμα με βάση κιμά κρέατος),
- 5) B-131 (περιβαλλοντική απομόνωση από ιμάντα μεταφοράς για κατεψυγμένα τρόφιμα),
- 6) B-157 (περιβαλλοντική απομόνωση από εργοστάσιο επεξεργασίας τροφίμων) (Cocolin et al., 2005)

### 3.2.3. Καλλιέργεια στελεχών *L. monocytogenes*

Για τη δημιουργία του εμβολίου, απαραίτητη είναι η διασφάλιση «καθαρών» ανανεωμένων καλλιεργειών των επιλεγμένων στελεχών του παθογόνου από τις αποθηκευμένες stock καλλιέργειες (-80° C). Για τον σκοπό αυτό, από την τράπεζα των μικροοργανισμών του EMBT αναπτύχθηκαν καλλιέργειες από κάθε στέλεχος με τον εξής τρόπο:

Έγινε ανάπτυξη σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptic Soy Broth (TSB, Biolife) (24 h, 37 °C).

Έπειτα, έγινε μεταφορά και ανάπτυξη σε στερεό υπόστρωμα Tryptic Soy Agar (TSA, Biolife) (24 h, 37 °C) και έλεγχος και επιβεβαίωση της καθαρότητας.

Ακολούθησε διασπορά (streaking) από μία αποικία και ανάπτυξη σε μη επιλεκτικό υπόστρωμα TSA (24 h, 37 °C).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε συλλογή και μεταφορά βιομάζας κάθε στελέχους υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου σε υγρό υπόστρωμα TSB με 20 % v/v γλυκερόλη.

Τελικά, έγινε αποθήκευση των καθαρών καλλιεργειών εργασίας (working cultures) στους -20 °C.

## 3.2.4. Πειραματική Διαδικασία

### 3.2.4.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Πριν τον ενοφθαλμισμό, τα δείγματα ζυγίστηκαν σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας  $\pm 0,001$  (BEL ENGINEERING, EiB, Italy) υπό ασηπτικές συνθήκες, προκειμένου να γίνει διαλογή και να επιλεχθούν μόνο οι κοτομπουκιές που ζυγίζουν  $\sim 30$  g.

Ακολούθησε εναπόθεση των δειγμάτων υπό ασηπτικές συνθήκες σε περιέκτη που έχει καθαριστεί με 100% διάλυμα αλκοόλης.

### 3.2.4.2. Προετοιμασία εμβολίου

Εκ των καθαρών καλλιιεργειών που είχαν αποθηκευτεί στους  $-20$  °C και με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου, υπό ασηπτικές συνθήκες έγινε διασπορά και ανάπτυξη σε μη επιλεκτικό υπόστρωμα TSA και επώαση (24 h, 37 °C).

Στη συνέχεια, έγινε μεταφορά μίας αποικίας του κάθε στελέχους σε 10 ml υγρού θρεπτικού υπόστρωματος TSB και επώαση (24 h, 37 °C).

Μεταφέρθηκε 1 ml επωασμένου TSB σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα 9 ml TSB και ακολούθησε επώαση (18 h, 37 °C). Γνωρίζουμε από μικροβιολογικές αναλύσεις που έγιναν για τα έξι στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, ότι στις δεδομένες συνθήκες επώασης φθάνουν στη στατική φάση και αγγίζουν πληθυσμούς  $10^8$ - $10^9$  CFU/ml.

Πραγματοποιήθηκε καλή ανάδευση (vortex) των δοκιμαστικών σωλήνων με τα επωασμένα στελέχη και ανάμιξή τους υπό ασηπτικές συνθήκες (τελικός όγκος: 60 ml).

Ακολούθησε φυγοκέντρηση (6000 rpm, 20 min, 4 °C) για το διαχωρισμό της βακτηριακής βιομάζας από το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, χρησιμοποιώντας ψυχόμενη φυγόκεντρο (Heraus Multifuge 1S-R, Thermo Electron Corporation, Langensfeld, Germany).

Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, πραγματοποιήθηκε πλύση των βακτηριακών κυττάρων. Ειδικότερα, έγινε επαναιώρηση των βακτηριακών κυττάρων σε ίδιο όγκο Ringer (60 ml).

Επαναλήφθηκε μία ακόμη φυγοκέντρηση και πλύση των κυττάρων όπως προηγουμένως.

Για την συγκεκριμένη μελέτη, επιλέχθηκε ο πληθυσμός του εμβολίου στο προϊόν να είναι ίσος με 10-100 CFU/g. Λόγω του ότι το βάρος της κάθε κοτομπουκιάς ήταν ίσο με  $\sim 30$  g, κάθε κοτομπουκιά ενοφθαλμίστηκε με  $\sim 3 \cdot 10^3$  CFU *L. monocytogenes*. Για τον σκοπό αυτό, έγινε αραιώση του αρχικού εμβολίου έως την  $10^{-4}$  αραιώση και παραλαβή 300 μl για τον ενοφθαλμισμό της κάθε κοτομπουκιάς.

### 3.2.4.3. Εμβολιασμός των δειγμάτων

Έλαβε χώρα ενοφθαλμισμός της άνω επιφάνειας κάθε κοτομπουκιάς με 150 μl της  $10^{-4}$  αραιώσης του εμβολίου, με τη βοήθεια πιπέτας και με τέτοιο τρόπο, ώστε ο όγκος του εμβολίου να ισομοιραστεί κατά προσέγγιση σε όλη την επιφάνεια (tipping) (Εικόνα 19). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής (Telstar Bio II-Advance 4, AZBIL 25 TELSTAR Technologies S.L.U., Spain).

Έπειτα, έγινε κάλυψη των ταμιών με τα εμβολιασμένα δείγματα με αλουμινόφυλλο απολυμασμένο με διάλυμα 100% αιθανόλης και τοποθέτηση σε επωαστικό κλίβανο (10

min, 4°C), προκειμένου να γίνει προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων στην επιφάνεια των δειγμάτων που έγινε ο ενοφθαλμισμός.

Ύστερα, έγινε ανατροπή των κοτομπουκιών, έτσι ώστε να ενοφθαλμιστεί και η κάτω επιφάνειά τους.

Πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός της πρώην κάτω επιφάνειας κάθε κοτομπουκιάς και επώαση με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω.



Εικόνα 19: Ενοφθαλμισμός κοτομπουκιών με τη βοήθεια πιπέτας (tipping).

#### 3.2.4.4. Συσκευασία των δειγμάτων

Οι ενοφθαλμισμένες κοτομπουκιές τοποθετήθηκαν ανά δύο σε δίσκους πολυστυρενίου, οι οποίοι συσκευάστηκαν με διάφανη μεμβράνη πολυαιθυλενίου, οικιακής χρήσης, διαπερατή στο O<sub>2</sub> (Εικόνα 20), κάτω από ασηπτικές συνθήκες και τοποθετήθηκαν στους αντίστοιχους θαλάμους συντήρησης (MIR-153, Sanyo Electric Co.). Η παρακολούθηση της θερμοκρασίας στο εσωτερικό των θαλάμων συντήρησης έγινε με χρήση ηλεκτρονικών καταγραφών (COX TRACER®).



Εικόνα 20: Ενοφθαλμισμένες κοτομπουκιές τοποθετημένες ανά δύο σε δίσκους πολυστυρενίου και συσκευασμένες με διάφανη μεμβράνη πολυαιθυλενίου οικιακής χρήσης διαπερατή στο O<sub>2</sub>.

#### 3.2.4.5. Μικροβιολογικές αναλύσεις

Λήψη δείγματος (κοτομπουκιά ~30 g) υπό ασηπτικές συνθήκες και τοποθέτηση σε ειδική σακούλα ομογενοποίησης (BagLight®, INTERSCIENCE, France) ανά τακτά καθορισμένα χρονικά διαστήματα (Πίνακας 9).

Προσθήκη ~270 ml αλατούχου διαλύματος Ringer.

Τοποθέτηση της σακούλας σε Stomacher και ομογενοποίηση για 60 sec.

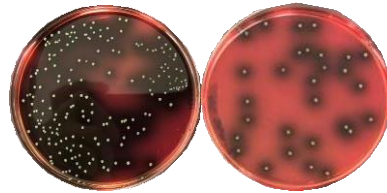
Πραγματοποίηση διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων σε διάλυμα Ringer.

Εμβολιασμός των τρυβλίων με στερεά θρεπτικά υποστρώματα με 100 μl καταλλήλως αραιωμένου δείγματος με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης.

Το υπόστρωμα TSA χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της OMX, μετά από επώαση των τρυβλίων στους 30 °C για 3 ημέρες.

Το υπόστρωμα Listeria Palcam Agar Base (Biolife) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του πληθυσμού του βακτηρίου *L. monocytogenes*, μετά από επώαση των τρυβλίων στους 30 °C για 2 ημέρες (Εικόνα 21).

Το υπόστρωμα RBC (Rose Bengal Chloramphenicol Agar, Biolife) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του πληθυσμού ζυμών και μυκήτων, μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 3 ημέρες.



Εικόνα 21: Τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Listeria Palcam Agar Base και αποικίες του βακτηρίου *L. monocytogenes*.



Πίνακας 9: Πρόγραμμα δειγματοληψιών.

Χρόνος (h)	Θερμοκρασία Συντήρησης				Δυναμικό 4-8-12 °C
	4 °C	8 °C	12 °C	16 °C	
0			×		×
2			×	×	
4			×	×	
5					×
6			×	×	
8			×	×	
10			×	×	×
12		×	×	×	
20			×	×	×
24	×	×			
32			×	×	×
36		×			
44			×	×	×
48	×	×			
56			×	×	×
68			×	×	
72		×			×
92			×	×	
96	×	×			×
116			×	×	
120		×			×
140			×	×	
144	×	×			×
164			×	×	
168		×			×
188			×	×	
192	×	×			×
212			×		
216		×			×
236			×	×	
240	×	×			×
264					×
284			×		
288	×	×			×
336	×	×			×
384	×	×			×
432	×	×			×
480	×	×			
528	×				

### 3.2.4.6. Μέτρηση pH

Για την μέτρηση του pH κάθε δείγματος, χρησιμοποιήθηκε το μετρητικό όργανο Russell RL150 (Russell Inc, Boston, U.S.A). Πριν από τις μετρήσεις γινόταν βαθμονόμηση του οργάνου και ακολούθως μετρούταν το pH του αραιωμένου ομογενοποιημένου δείγματος (μετά την ολοκλήρωση των μικροβιολογικών αναλύσεων). Η ακρίβεια του συγκεκριμένου μετρικού οργάνου είναι  $\pm 0.2$ .

### 3.2.5. Ανάλυση δεδομένων

#### 3.2.5.1. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων μικροβιακής ανάπτυξης

Με γνώμονα τα μικροβιολογικά αποτελέσματα των πειραμάτων παρακολούθησης ανάπτυξης του βακτηρίου *L. monocytogenes* στις κοτομπουκιές, προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι αύξησης για το παθογόνο και την OMX σύμφωνα με το πρωτογενές σιγμοειδές μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994) (Εξίσωση 4). Με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος DMFit (Institute of Food Research, Reading, UK; διαθέσιμο στο [www.combase.cc](http://www.combase.cc)) έγινε η μη γραμμική παλινδρόμηση του μοντέλου και ο προσδιορισμός του χρόνου της φάση προσαρμογής  $\lambda$  (lag phase), του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης  $\mu_{max}$ , του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού  $y_0$  (κατώτερη ασύμπτωτη της σιγμοειδούς καμπύλης της μεταβολής του μικροβιακού πληθυσμού) και του τελικού μικροβιακού πληθυσμού  $y_{end}$  (άνωτερη ασύμπτωτη της σιγμοειδούς καμπύλης της μεταβολής του μικροβιακού πληθυσμού).

$$y(t) = y_{end} + \frac{y_0 - y_{end}}{A(t)} \ln \left( 1 + \frac{y_0 - y_{end}}{y_0} A(t) \right) \quad (\text{Εξίσωση 4}) \quad (\text{Baranyi and Roberts, 1994})$$

$$\text{όπου } A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left( e^{-\mu_{max} t} + e^{-h_0} + e^{-\mu_{max} t - h_0} \right),$$

$\mu_{max}$ : ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ( $\text{h}^{-1}$ ),

$y_{end}$ : ο φυσικός λογάριθμος του μέγιστου πληθυσμού του μικροοργανισμού ( $\ln \text{CFU/g}$ ),

$y_0$ : ο φυσικός λογάριθμος του αρχικού πληθυσμού του μικροοργανισμού,

$m$ : η παράμετρος καμπυλότητας για την μετάβαση από την εκθετική στη στατική φάση της καμπύλης ανάπτυξης και

$h_0$ : παράμετρος που χαρακτηρίζει το έργο που απαιτείται για να προσαρμοστούν οι μικροοργανισμοί στο νέο περιβάλλον (Baranyi & Roberts, 1994; McKellar & Lu, 2003).

Η επίδοση των πρωτογενών κινητικών μοντέλων ανάπτυξης της OMX και του βακτηρίου *L. monocytogenes* ελέγχθηκε με βάση το συντελεστή προσδιορισμού  $R^2$  και το τυπικό σφάλμα της προσαρμογής (standard error of fitting) του μοντέλου.

#### 3.2.5.2. Προσδιορισμός της επίδρασης της θερμοκρασίας στον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της επίδρασης της θερμοκρασίας στο ρυθμό ανάπτυξης του βακτηρίου *L. monocytogenes* και της OMX των κοτομπουκιών με βάση τα αποτελέσματα του  $\mu_{max}$  για το βακτήριο *Listeria monocytogenes* και την OMX (Υποενότητα 3.2.10.1.) για τις ισόθερμες συνθήκες των 4, 8, 12 και 16 °C. Πιο συγκεκριμένα, υπολογίστηκε η ρίζα του  $\mu_{max}$  ξεχωριστά για κάθε επανάληψη και δείγμα, προκειμένου να γίνει χρήση της εξίσωσης του δευτερογενούς μοντέλου του Ratkowsky (1982) (Εξίσωση 5) και να προσδιοριστούν

οι παράμετροι  $b$  καθώς και η θεωρητική ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης  $T_{\min}$  (Ratkowsky et al., 1982; Ross & Dalgaard, 2003) του βακτηρίου *L. monocytogenes* και της OMX. Ο προσδιορισμός των παραμέτρων  $b$  και  $T_{\min}$  έγινε με την χρήση του λογισμικού προγράμματος StatGraphics Centurion XVI 17.2.0.0 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia).

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b * (T - T_{\min}) \quad (\text{Εξίσωση 5}) \quad (\text{Ratkowsky et al., 1982})$$

Όπου:  $\mu_{\max}$  = ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ( $\text{h}^{-1}$ ),

$b$  = παράμετρος, συντελεστής συσχέτισης-παλινδρόμησης,

$T_{\min}$  = η θεωρητική ελάχιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού ( $^{\circ}\text{C}$ ) και

$T$  = θερμοκρασία ( $^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.2.5.3. Επικύρωση του μοντέλου ανάπτυξης του βακτηρίου *L. monocytogenes*

Το μοντέλο που αναπτύχθηκε για το προϊόν των κοτομπουκιών επικυρώθηκε με τα δεδομένα που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα για την ανάπτυξη του βακτηρίου *L. monocytogenes* κατά την αποθήκευση ενοφθαλμισμένων κοτομπουκιών υπό δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες, και πιο συγκεκριμένα υπό αερόβιες συνθήκες σε περιοδικά μεταβαλλόμενη θερμοκρασία συντήρησης (8 h στους  $4^{\circ}\text{C}$ , 8 h στους  $8^{\circ}\text{C}$  και 8 h στους  $12^{\circ}\text{C}$ ). Η μεταβολή της θερμοκρασίας κατά τη συντήρηση καταγράφηκε με ηλεκτρονικά καταγραφικά, όπως περιγράφεται και παραπάνω. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, πραγματοποιούνταν λήψη δύο δειγμάτων κοτομπουκιών και μικροβιολογική ανάλυσή τους (Πίνακας 9). Συνολικά, 79 δείγματα κοτομπουκιών αναλύθηκαν κατά τη συντήρησή τους σε συνθήκες θερμοκρασίας δυναμικού προφίλ, με στόχο την επικύρωση του μοντέλου.

Η πρόβλεψη της ανάπτυξης του βακτηρίου *L. monocytogenes* σε συνθήκες μεταβαλλόμενης θερμοκρασίας, βασίστηκε στα χρονοθερμοκρασιακά προφίλ που αποκτήθηκαν, από την Εξίσωση 5 για την εκτίμηση του στιγμιαίου  $\mu_{\max}$ , και κάνοντας χρήση των διαφορικών εξισώσεων του μοντέλου Baranyi και Roberts (Baranyi & Roberts, 1994; Baranyi et al., 1993; Lianou et al., 2017):

$$\frac{d}{dt} x = \left\{ \left[ \mu_{\max}(t) - \frac{q}{x_{\max}} \right] \left( \frac{x}{x_{\max}} \right) \right\} x \quad (\text{Εξίσωση 6})$$

$$\frac{d}{dt} q = \left\{ \left[ \mu_{\max}(t) - \frac{q}{x_{\max}} \right] \right\} q \quad (\text{Εξίσωση 7})$$

Όπου:

$t$  = χρόνος,

$x$  = ο πληθυσμός του βακτηρίου *L. monocytogenes* (CFU/ g) στο χρόνο  $t$

$x_{\max}$  = ο μέγιστος πληθυσμός του βακτηρίου *L. monocytogenes* (CFU/ g)

$q$  = παράμετρος που υποδεικνύει τη συγκέντρωση μίας ουσίας κρίσιμης για την ανάπτυξη (Baranyi et al., 1995).

Η αριθμητική ενσωμάτωση των Εξισώσεων 6 και 7 πραγματοποιήθηκε με χρήση του Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

Ως δείκτες αξιολόγησης της επίδοσης του δυναμικού μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν ο συντελεστής μεροληψίας (Bias factor,  $B_f$ ) (Εξίσωση 8) και ο συντελεστής ακριβείας (Accuracy factor,  $A_f$ ) (Εξίσωση 9) (Ross, 1996). Συγκεκριμένα, ο  $B_f$  δείχνει κατά πόσο το μοντέλο υπερεκτιμά ή υποεκτιμά τις πειραματικές μετρήσεις και παίρνει τιμές μεγαλύτερες ή μικρότερες του 1. Όταν  $B_f > 1$ , σημαίνει ότι το μοντέλο υπερεκτιμά την πραγματικότητα (fail-dangerous), ενώ όταν  $B_f < 1$ ,

υποεκτιμά την πραγματικότητα (fail-safe). Από την άλλη, ο  $A_f$  δείχνει κατά πόσο οι προβλεπόμενες τιμές διαφέρουν από τις πειραματικές και παίρνει τιμές μεγαλύτερες του 1.

$$A_f = 10^{\left( \frac{\sum_{i=1}^n \log \left( \frac{N_{i,t}}{N_{i,p}} \right)}{n} \right)} \quad (\text{Εξίσωση 8}) \quad (\text{Ross, 1996})$$

$$A_f = 10^{\left( \frac{\sum_{i=1}^n \log \left( \frac{\mu_{i,t}}{\mu_{i,p}} \right)}{n} \right)} \quad (\text{Εξίσωση 9}) \quad (\text{Ross, 1996})$$

Επίσης, εκτιμήθηκε το ποσοστό του σχετικού σφάλματος (percent relative error-%RE), με τη βοήθεια της παρακάτω εξίσωσης (Oscar, 2005):

$$\%RE = \left( \frac{N_{i,t} - N_{i,p}}{N_{i,p}} \right) \times 100 \quad (\text{Εξίσωση 10})$$

Όπου:

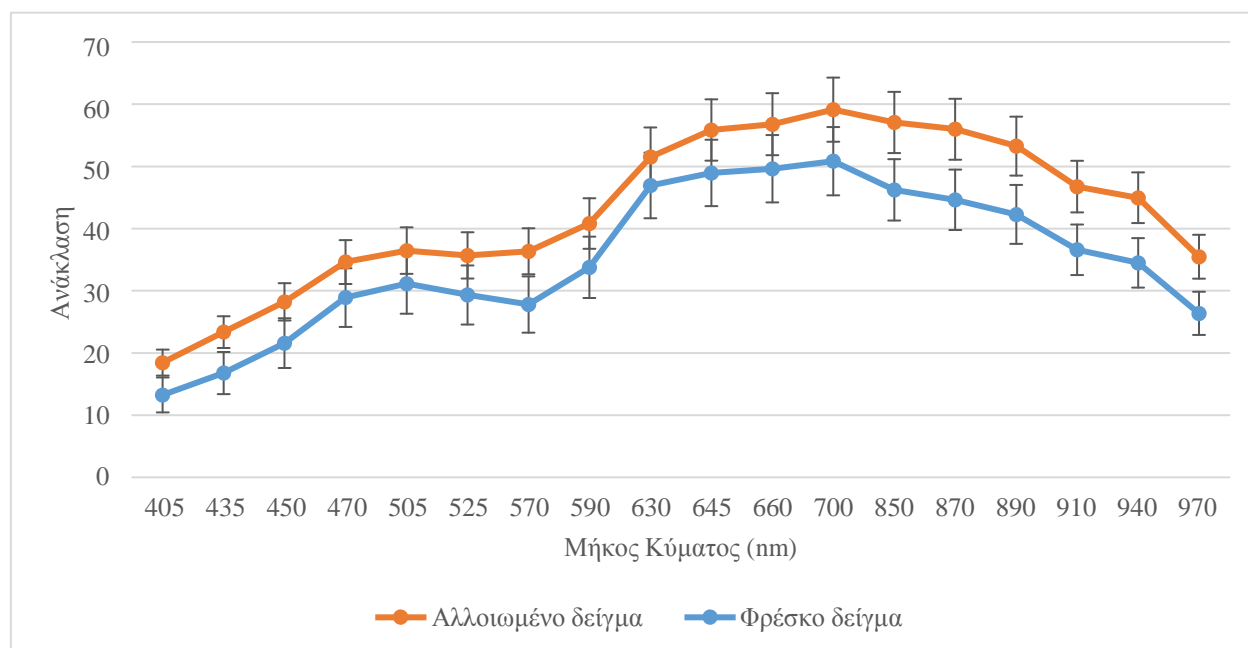
$N_o$ , ο παρατηρούμενος πληθυσμός του παθογόνου βακτηρίου και

$N_p$ , ο αντίστοιχος πληθυσμός που προβλέπει το μοντέλο.

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1. Αποτελέσματα από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης

Στα ακόλουθο γράφημα (Γράφημα 1), δίνονται τα φάσματα των δειγμάτων (φρέσκου και αλλοιωμένου) όπως προκύπτουν για τα 18 μήκη κύματος του Videometer- Lab. Παρατηρείται ότι για το αλλοιωμένο δείγμα σε κάθε μήκος κύματος αντιστοιχεί μεγαλύτερη ανάκλαση από ότι για το φρέσκο δείγμα. Παρόλα αυτά, η μεγαλύτερη διαφοροποίηση των φρέσκων από τα αλλοιωμένα φαίνεται να οφείλεται κυρίως στις χημικές ουσίες που αντανακλούν στα μήκη κύματος 570 έως 970 nm, τα οποία αντιστοιχούν στην περιοχή του ορατού και την NIR περιοχή (850- 970 nm) (Γράφημα 1). Οι ενώσεις που αντιστοιχούν σ' αυτά τα μήκη κύματος, και σχετίζονται άμεσα με την αλλοίωση του κρέατος, είναι η μυογλοβίνη (570 nm), η οξυμυογλοβίνη (590 nm) και η μεταμυογλοβίνη (630 nm), ενώ τα φάσματα των 700, 890, 910, 940 και 970 nm μαρτυρούν την ύπαρξη οξειδωσης (700 nm), λίπους (890, 940 nm), πρωτεϊνών (910 nm) και νερού (970 nm) (ElMasry et al., 2012; Dissing et al., 2013; Ropodi et al., 2013).



Γράφημα 1: Σύγκριση του φάσματος φρέσκου δείγματος φιλέτου στήθους κοτόπουλου με αυτό αλλοιωμένου (συντήρηση για 36h στους 35 °C, 6.44 log CFU/cm<sup>2</sup> OMX).

#### 4.1.1. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης- Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square- Regression, PLS-R)

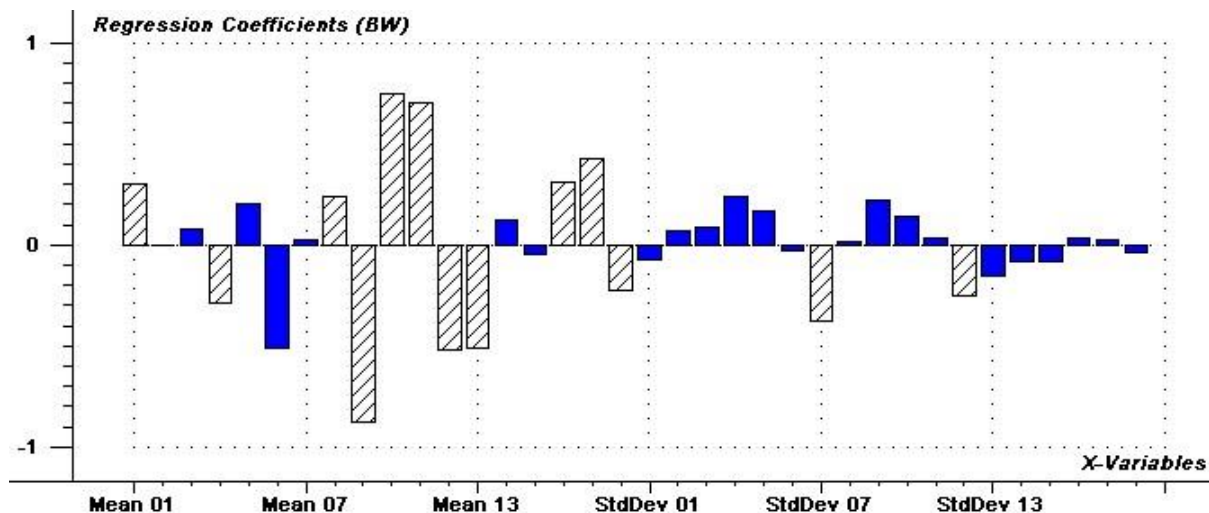
Για την αξιολόγηση του μοντέλου εκτίμησης του πληθυσμού της OMX καθώς και βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* σε φιλέτο στήθους κοτόπουλου συντηρημένο υπό αερόβιες συνθήκες, παρατίθενται στον Πίνακα 10, οι δείκτες απόδοσης για την εκπαίδευση και την επικύρωση του μοντέλου. Οι συντελεστές συσχέτισης  $r_c$  και  $r_{cv}$  για την OMX είναι κοντά στο 0.85,

ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τις ψευδομονάδες ξεπερνούν το 0.9. Λόγω του ότι οι τιμές αυτές είναι κοντά στο +1, συμπεράνεται ότι υπάρχει μία ισχυρή θετική γραμμική σχέση μεταξύ των προβλέψιμων και των παρατηρούμενων τιμών, τόσο για την περίπτωση της OMX όσο και για εκείνη των ψευδομονάδων. Επιπλέον, παρατηρείται ότι οι τιμές  $RMSE_C$  και  $RMSE_{CV}$ , κυμαίνονται από 0.8- 0.9 για την OMX, ενώ για τις ψευδομονάδες είναι κοντά στο 0.02. Είναι γνωστό ότι μικρές τιμές  $RMSE$  σημαίνει ότι οι παρατηρούμενες τιμές είναι πιο κοντά στις τιμές που προβλέπει το μοντέλο. Συνεπώς, φαίνεται ότι τα δεδομένα από την πολυφασματική απεικόνιση συσχετίζονται σε πολύ καλό βαθμό με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για την ανάπτυξη των βακτηρίων *Pseudomonas*.

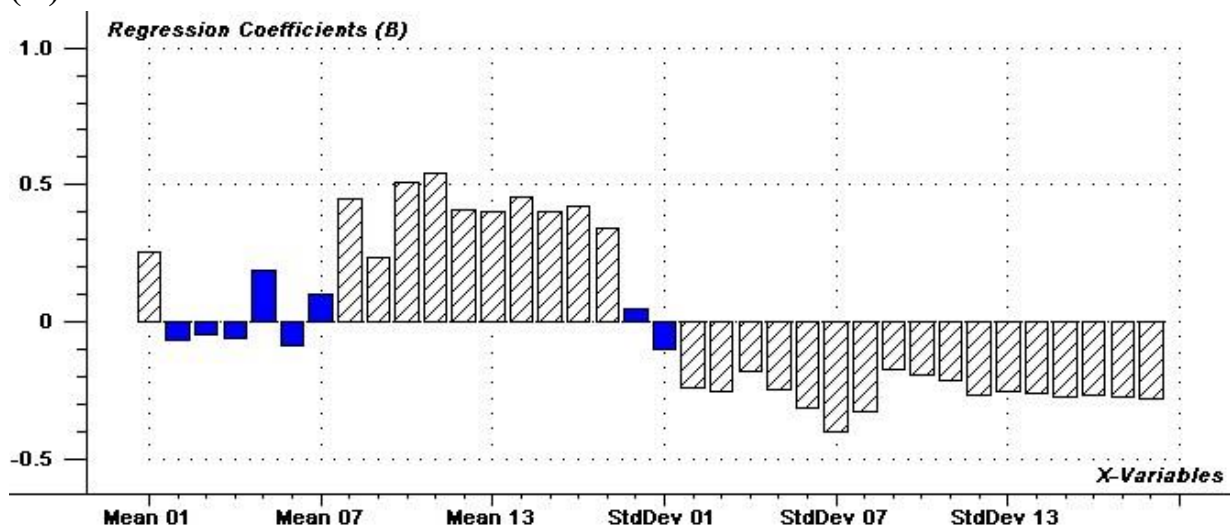
Πίνακας 10: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για την ανάπτυξη της OMX και των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*.

		OMX	<i>Pseudomonas sp.</i>
Εύρος Βαθμονόμησης & Επικύρωσης (log CFU/cm <sup>2</sup> )		2.30103 – 8.956649	1.69897 – 7.230449
Λανθάνουσες συνιστώσες (LVs)		11	7
Βαθμονόμηση (Calibration)	$RMSE_C$	0.801369	0.026087
	$r_c$	0.866038	0.949447
Επικύρωση (Cross Validation)	$RMSE_{CV}$	0.901279	0.028708
	$r_{cv}$	0.827819	0.938464

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι δεν επηρεάζουν όλα τα μήκη κύματος στον ίδιο (θετικό ή αρνητικό) βαθμό στην ανάπτυξη των μοντέλων (ElMasry et al., 2012). Για την κατασκευή των συναρτήσεων που προσδιορίζουν ποσοτικά την OMX και τον πληθυσμό των ψευδομονάδων σε δείγματα φιλέτου στήθους κοτόπουλου σε αερόβιες συνθήκες, υπολογίστηκαν, με την βοήθεια του λογισμικού The Unscrambler, οι συντελεστές B με τη μεγαλύτερη επιρροή στην ανάπτυξη του μοντέλου (b-coefficients) (Γράφημα 2).



(A)



(B)

Γράφημα 2: Οι συντελεστές B για τα δεδομένα των μέσων ανακλάσεων και των τυπικών αποκλίσεων, για τα 18 φάσματα, στην περίπτωση της ανάπτυξης της OMX (A) της ανάπτυξης βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* (B).

Παρατηρώντας το Γράφημα 2(A), φαίνεται ότι σημαντική είναι η επίδραση των φασμάτων των 405, 470, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 910, 940 και 970 nm για εκτίμηση της OMX με βάση το συγκεκριμένο μοντέλο. Αντίθετα, στην περίπτωση του μοντέλου για την ανάπτυξη των ψευδομονάδων (Γράφημα 2(B)), σημαντική επίδραση φαίνεται να έχουν τα φάσματα των 405, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910 και 940 nm. Οι συναρτήσεις με βάση τις οποίες υπολογίζεται ο πληθυσμός της OMX και των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* σε δείγμα φιλέτου στήθους κοτόπουλου αερόβιων συνθηκών συσκευασίας, είναι οι εξής:

$$Y_{\text{OMX}} = 0.70571 + 0.304 \cdot X_{\text{Mean405}} - 0.287 \cdot X_{\text{Mean470}} + 0.238 \cdot X_{\text{Mean590}} - 0.881 \cdot X_{\text{Mean630}} + 0.750 \cdot X_{\text{Mean645}} - 0.699 \cdot X_{\text{Mean660}} - 0.516 \cdot X_{\text{Mean700}} - 0.509 \cdot X_{\text{Mean850}} + 0.314 \cdot X_{\text{Mean910}} + 0.421 \cdot X_{\text{Mean940}} - 0.229 \cdot X_{\text{Mean970}} - 0.376 \cdot X_{\text{SD570}} - 0.255 \cdot X_{\text{SD700}} \quad (\text{Εξίσωση 11})$$

$$Y_{Pseudomonas\ sp.} = -10.667027 + 0.253 \cdot X_{Mean405} + 0.448 \cdot X_{Mean590} + 0.237 \cdot X_{Mean630} + 0.510 \cdot X_{Mean645} + 0.543 \cdot X_{Mean660} + 0.411 \cdot X_{Mean700} + 0.404 \cdot X_{Mean850} + 0.455 \cdot X_{Mean870} + 0.403 \cdot X_{Mean890} + 0.420 \cdot X_{Mean910} + 0.340 \cdot X_{Mean940} - 0.241 \cdot X_{SD435} - 0.256 \cdot X_{SD450} - 0.180 \cdot X_{SD470} - 0.249 \cdot X_{SD505} - 0.312 \cdot X_{SD525} - 0.399 \cdot X_{SD570} - 0.325 \cdot X_{SD590} - 0.174 \cdot X_{SD630} - 0.191 \cdot X_{SD645} - 0.216 \cdot X_{SD660} - 0.267 \cdot X_{SD700} - 0.253 \cdot X_{SD850} - 0.260 \cdot X_{SD870} - 0.275 \cdot X_{SD890} - 0.265 \cdot X_{SD910} - 0.274 \cdot X_{SD940} - 0.283 \cdot X_{SD970}$$

(Εξίσωση 12)

Όπου:

$Y$  = ο προβλεπόμενος μικροβιακός πληθυσμός της OMX ή των ψευδομονάδων ( $\log CFU/cm^2$ ),

$X_{Mean\ nm}$  = ο μέσος όρος των ανακλάσεων για το συγκεκριμένο φάσμα και

$X_{SD\ nm}$  = η τυπική απόκλιση του δείγματος για το συγκεκριμένο φάσμα.

Όσον αφορά το μοντέλο που αναπτύχθηκε για την OMX, αξίζει να σημειωθεί ότι η μεγαλύτερη τιμή για τους συντελεστές  $B$  παρατηρήθηκε στα 630 nm, υποδεικνύοντας ότι η μεταμυογλοβίνη έχει σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση, αφού αυτό το μήκος κύματος συνδέεται με τη μεταμυογλοβίνη στο κρέας. Επίσης, μεγάλη φαίνεται να είναι και η επίδραση στην αλλοίωση ενώσεων που αντιστοιχούν στα μήκη κύματος 645 και 660 nm. Αυτά τα μήκη κύματος συνδέονται με το κόκκινο χρώμα στο κρέας και με τη δυναμική μετατροπή και αποδόμηση ενός αριθμού παραγώγων της μυογλοβίνης (Liu et al., 2003). Από την άλλη πλευρά, ο σχετικά υψηλός συντελεστής παλινδρόμησης για το μήκος κύματος των 700 nm σχετίζεται άμεσα με την διαδικασία της οξειδωσης της επιφάνειας του κρέατος, η οποία λαμβάνει χώρα κατά το πείραμα αλλοίωσης. Οι υψηλές τιμές του συντελεστή παλινδρόμησης στα μήκη κύματος 850 και 910 nm, τα οποία αντιστοιχούν στην ανάκλαση από πρωτεΐνες, δηλώνουν την παρουσία ενζύμων που οδηγούν σε φυσικοχημικές αλλαγές της δομής του κρέατος (Μαυρούδης, 2015). Επιπλέον, η ανάκλαση στα 940 nm, της οποίας η επίδραση φαίνεται να είναι σημαντική για την περίπτωση της OMX, σχετίζεται με την περιεκτικότητα του κρέατος σε λίπος (Panagou et al., 2014). Παράλληλα, η οξυμυογλοβίνη (590 nm) παράγεται μέσω οξειδωσης της μυογλοβίνης και προσδίδει στο κρέας κόκκινο χρώμα (Panagou et al. 2014). Όσον αφορά την αυξημένη επίδραση του 970 nm, αυτή οφείλεται στην ύπαρξη νερού στην επιφάνεια του κρέατος (Barbin et al., 2013; ElMasry et al., 2013).

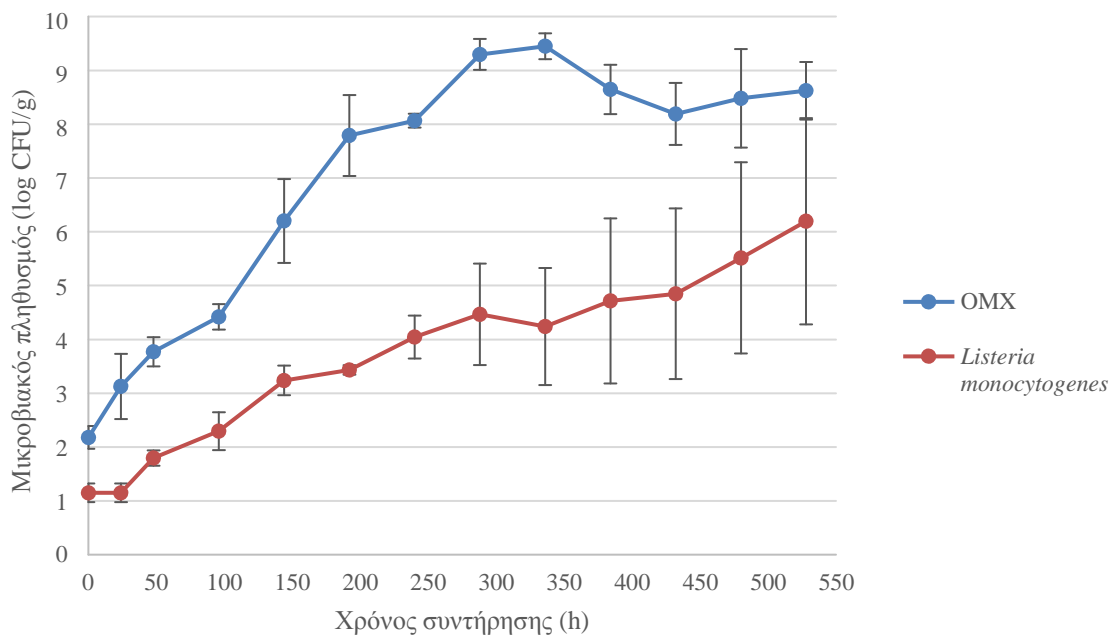
Στην ανάπτυξη του μοντέλου για τις ψευδομονάδες, οι αυξημένες τιμές των συντελεστών παλινδρόμησης αντιστοιχούν στα μήκη κύματος 405, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910 και 940 nm. Όπως προαναφέρθηκε τα 590 nm σχετίζονται με την οξυμυογλοβίνη, τα 630 nm με τη μεταμυογλοβίνη, τα 645 και 660 nm με παράγωγα της μυογλοβίνης, τα 700 nm με την οξειδωση και τα 850 και 910 nm με τις πρωτεΐνες. Από την άλλη, τα φάσματα στα 870, 890 και 940 nm που δεν είχαν σημαντική επίδραση στην αύξηση του πληθυσμού της OMX, συνδέονται με τις πρωτεΐνες (Μαυρούδης, 2015) και το λίπος (Panagou et al., 2014). Για το συγκεκριμένο μοντέλο, πρέπει να σημειωθεί ότι οι μεγαλύτερες τιμές για τους συντελεστές  $B$  παρατηρήθηκαν στα 660 και 645 nm ακολούθως.



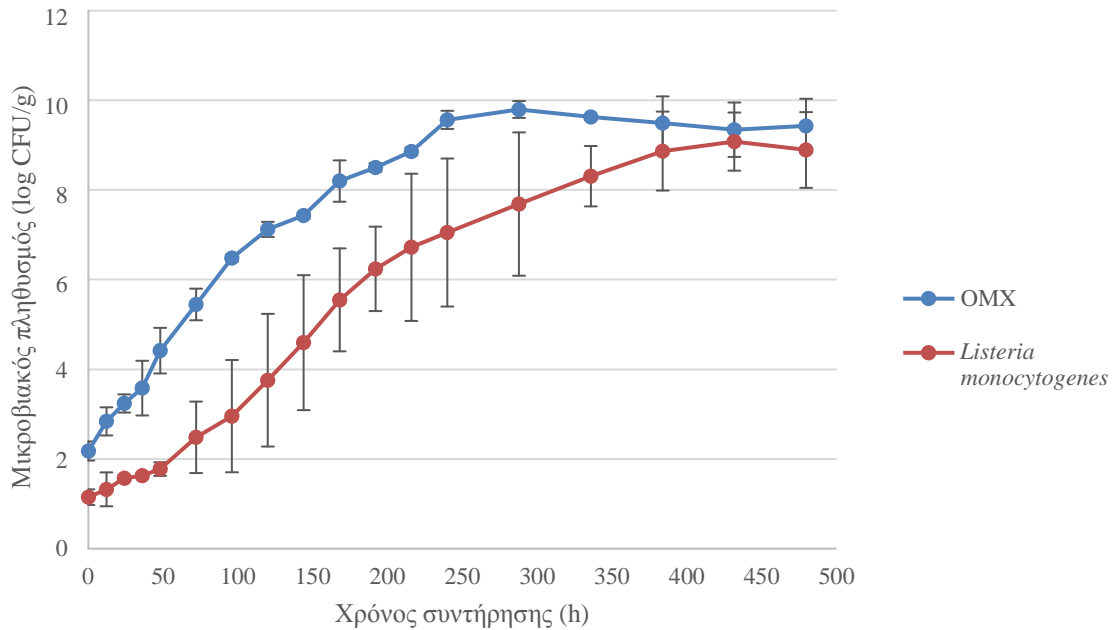
## 4.2. Αποτελέσματα για το πείραμα ανάπτυξης *Listeria monocytogenes* σε κοιτομπουκιές πανέ- προψημένες

### 4.2.1. Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων

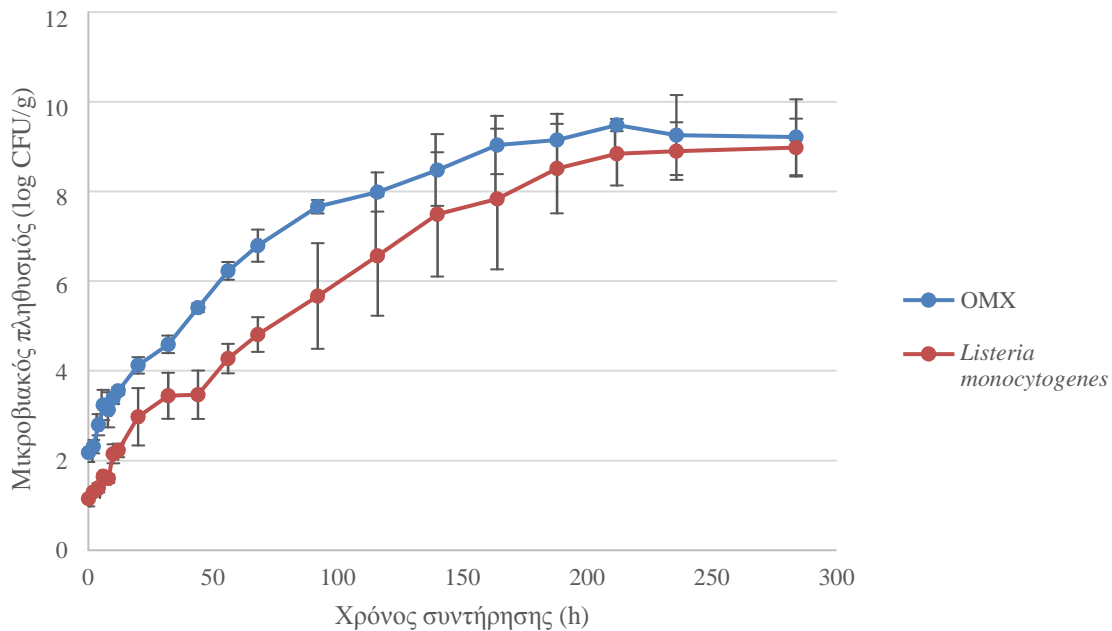
Για τον προσδιορισμό των μικροοργανισμών στο αρχικό δείγμα, έγινε καταμέτρηση των αποικιών σε κάθε αραιώση και αναγωγή στο αντίστοιχο αρχικό δείγμα. Στα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζεται η ανάπτυξη της OMX και του βακτηρίου *L. monocytogenes* κατά το διάστημα συντήρησης τους υπό αερόβιες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, για την κατασκευή των γραφημάτων ανάπτυξης των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι των log (CFU/g) και οι τυπικές αποκλίσεις από τα δύο δείγματα των δύο επαναλήψεων συντήρησης (n= 4).



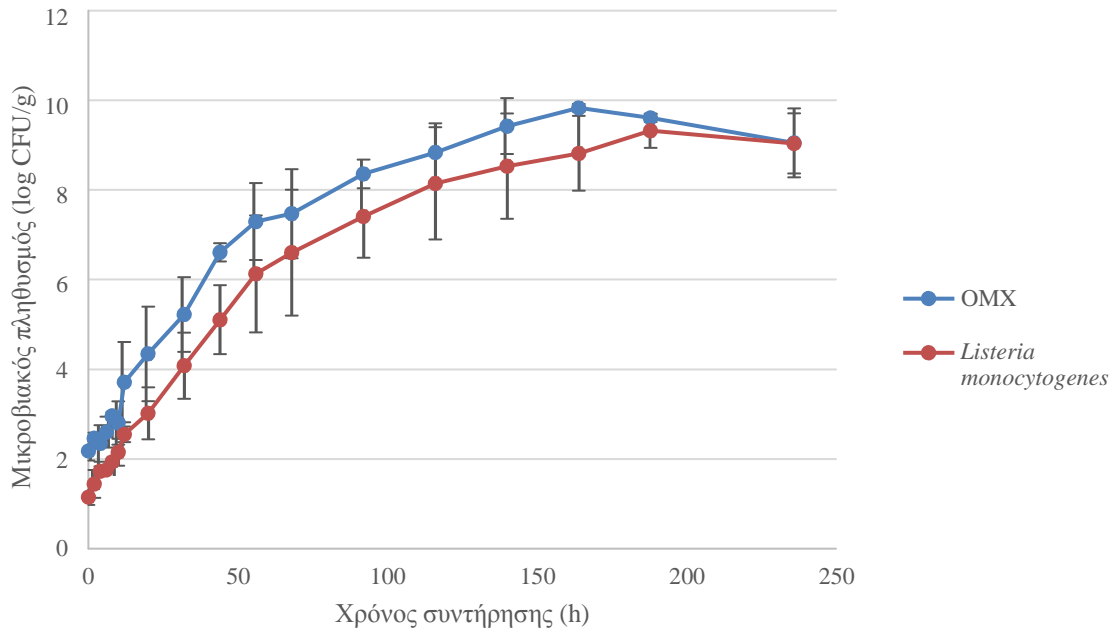
Γράφημα 3: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση των ενοφθαλμισμένων με *Listeria monocytogenes* κοιτομπουκιών στους 4 °C για την OMX και το μικροβιακό πληθυσμό *L. monocytogenes*.



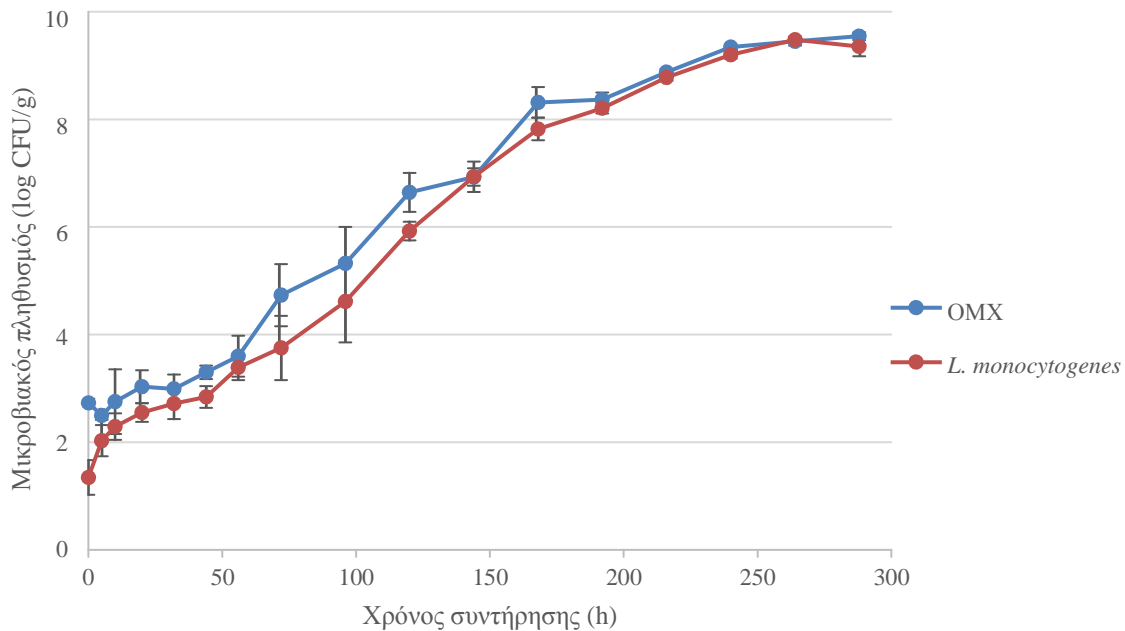
Γράφημα 4: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση των ενοφθαλμισμένων με *Listeria monocytogenes* κοτομπουκιών στους 8 °C για την OMX και το μικροβιακό πληθυσμό *L. monocytogenes*.



Γράφημα 5: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση των ενοφθαλμισμένων με *Listeria monocytogenes* κοτομπουκιών στους 12 °C για την OMX και το μικροβιακό πληθυσμό *L. monocytogenes*.



Γράφημα 6: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση των ενοφθαλμισμένων με *Listeria monocytogenes* κοτομπουκιών στους 16 °C για την OMX και το μικροβιακό πληθυσμό *L. monocytogenes*.



Γράφημα 7: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση των ενοφθαλμισμένων με *Listeria monocytogenes* κοτομπουκιών στο δυναμικά μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ (8h στους 4 °C, 8h στους 8 °C και 8h στους 12 °C) για την OMX και το μικροβιακό πληθυσμό *L. monocytogenes*.

Με βάση τα Γραφήματα ανάπτυξης 3, 4, 5 και 6, το αρχικό επίπεδο του πληθυσμού της OMX και της *L. monocytogenes* (0h), στα προς συντήρηση δείγματα στους 4, 8, 12, 16 °C, ήταν στους 2.17 και 1.15 λογαριθμικούς κύκλους αντίστοιχα. Ενώ, το αρχικό επίπεδο του πληθυσμού της OMX και της *L. monocytogenes* (0h), στα προς συντήρηση δείγματα στο δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ (Γράφημα 7), ήταν στους 2.73 και 1.35 λογαριθμικούς κύκλους αντίστοιχα.

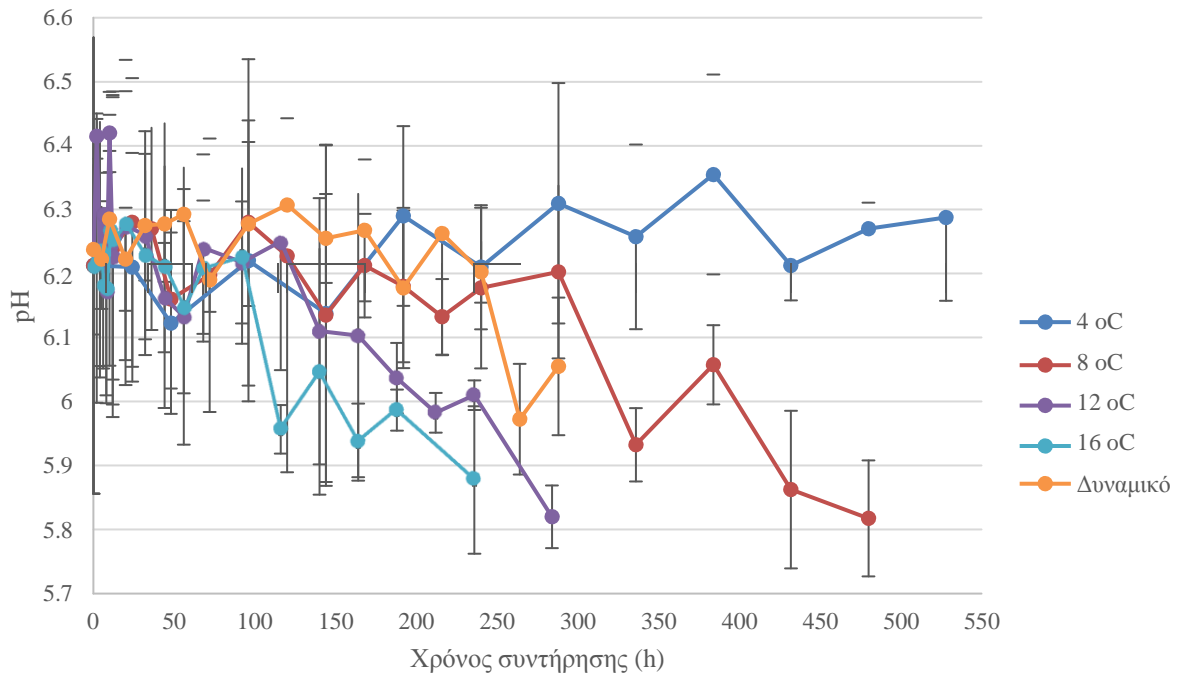
Σύμφωνα με το Γράφημα 3, στους 4 °C η ανάπτυξη της OMX είναι αρκετά μεγαλύτερη από εκείνη του βακτηρίου *L. monocytogenes*. Επίσης, παρατηρείται ότι ο πληθυσμός *L. monocytogenes* δεν καταφέρνει να πιάσει στατική φάση ακόμα και μετά από 22 μέρες συντήρησης. Ενώ, ο πληθυσμός της OMX βρίσκεται σε εκθετική φάση έως και τις 336h, αγγίζοντας ένα μέγιστο πληθυσμό της τάξεως των 9.5 λογαριθμικών κύκλων και στη συνέχεια παρατηρείται μία πτώση στις 384h, από όπου και έπειτα παρατηρείται στατική φάση. Το φαινόμενο αυτό της πτώσης του πληθυσμού της OMX από τις 336 στις 384h μπορεί να οφείλεται σε σφάλμα του αναλυτή και υπερεκτίμηση του πληθυσμού για τις 288 και 336h ή σε μείωση του πληθυσμού κάποιων μικροοργανισμών της φυσικής OMX των κοτομπουκιών μετά τις 336h. Συγκρίνοντας τα Γραφήματα ανάπτυξης κάθε θερμοκρασίας (Γραφήματα 3, 4, 5, 6, 7), προκύπτει ότι στους 4 °C παρουσιάζεται η μικρότερη μικροβιακή ανάπτυξη για όλα τα είδη μικροοργανισμών (OMX και *L. monocytogenes*), ενώ η μεγαλύτερη μικροβιακή ανάπτυξη παρατηρείται στους 16 °C. Ακόμα, φαίνεται ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία συντήρησης, το βακτήριο *L. monocytogenes* κυριαρχεί των άλλων βακτηρίων, εφόσον ο πληθυσμός του τείνει να ισούται με τον πληθυσμό της OMX. Επιπλέον, παρατηρείται ότι ο μέγιστος πληθυσμός της OMX είναι περίπου 9.5 log (CFU/g) σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης και στο δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ, ενώ ο μέγιστος πληθυσμός *L. monocytogenes* αυξάνει όσο αυξάνει η θερμοκρασία συντήρησης (6.19- 9.32 log (CFU/g)). Ο μεγαλύτερος μέγιστος πληθυσμός *L. monocytogenes* παρατηρήθηκε στο δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ συντήρησης (9.47 log (CFU/g)). Όμως αυτό είναι δύσκολο να συσχετισθεί με το θερμοκρασιακό προφίλ, καθώς και ο αρχικός πληθυσμός *L. monocytogenes* ήταν μεγαλύτερος για το πείραμα στο δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ από ότι στα πειράματα των άλλων θερμοκρασιών. Επιπρόσθετα, παρατηρώντας το Γράφημα 7 για το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας, φαίνεται ότι οι μικροοργανισμοί κατά την αύξησή τους ακολουθούν συμπεριφορά που αν έπρεπε να καταταγεί κάπου, θα λέγαμε ότι είναι ενδιάμεσα των συμπεριφορών των μικροοργανισμών υπό συντήρηση στους 8 και 12 °C (Γράφημα 5).

Κρίνεται αναγκαίο να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα της αύξησης του πληθυσμού του βακτηρίου *L. monocytogenes*, φαίνεται να οφείλονται μόνο στην ανάπτυξη του πληθυσμού του αρχικού εμβολίου, καθώς από μικροβιολογικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν σε μη ενοφθαλμισμένες κοτομπουκιές σε τακτά χρονικά διαστήματα για την παρουσία κυττάρων *L. monocytogenes*, δε βρέθηκαν κύτταρα του εν λόγω παθογόνου (όριο ανίχνευσης 10 CFU/g).

Επιπρόσθετα, από μικροβιολογικές αναλύσεις που έγιναν σε λίγα χρονικά διαστήματα και για κάθε θερμοκρασία συντήρησης, επιβεβαιώθηκε ότι υπάρχουν μεγάλοι πληθυσμοί ζυμών και μυκήτων στις ενοφθαλμισμένες με *L. monocytogenes* κοτομπουκιές, όπως συμβαίνει και σε μη ενοφθαλμισμένες κοτομπουκιές (Παράρτημα), οι οποίοι αυξάνονται με το χρόνο συντήρησης. Τα δεδομένα αυτά όμως είναι πολύ λίγα (δεδομένα για 3-4 χρονικά διαστήματα σε κάθε θερμοκρασία συντήρησης) και δεν παρατίθενται.

#### 4.2.2. Αποτελέσματα pH

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 8, το pH με την πάροδο του χρόνου μειώθηκε στα δείγματα των υπό συντήρηση ενοφθαλμισμένων με *Listeria monocytogenes* κοτομπουκιών για όλες τις θερμοκρασίες εκτός των 4 °C. Όσον αφορά τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν υπό ισοθερμοκρασιακές συνθήκες, το pH των αρχικών δειγμάτων ήταν 6.21, ενώ η τελική ένδειξη για τους 4 °C ήταν 6.27 και για τους 8, 12, 16 °C ήταν 5.82-5.87. Από την άλλη, για τα πειράματα που έγιναν υπό δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ, το pH των αρχικών δειγμάτων ήταν 6.23, ενώ η τελική ένδειξη pH ήταν 5.48. Η πτώση του pH για τα πειράματα όπου η συντήρηση έγινε στους 8, 12, 16 °C και στο δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ θα μπορούσε να οφείλεται στην μεγάλη αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού *L. monocytogenes*, αφού το συγκεκριμένο βακτήριο παρουσία γλυκόζης και υπό αερόβιες συνθήκες σχηματίζει οξέα όπως γαλακτικό και οξικό οξύ (Romick et al., 1996). Αντίθετα, η αύξηση του pH στις ενοφθαλμισμένες με *Listeria monocytogenes* κοτομπουκιές που συντηρήθηκαν στους 4 °C, θα μπορούσε να εξηγηθεί, όπως παρατηρήθηκε και από τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, από το ότι η αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού της OMX ήταν αισθητά μεγαλύτερη από ότι αυτή του πληθυσμού *L. monocytogenes*. Πιο συγκεκριμένα, στις κοτομπουκιές εμφανίζονται μεγάλοι πληθυσμοί ζυμών και μυκήτων (Παράρτημα), που παράγουν ως μεταβολικό προϊόν αλκοόλες και συμβάλλουν στην αύξηση το pH. Επιπρόσθετα, τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* που αποτελούν αλλοιωγόνο παράγοντα των προϊόντων κοτόπουλου που συντηρούνται υπό αερόβιες συνθήκες, παράγουν μεταβολίτες, όπως αμίνες, αμμωνία και σουλφίδια που προκαλούν αύξηση του pH (Nychas et al., 2007, Koutsoumanis et al., 2008).



Γράφημα 8: Μετρήσεις pH στα δείγματα συντήρησης των ενοφθαλμισμένων με *Listeria monocytogenes* κοτομπουκιών για τις θερμοκρασίες 4, 8, 12, 16 °C και το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας (8h στους 4 °C, 8h στους 8 °C και 8h στους 12 °C).

### 4.2.3. Ανάλυση δεδομένων

#### 4.2.3.1. Πρωτογενή μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης

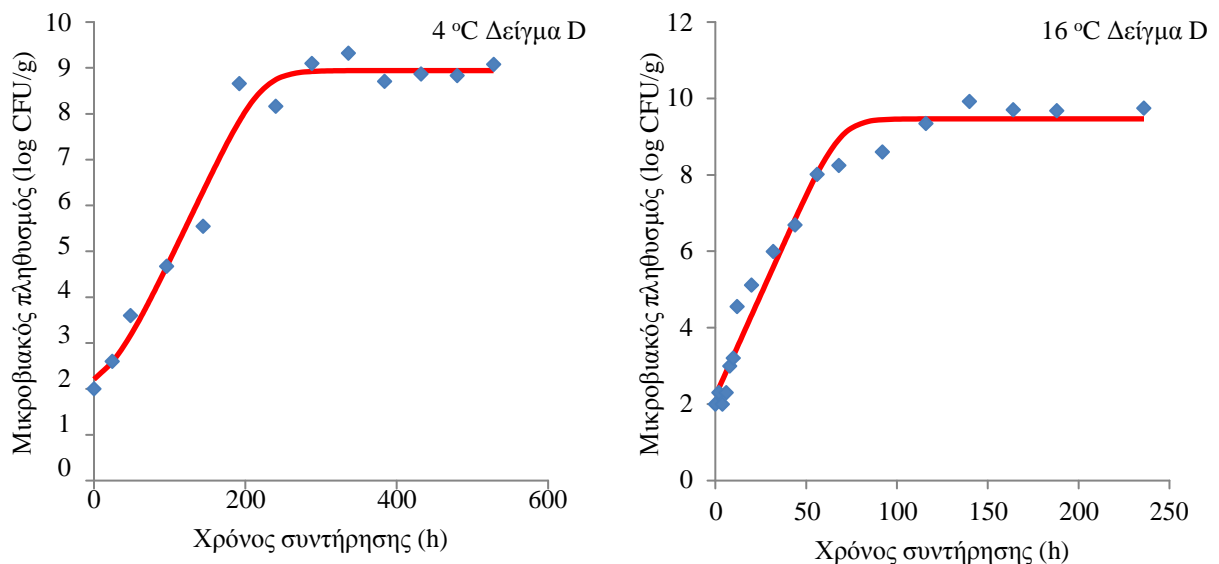
Πίνακας 11: Κινητικές παράμετροι μικροβιακής ανάπτυξης.

Μικροοργανισμός	Θερμοκρασία (°C)	$\lambda$ (lag phase) (h)	$y_0$ (log CFU/g)	$y_{end}$ (log CFU/g)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup> (Ελάχιστο - Μέγιστο)	Τυπικό σφάλμα προσαρμογής (se(fit)) (Ελάχιστο-Μέγιστο)
OMX	4 °C	29.68 ± 8.39	2.18 ± 0.21	8.75 ± 0.32	0.07 ± 0.01	0.883 - 0.975	0.445 - 0.807
<i>L. monocytogenes</i>		15.71 ± 0.53	1.15 ± 0.17	5.3987 ± 2.9422	0.04 ± 0.01	0.883 - 0.984	0.290 - 0.381
OMX	8 °C		2.18 ± 0.21	9.49 ± 0.30	0.08 ± 0.002	0.971 - 0.980	0.365 - 0.476
<i>L. monocytogenes</i>		35.48 ± 10.42	1.15 ± 0.17	8.86 ± 0.6118	0.07 ± 0.02	0.977 - 0.994	0.261 - 0.418
OMX	12 °C		2.18 ± 0.21	9.06 ± 0.67	0.13 ± 0.01	0.964 - 0.983	0.387 - 0.464
<i>L. monocytogenes</i>			1.15 ± 0.17	8.95 ± 0.56	0.10 ± 0.03	0.981 - 0.992	0.296 - 0.360
OMX	16 °C		2.18 ± 0.2119	9.25 ± 0.29	0.20 ± 0.05	0.964 - 0.970	0.493 - 0.536
<i>L. monocytogenes</i>			1.15 ± 0.17	8.83 ± 0.62	0.18 ± 0.06	0.976 - 0.990	0.336 - 0.434

Στον παραπάνω πίνακα παρατίθενται οι κινητικές παράμετροι ανάπτυξης των μικροοργανισμών κατά την συντήρησή τους στους 4, 8, 12 και 16 °C. Σε ορισμένες περιπτώσεις, δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί η φάση προσαρμογής των μικροοργανισμών, παρά το χαμηλό αρχικό μικροβιακό φορτίο, διότι η ανάπτυξη τους βρισκόταν στην εκθετική φάση. Πιο συγκεκριμένα, φάση προσαρμογής προσδιορίστηκε μόνο για την OMX στους 4 °C και για το βακτήριο *L. monocytogenes* στους 4 και 8 °C.

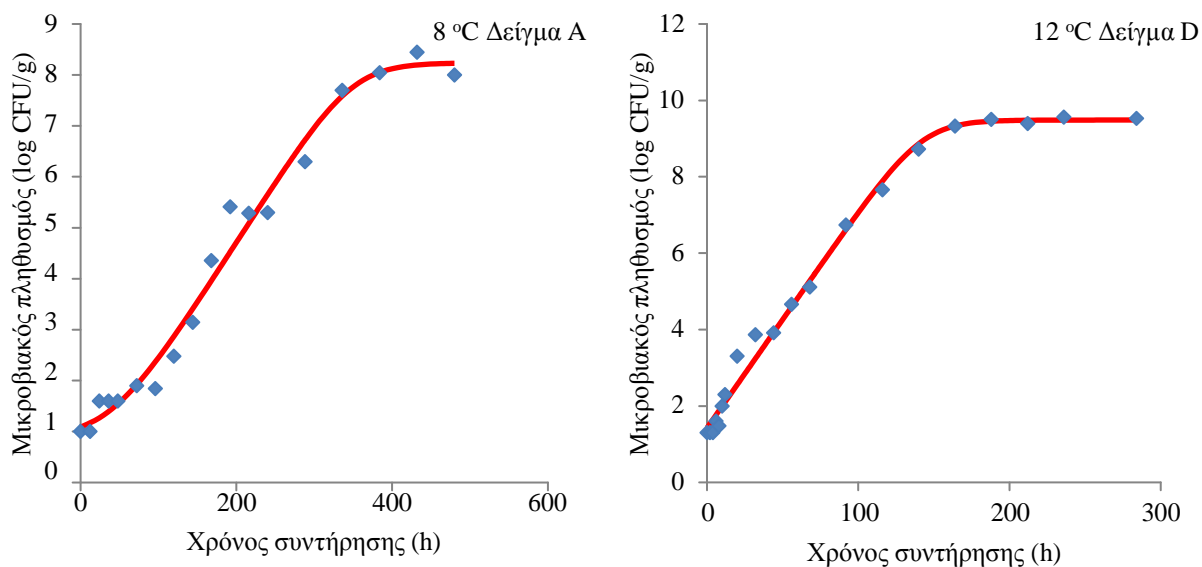
Όσον αφορά την OMX, παρατηρείται ότι φάση προσαρμογής  $\lambda$  προσδιορίστηκε μόνο για τους 4 °C και ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης φαίνεται να αυξάνει όσο αυξάνει και η θερμοκρασία συντήρησης. Συνεπώς, κατά τη συντήρηση στους 4 °C παρουσιάστηκε η μεγαλύτερη παρεμπόδιση της ανάπτυξης της OMX. Όσον αφορά την ανάπτυξη του βακτηρίου *L.*

*monocytogenes*, φάση προσαρμογής λ προσδιορίστηκε για τους 4 και 8 °C. Η φάση προσαρμογής για τη συντήρηση στους 4 °C ήταν σχεδόν 16h, ενώ για τη συντήρηση στους 8 °C ήταν σχεδόν 35.5h. Συνήθως η μικρότερη θερμοκρασία έχει μεγαλύτερη παρεμποδιστική επίδραση στους μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα να προκύπτει μεγαλύτερη φάση προσαρμογής σε χαμηλές θερμοκρασίες. Για παράδειγμα, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε κοτομπουκιές και σε συντήρηση στους 3, 7 και 11 °C, η λ ήταν 3, 2 και 1 ημέρες αντίστοιχα (Marshall et al., 1991). Παρόλα αυτά, το συγκεκριμένο φαινόμενο θα μπορούσε να εξηγηθεί λαμβάνοντας υπόψιν ότι το βακτήριο *L. monocytogenes* είναι ψυχρότροφο και άρα είναι πιθανό να έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται πιο γρήγορα σε χαμηλές θερμοκρασίες όπως οι 4 °C από ότι τα υπόλοιπα βακτήρια της χλωρίδας των κοτομπουκιών. Στη θερμοκρασία όμως των 8 °C, μπορεί βακτήρια που ανήκουν στη μικροχλωρίδα των κοτομπουκιών να προσαρμόζονται πιο εύκολα από ότι στους 4 °C και να ανταγωνίζονται το χαμηλό αρχικό πληθυσμό *L. monocytogenes*, με αποτέλεσμα να αυξάνεται χρονικά η φάση προσαρμογής του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes*. Και στην περίπτωση της ανάπτυξης του βακτηριακού πληθυσμού *L. monocytogenes*, φαίνεται το  $\mu_{max}$  να αυξάνει όσο αυξάνει και η θερμοκρασία συντήρησης. Αξίζει να αναφερθεί ότι κατά την προσαρμογή του πρωτογενούς μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα μικροβιακής ανάπτυξης, το τυπικό σφάλμα προσαρμογής ήταν κατά πολύ μικρότερο του 1 (η ανώτερη τιμή ήταν 0.54) με εξαίρεση την περίπτωση της OMX για τους 4 °C, και ο συντελεστής προσδιορισμού έφτασε κοντά στο 0.99, όπως στην περίπτωση του βακτηρίου *L. monocytogenes* για τους 8, 12 και 16 °C. Ακολούθως, δίνονται παραδείγματα από την προσαρμογή του πρωτογενούς μοντέλου στα πειραματικά μικροβιολογικά δεδομένα για την ανάπτυξη της OMX (Γράφημα 9) και του βακτηρίου *L. monocytogenes* (Γράφημα 10).



Γράφημα 9: Παραδείγματα από την προσαρμογή του πρωτογενούς μοντέλου των Baranyi και Roberts (1994) (κόκκινη γραμμή) στα πειραματικά δεδομένα (μπλε ρόμβοι) της ανάπτυξης του μικροβιακού πληθυσμού της OMX, για τα συντηρημένα δείγματα στους 4 °C (δεξιά καμπύλη) και στους 16 °C (αριστερή καμπύλη).

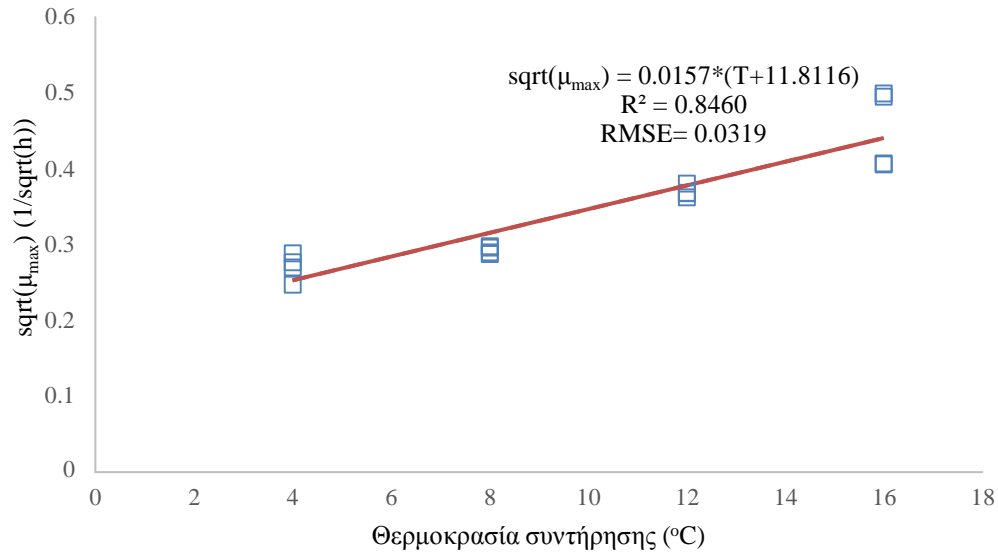




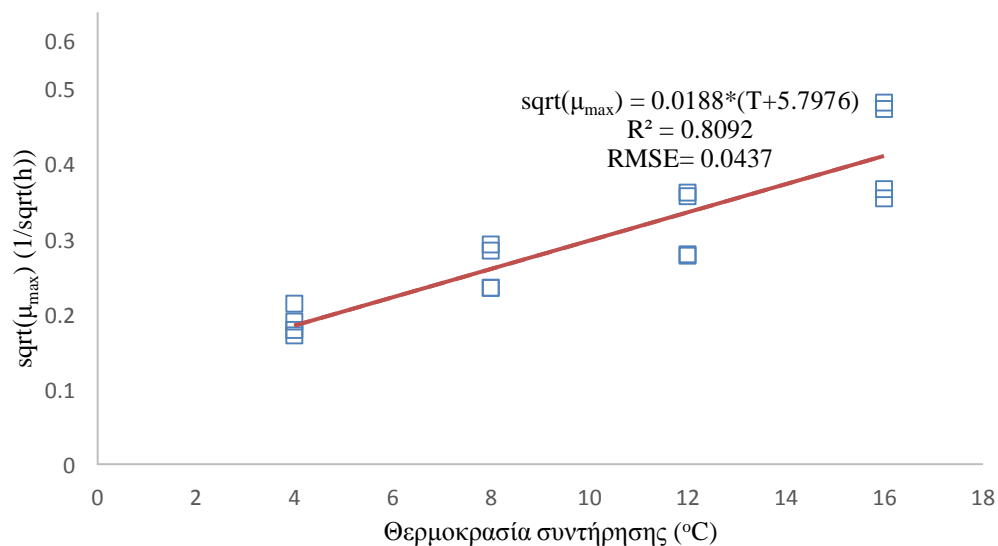
Γράφημα 10: Παραδείγματα από την προσαρμογή του πρωτογενούς μοντέλου των Baranyi και Roberts (1994) (κόκκινη γραμμή) στα πειραματικά δεδομένα (μπλε ρόμβοι) της ανάπτυξης του μικροβιακού πληθυσμού του βακτηρίου *L. monocytogenes*, για τα συντηρημένα δείγματα στους 8 °C (δεξιά καμπύλη) και στους 12 °C (αριστερή καμπύλη).

#### 4.2.3.2. Επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, χρησιμοποιήθηκαν οι τετραγωνικές ρίζες του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης ( $n=16$ , 2 δείγματα για κάθε μία εκ των 2 επαναλήψεων σε κάθε θερμοκρασία) και με τη βοήθεια του δευτερογενούς μοντέλου του Ratkowsky (Ratkowsky et al., 1982), προέκυψαν οι τιμές των  $b=0.0157$  και  $T_{min}=-11.8116$  °C (95% όρια εμπιστοσύνης: -17.2554 και -6.3679) με  $RMSE=0.319$  για την ανάπτυξη της OMX, και οι τιμές των  $b=0.0188$  και  $T_{min}=-5.7976$  °C (95% όρια εμπιστοσύνης: -10.3671 και -1.2280) με  $RMSE=0.0437$  για την ανάπτυξη του βακτηρίου *L. monocytogenes*. Οι συντελεστές προσδιορισμού των δευτερογενών μοντέλων ήταν 0.8460 για την περίπτωση της OMX και 0.8092 για την περίπτωση του βακτηρίου *L. monocytogenes*. Από τα δευτερογενή μοντέλα που προέκυψαν, κατασκευάστηκαν τα ακόλουθα Γραφήματα 11 και 12, τα οποία περιγράφουν την συσχέτιση μεταξύ της ρίζας του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και της εξωγενούς θερμοκρασίας. Είναι ανάγκη να υπογραμμιστεί ότι επειδή η παράμετρος των μοντέλων  $T_{min}$  είναι η τομή του μοντέλου και του άξονα της θερμοκρασίας, αντιπροσωπεύει μόνο θεωρητικά την ελάχιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Κατά συνέπεια, μπορεί η εκτιμώμενη τιμή  $T_{min}$  να είναι σημαντικά χαμηλότερη από την ελάχιστη θερμοκρασία, στην οποία μπορεί να παρατηρηθεί πραγματικά μικροβιακή ανάπτυξη (Ross & Dalgaard, 2003). Σύμφωνα με καταγραφές, το βακτήριο *L. monocytogenes*, μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες λίγο χαμηλότερες των 0 °C σε εργαστηριακά υγρά θρεπτικά υποστρώματα (Bajard et al., 1996; Walker et al. 1990), ενώ σε τρόφιμα η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται μεταξύ 3 και 4 °C (Membré et al. 1990; Ross, 1993; Tienungoon, 2000).



Γράφημα 11: Προσαρμογή (κόκκινη γραμμή) του δευτερογενούς μοντέλου της τετραγωνικής ρίζας του  $\mu_{max}$  του Ratkowsky et al. (1982) στα πειραματικά δεδομένα (μπλε τετράγωνα) για την ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού της OMX και οι αντίστοιχες τιμές  $R^2$  και RMSE.



Γράφημα 12: Προσαρμογή (κόκκινη γραμμή) του δευτερογενούς μοντέλου της τετραγωνικής ρίζας του  $\mu_{max}$  του Ratkowsky et al. (1982) στα πειραματικά δεδομένα (μπλε τετράγωνα) για την ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού της *L. monocytogenes* και οι αντίστοιχες τιμές  $R^2$  και RMSE.

#### 4.2.3.3. Επικύρωση του μοντέλου ανάπτυξης του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*

Η πρόβλεψη της ανάπτυξης του βακτηρίου *L. monocytogenes* υπό δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες διεξήχθη χρησιμοποιώντας τα χρονοθερμοκρασιακά προφίλ των δειγμάτων, το μοντέλο της τετραγωνικής ρίζας για τον προσδιορισμό του στιγμιαίου  $\mu_{max}$  και τις

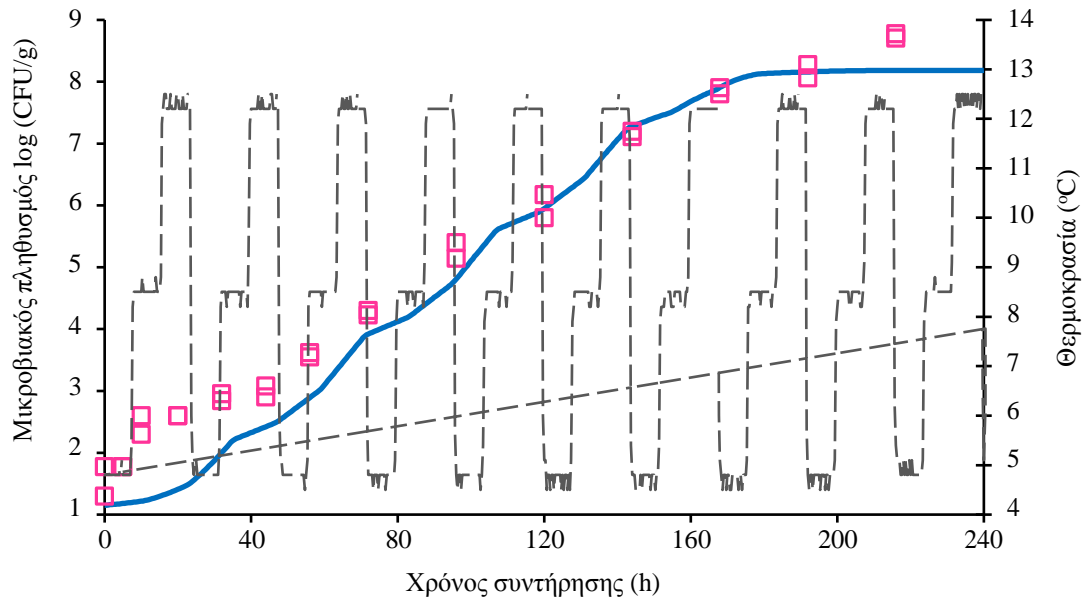
διαφορικές εξισώσεις του μοντέλου Baranyi και Roberts, οι οποίες ολοκληρώθηκαν σε σχέση με το χρόνο. Στα δυναμικά μοντέλα, ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός  $N_0$  ήταν ο μέσος όρος των αρχικών πληθυσμών του παθογόνου βακτηρίου των 4 δειγμάτων που ελέγχθηκαν (2 δείγματα για κάθε επανάληψη του πειράματος), ενώ ο μέγιστος πληθυσμός  $N_{max}$  ήταν ο μέσος όρος των μέγιστων πληθυσμών *L. monocytogenes* που εκτιμήθηκαν από τις μεμονωμένες προσαρμογές καμπύλης κατά τη διάρκεια συντήρησης στις ισόθερμες συνθήκες (4, 8, 12, 16 °C).

Όσον αφορά την παράμετρο  $h_0$ , που αναφέρεται ως “φυσιολογική κατάσταση” και αντιπροσωπεύει το “έργο που πρέπει να γίνει” (“work to be done”) από το κύτταρο για να προσαρμοστεί στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες και να προχωρήσει από τη φάση προσαρμογής στην εκθετική φάση ανάπτυξης (Baranyi & Roberts, 1994), εκτιμήθηκε ως το γινόμενο  $\mu_{max} * \lambda$ , χρησιμοποιώντας τις τιμές των κινητικών παραμέτρων που εκτιμήθηκαν για τις ισόθερμες συνθήκες συντήρησης (4, 8, 12, 16 °C). Η τιμή του  $h_0$  που χρησιμοποιήθηκε στα δυναμικά μοντέλα ήταν ο μέσος όρος των  $h_0$  που υπολογίστηκαν 1.5784 ( $\pm 0.9938$ ).

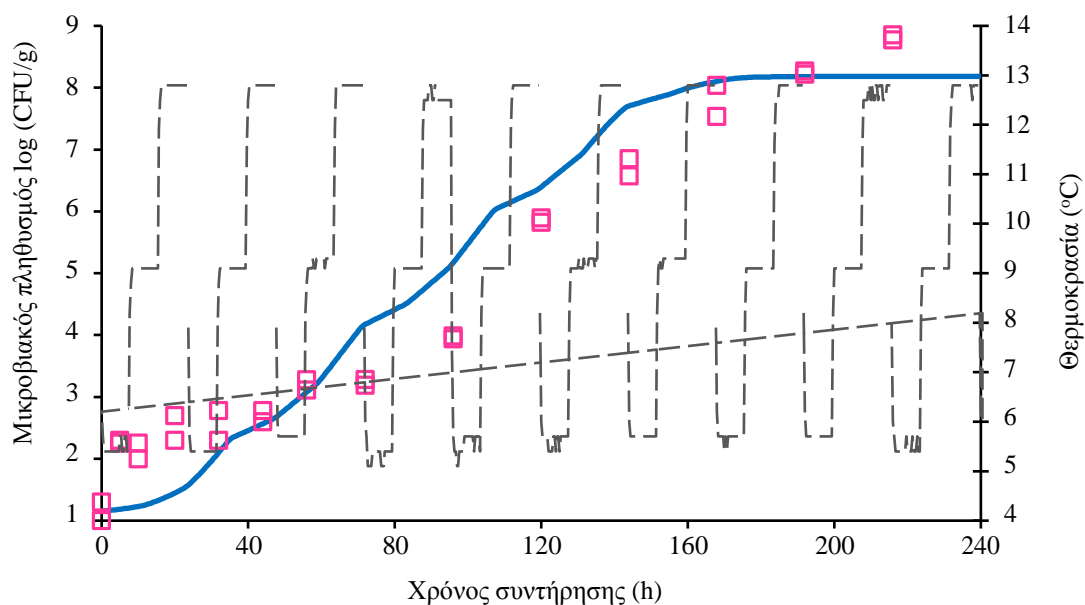
Πραγματοποιήθηκε επικύρωση του μοντέλου με δεδομένα που προέκυψαν ξεχωριστά από δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις του πειράματος υπό συντήρηση σε δυναμικά μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ (8h στους 4 °C, 8h στους 8 °C και 8h στους 12 °C). Αυτό συνέβη, προκειμένου να διαπιστωθεί το πόσο μεγάλη είναι η παραλλακτικότητα που προέρχεται από το ίδιο το προϊόν των κοτομπουκιών. Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι το μοντέλο επέδειξε γενικά καλύτερη απόδοση προβλέποντας την ανάπτυξη του παθογόνου για την 2<sup>η</sup> επανάληψη. Ειδικότερα, οι προβλεπόμενες τιμές για τους μικροβιακούς πληθυσμούς ήταν σχετικά κοντά στις παρατηρούμενες και για τις δύο επαναλήψεις συντήρησης υπό δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ. Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 12 και μέσω του  $A_f$ , για την πρώτη επανάληψη, η μέση απόκλιση των προβλεπόμενων τιμών από τις παρατηρούμενες για το μικροβιακό πληθυσμό είναι της τάξης του 15.7%, ενώ η αντίστοιχη απόκλιση για τη δεύτερη επανάληψη είναι της τάξης του 14.7%. Επίσης, σχετικά με το συντελεστή  $B_f$ , όταν αυτός χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση ενός μοντέλου που περιλαμβάνει μικροβιακά παθογόνα, τιμές στο εύρος 0.90–1.05 και στο εύρος 0.70–0.90 μπορούν να θεωρηθούν καλές και αποδεκτές αντίστοιχα (Mellefont et al., 2003). Άρα η τιμή του συντελεστή μεροληψίας για την 1<sup>η</sup> επανάληψη είναι αποδεκτή, ενώ για τη 2<sup>η</sup> επανάληψη είξναι καλή. Επιπρόσθετα, όπως φαίνεται και γραφικά, το μοντέλο φαίνεται να τείνει να υποεκτιμά τους πληθυσμούς του παθογόνου για την 1<sup>η</sup> επανάληψη (Γράφημα 13), οδηγώντας σε προβλέψεις “fail-dangerous” (των οποίων το σφάλμα ελλοχεύει κίνδυνο). Αντίθετα, αυτή η τάση φαίνεται να είναι αρκετά μικρότερη για τη 2<sup>η</sup> επανάληψη (Γράφημα 14). Παρόμοια συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν με βάση τις τιμές %RE. Έχει προταθεί οι τιμές %RE στο εύρος –30% (fail-safe) έως 15% (fail-dangerous) να οριοθετούν μία “αποδεκτή ζώνη πρόβλεψης” για σκοπούς αξιολόγησης μοντέλων (Lianou et al., 2017). Με βάση το Γράφημα 15, για την 1<sup>η</sup> επανάληψη 6 τιμές %RE ήταν εκτός των αποδεκτών ορίων, ενώ για τη 2<sup>η</sup> επανάληψη 4 μόνο τιμές %RE απομακρύνονταν από την “αποδεκτή ζώνη πρόβλεψης” (Γράφημα 16).

Πίνακας 12: Δείκτες απόδοσης των αναπτυγμένων μοντέλων που προβλέπουν την ανάπτυξη του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε κοιτομπουκιές υπό δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας.

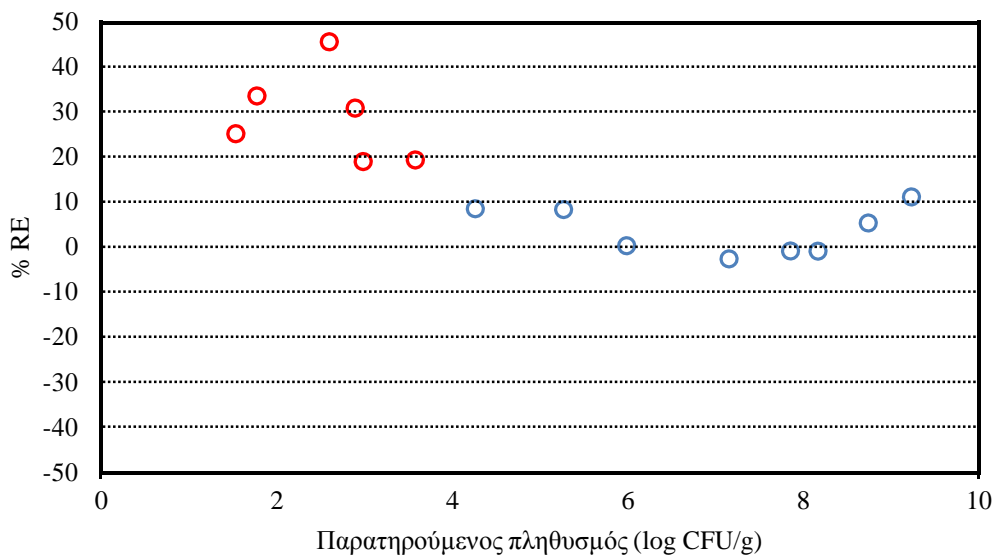
Δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ	Συντελεστής ακρίβειας ( $A_f$ )	Συντελεστής μεροληψίας ( $B_f$ )
1 <sup>η</sup> επανάληψη	1.157	0.866
2 <sup>η</sup> επανάληψη	1.147	0.937



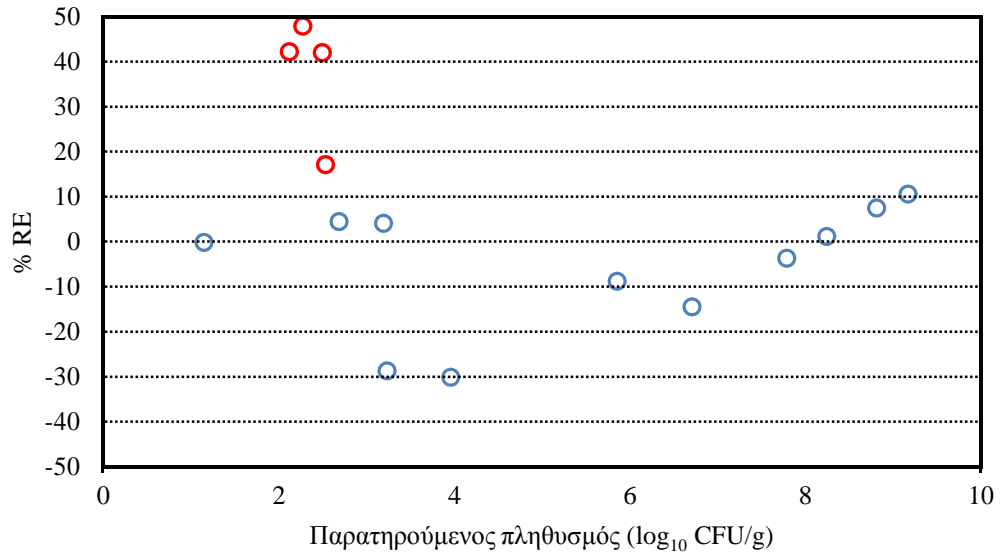
Γράφημα 13: Παρατηρούμενη (σημεία) και προβλέψιμη (συνεχής γραμμή) ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* σε κοιτομπουκιές κατά τη συντήρηση υπό την πρώτη επανάληψη του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ (8h στους 4 °C, 8h στους 8 °C και 8h στους 12 °C) (διακεκομμένη γραμμή).



Γράφημα 14: Παρατηρούμενη (σημεία) και προβλέψιμη (συνεχής γραμμή) ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* σε κοτομπουκιές κατά τη συντήρηση υπό τη δεύτερη επανάληψη του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ (8h στους 4 °C, 8h στους 8 °C και 8h στους 12 °C) (διακεκομμένη γραμμή).



Γράφημα 15: Εκτιμήσεις του ποσοστού του σχετικού σφάλματος ανάμεσα στην παρατηρούμενη και προβλέψιμη ανάπτυξη του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε κοτομπουκιές, κατά τη συντήρηση της πρώτης επανάληψης του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ (8h στους 4 °C, 8h στους 8 °C και 8h στους 12 °C). Με κόκκινο βρίσκονται σημειωμένες οι τιμές % RE που βρίσκονται εκτός αποδεκτής ζώνης πρόβλεψης.



Γράφημα 16: Εκτιμήσεις του ποσοστού του σχετικού σφάλματος ανάμεσα στην παρατηρούμενη και προβλέψιμη ανάπτυξη του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε κοιτομπουκιές, κατά τη συντήρηση της δεύτερης επανάληψης του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ (8h στους 4 °C, 8h στους 8 °C και 8h στους 12 °C). Με κόκκινο βρίσκονται σημειωμένες οι τιμές % RE που βρίσκονται εκτός αποδεκτής ζώνης πρόβλεψης.

## 5. Συμπεράσματα

Όσον αφορά την πρώτη πειραματική ενότητα, η ανάπτυξη των μοντέλων για την αύξηση της OMX και βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* για τη συντήρηση φιλέτου στήθους κοτόπουλου υπό αερόβιες συνθήκες, που έγινε με βάση δεδομένα πολυφασματικής απεικόνισης, εμφάνισε για τη βαθμονόμηση και την επικύρωση ικανοποιητικούς και αρκετά καλούς συντελεστές απόδοσης (RMSE και  $r$ ) στην περίπτωση του μοντέλου της OMX και των ψευδομονάδων αντίστοιχα. Με βάση αυτούς τους συντελεστές μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι αναπτύχθηκε ικανοποιητικό αποδοτικό μοντέλο για την αύξηση της OMX και καλό για την αύξηση των ψευδομονάδων. Από τους συντελεστές B για τα δεδομένα των μέσων ανακλάσεων και των τυπικών αποκλίσεων, προέκυψε ότι τα σημαντικότερα φάσματα αντιστοιχούν σε μήκη κύματος, τα οποία σχετίζονται άμεσα με το κόκκινο χρώμα του κρέατος και αντιστοιχούν στη μυογλοβίνη και παράγωγά της, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

Με τη συλλογή περισσότερων μικροβιολογικών και πολυφασματικών δεδομένων, είναι δυνατή η βελτίωση των παραπάνω μοντέλων. Ακόμη, η διεξαγωγή ανεξάρτητων πειραμάτων είτε σε ενδιάμεσες θερμοκρασίες από αυτές στις οποίες πραγματοποιήθηκαν πειράματα, είτε σε δυναμικά θερμοκρασιακά προφίλ, είναι αναγκαία ώστε να μπορέσει να γίνει πρόβλεψη και εξωτερική επικύρωση των μοντέλων. Επιπλέον, η δημιουργία μοντέλων βασισμένων σε διαφορετικούς αλγόριθμους, όπως είναι τα μη γραμμικά μοντέλα, μπορεί να συμβάλει στην περαιτέρω βελτίωση της εκτίμησης της αλλοίωσης του φιλέτου στήθους κοτόπουλου.

Σχετικά με τη δεύτερη πειραματική ενότητα, από τα μικροβιολογικά αποτελέσματα και τα πρωτογενή μοντέλα ανάπτυξης κατά Baranyi και Roberts για την ανάπτυξη του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes*, επιβεβαιώθηκε ότι το βακτήριο αυτό έχει την ικανότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασίες ψύξης (Chan et al., 2007). Επίσης, με βάση αυτά τα δεδομένα, παρατηρήθηκε ότι μία μεγάλη παραλλακτικότητα μεταξύ των αποτελεσμάτων υπήρξε για τη συντήρηση στους 4 °C, ενώ θεωρητικά μεγαλύτερη παραλλακτικότητα θα έπρεπε να εμφανίζεται μεταξύ των αποτελεσμάτων για τη συντήρηση σε υψηλές θερμοκρασίες. Αυτή η παραλλακτικότητα, εάν δεν οφείλεται σε σφάλμα του αναλυτή, θα μπορούσε να οφείλεται σε μεγάλη παραλλακτικότητα εντός του ίδιου του προϊόντος που δικαιολογείται λόγω πιθανής διαφορετικής σύστασης και φυσιολογικής μικροχλωρίδας, εφόσον πρόκειται για ένα χειροποίητο προϊόν. Ένα ακόμη ασυνήθιστο αποτέλεσμα, ήταν ότι η φάση προσαρμογής του παθογόνου βακτηρίου ήταν μικρότερη για τη χαμηλότερη θερμοκρασία των 4 °C από ότι για τους 8 °C. Αυτό ίσως να μπορεί να αποδοθεί στο ότι πρόκειται για ένα ψυχρότροφο βακτήριο, το οποίο είναι πιθανό να έχει την ικανότητα πιο γρήγορης προσαρμογής σε χαμηλές θερμοκρασίες όπως οι 4 °C από ότι τα υπόλοιπα βακτήρια της χλωρίδας των κοτομπουκιών. Στη υψηλότερη θερμοκρασία όμως, μπορεί τα βακτήρια που ανήκουν στη φυσιολογική μικροχλωρίδα των κοτομπουκιών να προσαρμόζονται πιο εύκολα και να προκύπτει ανταγωνισμός του χαμηλού αρχικού πληθυσμού *L. monocytogenes*, με αποτέλεσμα την αύξηση της φάση προσαρμογής του παθογόνου βακτηρίου. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να υπογραμμιστεί ότι ο ενοφθαλμισμός με πολύ μικρό πληθυσμό του παθογόνου βακτηρίου (10- 100 CFU/g), αποτέλεσε εμπόδιο για την ανάπτυξη αποδοτικότερου μοντέλου για το βακτήριο *L. monocytogenes*, όμως επιλέχθηκε για τη δημιουργία μίας πιο ρεαλιστικής εικόνας, καθώς και στην πραγματικότητα μη σκόπιμες επιμολύνσεις προϊόντων συμβαίνουν με μικρές συγκεντρώσεις επιμολυντών.

Όσον αφορά τα δευτερογενή μοντέλα του Ratkowsky που κατασκευάστηκαν για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, προέκυψαν τιμές  $T_{min}$  αρκετά χαμηλές. Ειδικότερα, η  $T_{min}$  για το τροφιμογενές παθογόνο *L. monocytogenes*, εκτιμήθηκε ότι είναι έως και 5.7 °C υπό το 0. Παρόλα αυτά, αξίζει να τονιστεί ότι, η εκτιμώμενη τιμή  $T_{min}$  είναι φυσιολογικό να παρουσιάζεται ως χαμηλότερη από την ελάχιστη θερμοκρασία πραγματικής μικροβιακής ανάπτυξης, η οποία συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 3 και 4 °C για το βακτήριο *L. monocytogenes* σε τρόφιμα.

Σχετικά με την επικύρωση του μοντέλου ανάπτυξης του βακτηρίου *L. monocytogenes*, είναι απαραίτητο να επισημανθεί ότι αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί η επικύρωση της πρόβλεψης με δεδομένα που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις πειράματος σε δυναμικά μεταβαλλόμενη θερμοκρασία, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παραλλακτικότητα μέσα στο ίδιο το προϊόν των κοτομπουκιών. Παρατηρήθηκε λοιπόν, ότι παρά την εξαιρετικά μικρή διαφορά στη μεταβολή της θερμοκρασίας συντήρησης μεταξύ των δύο πειραματικών επαναλήψεων, υπήρξε αισθητή διαφορά στην απόδοση των μοντέλων. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι η εκτίμηση των προβλεπόμενων τιμών του μικροβιακού πληθυσμού του μοντέλου ήταν πιο κοντά στις παρατηρούμενες τιμές για την πρώτη επανάληψη του πειράματος σε δυναμικό προφίλ, που στηρίχθηκε και από τις τιμές  $B_f$  και τα γραφήματα για το %RE.

Περαιτέρω μελέτες, οι οποίες θα συνέβαλαν στην καλύτερη κατανόηση της ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes* σε κοτομπουκίες, θα μπορούσαν να είναι ο προσδιορισμός με μοριακές αναλύσεις του κυρίαρχου στελέχους του βακτηρίου ανάλογα με τη θερμοκρασία και το χρόνο συντήρησης των κοτομπουκιών, ο προσδιορισμός της ανταγωνιστικής ενάντια στο παθογόνο βακτήριο φυσιολογικής μικροχλωρίδας του προϊόντος με κλασικές μικροβιολογικές και μοριακές αναλύσεις και η αξιολόγηση των μοντέλων που κατασκευάστηκαν με κοτομπουκίες διαφορετικής προέλευσης.



## 6. Βιβλιογραφία

### 6.1. Ξένη βιβλιογραφία

- Abdi, H. (2003). Partial least square regression (PLS regression). *Encyclopedia for research methods for the social sciences*, 6(4), 792-795.
- Adak, G. K., Long, S. M., & O'Brien, S. J. (2002). Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut*, 51(6), 832-841.
- Adams, M. R., & Moss, M. O. Food microbiology 2008. *Cambridge, RSC Publ.*
- Akbar, A., & Anal, A. K. (2013). Prevalence and antibiogram study of Salmonella and Staphylococcus aureus in poultry meat. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(2), 163-168.
- Alonso-Hernando, A., Prieto, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., & Capita, R. (2012). Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of Listeria monocytogenes from poultry in Spain. *Food Control*, 23(1), 37-41.
- Ammor, M. S., Argyri, A., & Nychas, G. J. E. (2009). Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Meat Science*, 81(3), 507-514.
- Andreevskaya, M., Johansson, P., Laine, P., Smolander, O. P., Sonck, M., Rahkila, R., ... & Björkroth, J. (2015). Genome sequence and transcriptome analysis of meat-spoilage-associated lactic acid bacterium lactococcus piscium MKFS47. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(11), 3800-3811.
- Argyri, A. A., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. (2014). Monitoring microbial spoilage of foods by vibrational spectroscopy (FT-IR & Raman). *Novel food preservation and microbial assessment techniques*, 386.
- Armstrong, R. W., & Fung, P. C. (1993). Brainstem encephalitis (rhombencephalitis) due to Listeria monocytogenes: case report and review. *Clinical Infectious Diseases*, 16(5), 689-702.
- Arnaut-Rollier, I., Vauterin, L., De Vos, P., Massart, D. L., Devriese, L. A., De Zutter, L., & Van Hoof, J. (1999). A numerical taxonomic study of the Pseudomonas flora isolated from poultry meat. *Journal of Applied Microbiology*, 87(1), 15-28.
- Arnaut-Rollier, Isabelle, Lieven De Zutter, and Jan Van Hoof. "Identities of the Pseudomonas spp. in flora from chilled chicken." *International journal of food microbiology* 48.2 (1999): 87-96.
- Aureli, P., Fiorucci, G. C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L., & Salmaso, S. (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by Listeria monocytogenes. *New England Journal of Medicine*, 342(17), 1236-1241.
- Bajard, S., Rosso, L., Fardel, G., & Flandrois, J. P. (1996). The particular behaviour of Listeria monocytogenes under sub-optimal conditions. *International journal of food microbiology*, 29(2-3), 201-211.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International journal of food microbiology*, 23(3-4), 277-294.
- Baranyi, J., Roberts, T. A., & McClure, P. (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food microbiology*, 10(1), 43-59.

- Baranyi, J., Robinson, T. P., Kaloti, A., & Mackey, B. M. (1995). Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *International journal of food microbiology*, 27(1), 61-75.
- Barbin, D. F., ElMasry, G., Sun, D. W., & Allen, P. (2013). Non-destructive determination of chemical composition in intact and minced pork using near-infrared hyperspectral imaging. *Food chemistry*, 138(2-3), 1162-1171.
- Barbuddhe, S. B., Doijad, S. P., Goesmann, A., Hilker, R., Poharkar, K. V., Rawool, D. B., ... & Chaudhari, S. (2016). Presence of a widely disseminated *Listeria monocytogenes* serotype 4b clone in India. *Emerging microbes & infections*, 5(6), e55.
- Bartt, R. (2000). *Listeria* and atypical presentations of *Listeria* in the central nervous system. In *Seminars in neurology* (Vol. 20, No. 03, pp. 361-374). Copyright© 2000 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662.
- Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1), 1-20.
- Begley, M., Gahan, C. G., & Hill, C. (2002). Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: adaptation, cross-protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(12), 6005-6012.
- Bergmann, B., Raffelsbauer, D., Kuhn, M., Goetz, M., Hom, S., & Goebel, W. (2002). InlA-but not InlB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins. *Molecular microbiology*, 43(3), 557-570.
- Beuchat, L. R. (1996). *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. *Food Control*, 7(4-5), 223-228.
- Bi, Y., Yuan, K., Xiao, W., Wu, J., Shi, C., Xia, J., ... & Zhou, G. (2016). A local pre-processing method for near-infrared spectra, combined with spectral segmentation and standard normal variate transformation. *Analytica chimica acta*, 909, 30-40.
- Birmingham, C. L., Canadien, V., Gouin, E., Troy, E. B., Yoshimori, T., Cossart, P., ... & Brumell, J. H. (2007). *Listeria monocytogenes* evades killing by autophagy during colonization of host cells. *Autophagy*, 3(5), 442-451.
- Björkroth, J. (2005). Microbiological ecology of marinated meat products. *Meat Science*, 70(3), 477-480.
- Braun, L., Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G., & Cossart, P. (1997). InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Molecular microbiology*, 25(2), 285-294.
- Bruckner, S., Albrecht, A., Petersen, B., & Kreyenschmidt, J. (2012). Characterization and comparison of spoilage processes in fresh pork and poultry. *Journal of Food Quality*, 35(5), 372-382.
- Bruckner, S., Albrecht, A., Petersen, B., & Kreyenschmidt, J. (2013). A predictive shelf life model as a tool for the improvement of quality management in pork and poultry chains. *Food control*, 29(2), 451-460.
- Brunckner, S. (2010). *Predictive shelf life model for the improvement of quality management in meat chains*. PhD Thesis. Universitäts-und Landesbibliothek Bonn.

Bubert, A., Kuhn, M., Goebel, W., & Köhler, S. (1992). Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *Journal of bacteriology*, 174(24), 8166-8171.

- Buchanan, R. L., Gorris, L. G., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food control*, 75, 1-13.
- Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L., & Cossart, P. (2002). Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends in microbiology*, 10(5), 238-245.
- CAMO Software AS. (2006). The Unscrambler Methods. *The Unscrambler Manual*. [www.camo.com](http://www.camo.com)
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., & Garcia-Fernández, M. C. (2001). Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1-2), 75-82.
- Carstensen, J. M., & Folm-Hansen, J. (2003). An apparatus and a method of recording an image of an object, ep1051660.
- Carstensen, J. M., Panagou, S., & Nychas, G. (2009). Quantitative analysis of meat spoilage using VIS/NIR spectral imaging. In *14th International Conference on Near Infrared Spectroscopy (NIR 2009)*.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Multistate outbreak of listeriosis linked to Crave Brothers Farmstead cheeses (final update). *Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA*: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-07-13>.
- Chaillou, S., Chaulot-Talmon, A., Caekebeke, H., Cardinal, M., Christieans, S., Denis, C., ... & Joffraud, J. J. (2015). Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *The ISME journal*, 9(5), 1105.
- Chan, Y. C., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2007).  $\sigma$ B-dependent and  $\sigma$ B-independent mechanisms contribute to transcription of *Listeria monocytogenes* cold stress genes during cold shock and cold growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(19), 6019-6029.
- Chorianopoulos, N. G., Giaouris, E. D., Skandamis, P. N., Haroutounian, S. A., & Nychas, G. J. (2008). Disinfectant test against monoculture and mixed- culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. *Journal of applied microbiology*, 104(6), 1586-1596.
- Cocolin, L., Stella, S., Nappi, R., Bozzetta, E., Cantoni, C., & Comi, G. (2005). Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources. *International journal of food microbiology*, 103(2), 167-178.
- Coffey, A., Van Den Burg, B., Veltman, R., & Abee, T. (2000). Characteristics of the biologically active 35- kDa metalloprotease virulence factor from *Listeria monocytogenes*. *Journal of applied microbiology*, 88(1), 132-141.
- Cohen, N., Ennaji, H., Bouchrif, B., Hassar, M., & Karib, H. (2007). Comparative study of microbiological quality of raw poultry meat at various seasons and for different slaughtering processes in Casablanca (Morocco). *Journal of Applied Poultry Research*, 16(4), 502-508.
- Cole, M. B., Jones, M. V., & Holyoak, C. (1990). The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(1), 63-72.
- Collins, M. D., Wallbanks, S., Lane, D. J., Shah, J., Nietupski, R., Smida, J., ... & Stackebrandt, E. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing

of 16S rRNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(2), 240-246.

CONNER, D. E., SCOTT, V. N., SUMNER, S. S., & BERNARD, D. T. (1989). Pathogenicity of foodborne, environmental and clinical isolates of *Listeria monocytogenes* in mice. *Journal of food science*, 54(6), 1553-1556.

Cortinas, L., Barroeta, A., Villaverde, C., Galobart, J., Guardiola, F., & Baucells, M. D. (2005). Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: Lipid oxidation. *Poultry Science*, 84(1), 48-55.

Cossart, P., & Lecuit, M. (1998). Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin- based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *The EMBO journal*, 17(14), 3797-3806.

Cossart, P., Vicente, M. F., Mengaud, J., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C., & Berche, P. (1989). Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infection and immunity*, 57(11), 3629-3636.

Cotter, P. D., Gahan, C. G., & Hill, C. (2001). A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Molecular microbiology*, 40(2), 465-475.

Daugaard, S. B., Adler-Nissen, J., & Carstensen, J. M. (2010). New vision technology for multidimensional quality monitoring of continuous frying of meat. *Food Control*, 21(5), 626-632.

Díaz, G. C., Tapanes, N. D. L. C. O., Câmara, L. D. T., & Aranda, D. A. (2014). Glycerol conversion in the experimental study of catalytic hydrolysis of triglycerides for fatty acids production using Ni or Pd on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> or SiO<sub>2</sub>. *Renewable energy*, 64, 113-122.

Dissing, B. S., Papadopoulou, O. S., Tassou, C., Ersbøll, B. K., Carstensen, J. M., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. (2013). Using multispectral imaging for spoilage detection of pork meat. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2268-2279.

Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., & Nychas, G. J. E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International journal of food microbiology*, 157(2), 130-141.

Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3819-3822.

Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., ... & Buchrieser, C. (2004). New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infection and immunity*, 72(2), 1072-1083.

Doyle, M. E., Mazzotta, A. S., Wang, T., Wiseman, D. W., & Scott, V. N. (2001). Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*, 64(3), 410-429.

Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., & Cossart, P. (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Molecular microbiology*, 16(2), 251-261.

Dramsi, S., Dehoux, P., Lebrun, M., Goossens, P. L., & Cossart, P. (1997). Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infection and immunity*, 65(5), 1615-1625.

Dransfield E., and Sosnicki A.A. (1999). Relationship between muscle growth and poultry

Dufour, E. (2009). Principles of Infrared Spectroscopy. In: Sun, D. W. (Ed.). *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*. Academic Press. NY.

Economou, V., Zisides, N., Gousia, P., Petsios, S., Sakkas, H., Soutos, N., & Papadopoulou, C. (2015). Prevalence and antimicrobial profile of *Campylobacter* isolates from free-range and conventional farming chicken meat during a 6-year survey. *Food Control*, *56*, 161-168.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards). (2014a). Scientific opinion on the public health risks related to the maintenance of the cold chain during storage and transport of meat. Part 1 (meat of domestic ungulates). *EFSA Journal* 2014. *12*(3):3601.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards). (2014b). Scientific opinion on the public health risks related to the maintenance of the cold chain during storage and transport of meat. Part 2 (minced meat from all species). *EFSA Journal* 2014. *12*(7):3783.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2016). Growth of spoilage bacteria during storage and transport of meat. *EFSA Journal*, *14*(6), e04523.

Ellis, D. I., Broadhurst, D., & Goodacre, R. (2004). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Analytica Chimica Acta*, *514*(2), 193-201.

ElMasry, G., Barbin, D. F., Sun, D. W., & Allen, P. (2012). Meat quality evaluation by hyperspectral imaging technique: an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *52*(8), 689-711.

Enfors S.O. (2008). Food Microbiology. Department of Bioprocess Technology/KTH

Estelles-Lopez, L., Ropodi, A., Pavlidis, D., Fotopoulou, J., Gkousari, C., Peyrodie, A., ... & Mohareb, F. (2017). An automated ranking platform for machine learning regression models for meat spoilage prediction using multi-spectral imaging and metabolic profiling. *Food research international*, *99*, 206-215.

European Commission. (2004). Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 1-54.

European Commission. (2005). Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*, *50*, 1-26.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food- borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, *16*(12), e05500.

European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2013). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food- borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, *11*(4), 3129.

European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food- borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, *13*(12), 4329.

European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food- borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, *13*(1), 3991.

- Faleiro, M. L., Andrew, P. W., & Power, D. (2003). Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *International Journal of Food Microbiology*, 84(2), 207-216.
- Farber, J. M. (1989). Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in foods. *International journal of food microbiology*, 8(3), 285-291.
- Farber, J. M., & Brown, B. E. (1990). Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(6), 1584-1587.
- Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55(3), 476-511.
- Farber, J. M., Daley, E., Coates, F., Beausoleil, N., & Fournier, J. (1991). Feeding trials of *Listeria monocytogenes* with a nonhuman primate model. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(11), 2606-2608.
- Fellenberg M.A., and Speisky H. (2006). Antioxidants: their effects on broiler oxidative
- Feng, C. H., Makino, Y., Oshita, S., & Martín, J. F. G. (2018). Hyperspectral imaging and multispectral imaging as the novel techniques for detecting defects in raw and processed meat products: Current state-of-the-art research advances. *Food control*, 84, 165-176.
- Fontanot, M., Iacumin, L., Cecchini, F., Comi, G., & Manzano, M. (2014). Rapid detection and differentiation of important *Campylobacter* spp. in poultry samples by dot blot and PCR. *Food microbiology*, 43, 28-34.
- Foster, J. W. (2001). Acid stress responses of *Salmonella* and *E. coli*: survival mechanisms, regulation, and implications for pathogenesis. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL-*, 39(2), 89-94.
- Foster, J. W., Park, Y. K., Karem, K., Betts, H., Hall, H. K., & Shaw, E. (1994). Regulatory circuits involved with pH-regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*, 140(2), 341-352.
- Friedman, M. E., & Alm, W. L. (1962). Effect of glucose concentration in the growth medium on some metabolic activities of *Listeria monocytogenes*. *Journal of bacteriology*, 84(2), 375.
- FSAI (Food Safety Authority of Ireland). (2011). Establishing Baseline Data on the Presence of *Listeria monocytogenes* on Cooked Meat Slicers in Retail and Catering Premises.
- Galsworthy, S. B., Girdler, S., & Koval, S. F. (1990). Chemotaxis in *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiologica Hungarica*, 37(1), 81-85.
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International journal of food microbiology*, 113(1), 1-15.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.
- Gaze, J. E., Brown, G. D., Gaskell, D. E., & Banks, J. G. (1989). Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in homogenates of chicken, beef steak and carrot. *Food Microbiology*, 6(4), 251-259.
- Geoffroy, C. L. G. J., Gaillard, J. L., Alouf, J. E., & Berche, P. A. T. R. I. C. K. (1987). Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infection and immunity*, 55(7), 1641-1646.
- George, S. M., & Lund, B. M. (1992). The effect of culture medium and aeration on growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. *Letters in applied microbiology*, 15(2), 49-52.

- Gill, C. O., & Newton, K. G. (1978). The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. *Meat science*, 2(3), 207-217.
- Giotis, E. S., Julotok, M., Wilkinson, B. J., Blair, I. S., & McDowell, D. A. (2008). Role of sigma B factor in the alkaline tolerance response of *Listeria monocytogenes* 10403S and cross-protection against subsequent ethanol and osmotic stress. *Journal of food protection*, 71(7), 1481-1485.
- Goulet, V., & Marchetti, P. (1996). Listeriosis in 225 non-pregnant patients in 1992: clinical aspects and outcome in relation to predisposing conditions. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 28(4), 367-374.
- Goulet, V., Jacquet, C., Vaillant, V., Rebiere, I., Mouret, E., Lorente, C., ... & Rocourt, J. (1995). Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. *Lancet (British edition)*, 345(8964), 1581-1582.
- Gowen, A. A., Feng, Y., Gaston, E., & Valdramidis, V. (2015). Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. *Talanta*, 137, 43-54.
- Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K. S., Daniels, J., & Kuhn, M. (2000). Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: an electron microscopic study. *Infection and immunity*, 68(6), 3275-3279.
- Gromski, P. S., Muhamadali, H., Ellis, D. I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M. L., & Goodacre, R. (2015). A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis—a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica chimica acta*, 879, 10-23.
- Gründling, A., Gonzalez, M. D., & Higgins, D. E. (2003). Requirement of the *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase PC-PLC during infection of human epithelial cells. *Journal of Bacteriology*, 185(21), 6295-6307.
- Gudbjörnsdóttir, B., Suihko, M. L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjöberg, A. M., ... & Bredholt, S. (2004). The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology*, 21(2), 217-225.
- Guide, W. E. (2018). WATT executive guide to world poultry trends.
- Gutekunst, K. A., Pine, L., White, E., Kathariou, S., & Carlone, G. M. (1992). A filamentous-like mutant of *Listeria monocytogenes* with reduced expression of a 60-kilodalton extracellular protein invades and grows in 3T6 and Caco-2 cells. *Canadian journal of microbiology*, 38(8), 843-851.
- Haase, J. K., Didelot, X., Lecuit, M., Korkeala, H., L. monocytogenes MLST Study Group, & Achtman, M. (2014). The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale M ultilocus S equence T yping study. *Environmental microbiology*, 16(2), 405-416.
- Hadjilouka, A., Paramithiotis, S., & Drosinos, E. H. (2015). *Listeria monocytogenes* as a food contaminant; a genomic perspective. *LISTERIA MONOCYTOGENES INCIDENCE, GROWTH BEHAVIOR*, 1.
- Hain, T., Steinweg, C., & Chakraborty, T. (2006). Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. *Journal of biotechnology*, 126(1), 37-51.
- Hamad, S. H. (2012). Factors Affecting the Growth of Microorganisms in Food. In *Progress in Food Preservation* (eds R. Bhat, A. Karim Alias and G. Paliyath). doi:10.1002/9781119962045.ch20.
- Hamon, M. A., Ribet, D., Stavru, F., & Cossart, P. (2012). Listeriolysin O: the Swiss army knife of *Listeria*. *Trends in microbiology*, 20(8), 360-368.



- Harada, T., Nguyen, D. P., Nguyen, T. A. D., Sakamoto, M., Ohkuma, M., Motooka, D., ... & Kawahara, R. (2016). *Enterococcus saigonensis* sp. nov., isolated from retail chicken meat and liver. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(10), 3779-3785.
- Hashem, F., & Parveen, S. (2016). Salmonella and Campylobacter: Antimicrobial resistance and bacteriophage control in poultry. *Food Microbiology*, 53, 104-109.
- Hinton Jr, A., Cason, J. A., & Ingram, K. D. (2004). Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, 91(2), 155-165.
- Hinton Jr, A., Cason, J. A., & Ingram, K. D. (2004). Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, 91(2), 155-165.
- Hof, H. (2003). History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(3), 199-202.
- Höll, L., Behr, J., & Vogel, R. F. (2016). Identification and growth dynamics of meat spoilage microorganisms in modified atmosphere packaged poultry meat by MALDI-TOF MS. *Food microbiology*, 60, 84-91.
- Huang, L. (2016). Evaluating the performance of a new model for predicting the growth of *Clostridium perfringens* in cooked, uncured meat and poultry products under isothermal, heating, and dynamically cooling conditions. *Journal of food science*, 81(7), M1754-M1765.
- Hue, O., Allain, V., Laisney, M. J., Le Bouquin, S., Lalande, F., Petetin, I., ... & Santolini, J. (2011). Campylobacter contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with Salmonella contamination. *Food microbiology*, 28(5), 862-868.
- Hyden, P., Pietzka, A., Lennkh, A., Murer, A., Springer, B., Blaschitz, M., ... & Sensen, C. W. (2016). Whole genome sequence-based serogrouping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Journal of biotechnology*, 235, 181-186.
- International Organization for Standardization (ISO). (1996). "Microbiology of Food and Animal".
- International Standardization Organization (ISO). (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method. Modification of the enumeration medium. ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004(E). Geneva, Switzerland.
- Jääskeläinen, E., Johansson, P., Kostianen, O., Nieminen, T., Schmidt, G., Somervuo, P., ... & Björkroth, J. (2013). Significance of heme-based respiration in meat spoilage caused by *Leuconostoc gasicomitatum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(4), 1078-1085.
- Jääskeläinen, E., Vesterinen, S., Parshintsev, J., Johansson, P., Riekkola, M. L., & Björkroth, J. (2015). Production of buttery-odor compounds and transcriptome response in *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* LMG18811T during growth on various carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(6), 1902-1908.
- Jackson, B. R., Griffin, P. M., Cole, D., Walsh, K. A., & Chai, S. J. (2013). Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food commodities, United States, 1998–2008. *Emerging infectious diseases*, 19(8), 1239.
- James, C., Vincent, C., de Andrade Lima, T. I., & James, S. J. (2006). The primary chilling of poultry carcasses—a review. *International Journal of Refrigeration*, 29(6), 847-862.

- Jørgensen, F., Stephens, P. J., & Knöchel, S. (1995). The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(3), 274-281.
- Juneja, V. K., Baker, D. A., Thippareddi, H., Snyder Jr, O. P., & Mohr, T. B. (2013). Growth potential of *Clostridium perfringens* from spores in acidified beef, pork, and poultry products during chilling. *Journal of food protection*, 76(1), 65-71.
- Junttila, J. R., Niemelä, S. I., & Hirn, J. (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria. *Journal of Applied Bacteriology*, 65(4), 321-327.
- Kagkli, D. M., Iliopoulos, V., Stergiou, V., Lazaridou, A., & Nychas, G. J. (2009). Differential *Listeria monocytogenes* strain survival and growth in Katiki, a traditional Greek soft cheese, at different storage temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(11), 3621-3626.
- Kastbjerg, V. G., Larsen, M. H., Gram, L., & Ingmer, H. (2010). Influence of sublethal concentrations of common disinfectants on expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(1), 303-309.
- Kenney, S. J., & Beuchat, L. R. (2004). Survival, growth, and thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in products containing peanut and chocolate. *Journal of food protection*, 67(10), 2205-2211.
- Kolb-Mäurer, A., Gentschev, I., Fries, H. W., Fiedler, F., Bröcker, E. B., Kämpgen, E., & Goebel, W. (2000). *Listeria monocytogenes*-infected human dendritic cells: uptake and host cell response. *Infection and immunity*, 68(6), 3680-3688.
- Koort, J., Murros, A., Coenye, T., Eerola, S., Vandamme, P., Sukura, A., & Björkroth, J. (2005). *Lactobacillus oligofermentans* sp. nov., associated with spoilage of modified-atmosphere-packaged poultry products. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(8), 4400-4406.
- Koutsoumanis, K. P., Kendall, P. A., & Sofos, J. N. (2003). Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12), 7514-7516.
- Koutsoumanis, K. P., Stamatiou, A. P., Drosinos, E. H., & Nychas, G. J. (2008). Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food microbiology*, 25(7), 915-921.
- Koutsoumanis, K., & Taoukis, P. S. (2005). Meat safety, refrigerated storage and transport: modeling and management. In *Improving the safety of fresh meat* (pp. 503-561). Woodhead Publishing.
- Krupa, P., Bystron, J., Bania, J., Podkowik, M., Empel, J., & Mroczkowska, A. (2014). Genotypes and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* from chicken and chicken meat in Poland. *Poultry science*, 93(12), 3179-3186.
- Kuhn, M., & Goebel, W. (2007). Molecular virulence determinants of *Listeria monocytogenes*. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 161, 111.
- Kuhn, M., Scortti, M., Vázquez-Boland J.A. (2008). "Pathogenesis." In Liu Dongyou (ed.), *Handbook of Listeria monocytogenes*. CRC Press. pp. 97-135.
- Lebert, I., Begot, C., & Lebert, A. (1998). Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8–7.0), water activity (0.97–1.00) and temperature (7–25 °C). *International journal of food microbiology*, 39(1-2), 53-60.

- Lebreton, A., Stavru, F., Brisse, S., & Cossart, P. (2016). 1926–2016: 90 Years of listeriology. *Microbes and infection*, *18*(12), 711-723.
- Lecuit, P. Cossart. (2001). *Listeria monocytogenes*, in: M. Sussman (Ed.), *Molecular Medical Microbiology*, Academic Press, London.
- Lecuit, M. (2005). Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. *Clinical Microbiology and Infection*, *11*(6), 430-436.
- Lecuit, M. (2007). Human listeriosis and animal models. *Microbes and infection*, *9*(10), 1216-1225.
- Lecuit, M., Nelson, D. M., Smith, S. D., Khun, H., Huerre, M., Vacher-Lavenu, M. C., ... & Cossart, P. (2004). Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(16), 6152-6157.
- Leung, N., Gianfelice, A., Gray-Owen, S. D., & Ireton, K. (2013). Impact of the *Listeria monocytogenes* protein InlC on infection in mice. *Infection and immunity*, *81*(4), 1334-1340.
- Lianou, A., & Sofos, J. N. (2007). A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of food protection*, *70*(9), 2172-2198.
- Lindquist, S., and E. A. Craig. (1988). "The heat-shock proteins." *Annual review of genetics* 22.1: 631-677.
- Liu, Y., Lyon, B. G., Windham, W. R., Realini, C. E., Pringle, T. D. D., & Duckett, S. (2003). Prediction of color, texture, and sensory characteristics of beef steaks by visible and near infrared reflectance spectroscopy. A feasibility study. *Meat Science*, *65*(3), 1107-1115.
- Lou, Y., & Yousef, A. E. (1997). Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl. Environ. Microbiol.*, *63*(4), 1252-1255.
- Mackey, B. M., & Bratchell, N. (1989). The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, *9*(3), 89-94.
- Mackey, B. M., Pritchett, C., Norris, A., & Mead, G. C. (1990). Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. *Letters in Applied Microbiology*, *10*(6), 251-255.
- Maezawa, Y., Hirasawa, A., Abe, T., Kawamura, H., Sekiguchi, K., Kunitomo, M., ... & Nishikawa, T. (2002). Successful treatment of listerial brain abscess: a case report and literature review. *Internal medicine*, *41*(11), 1073-1078.
- Marquis, H., Goldfine, H., & Portnoy, D. A. (1997). Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *The Journal of cell biology*, *137*(6), 1381-1392.
- MARSHALL, D. L., WIESE-LEHIGH, P. L., WELLS, J. H., & FARR, A. J. (1991). Comparative Growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on Precooked Chicken Nuggets Stored under Modified Atmospheres. *Journal of Food Protection*, *54*(11), 841-843.
- Marth, E. H. (1986, October). BEHAVIOR OF LISTERIA-MONOCYTOGENES IN MILK AND CHEESE. In *Journal of Food Protection* (Vol. 49, No. 10, pp. 849-849). 6200 AURORA AVE SUITE 200W, DES MOINES, IA 50322-2838: INT ASSOC MILK FOOD ENVIRONMENTAL SANITARIANS, INC.
- MathWorks, 2019. *Introducing Machine Learning*. Matlab e-Book. WathWorks Inc.

- Mazzotta, A. S., & Gombas, D. E. (2001). Heat resistance of an outbreak strain of *Listeria monocytogenes* in hot dog batter. *Journal of food protection*, 64(3), 321-324.
- McKellar, R. C., & Lu, X. (2003). *Modeling microbial responses in food*. CRC press.
- McLauchlin, J. (1987). *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *Journal of applied bacteriology*, 63(1), 1-11.
- McLauchlin, J. (1996). The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food control*, 7(4-5), 187-193.
- McLauchlin, J., Mitchell, R., Smerdon, W. J., & Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International journal of food microbiology*, 92(1), 15-33.
- McMeekin, T. A. (2007). Predictive microbiology: quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. *Meat science*, 77(1), 17-27.
- Mead, GC. (2004). Microbiological quality of poultry meat: a review. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 6(3), 135-142. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2004000300001>.
- meat quality. *Poultry Science* 78, 743–746.
- Mellefont, L. A., McMeekin, T. A., & Ross, T. (2003). Performance evaluation of a model describing the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth of *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology*, 82(1), 45-58.
- Membré, J. M., Ross, T., & McMeekin, T. (1999). Behaviour of *Listeria monocytogenes* under combined chilling processes. *Letters in applied microbiology*, 28(3), 216-220.
- Méndez JD, Xie J, Méndez-Valenzuela V, Martínez JL (2018) The Combination of L-lysine and Alloxan Induces Acute Necrotizing Pancreatitis in Rats. *J Diabetes Treat*: 148. DOI: 10.29011/2574-7568.000048.
- Mengaud, J., Geoffroy, C., & Cossart, P. (1991). Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infection and immunity*, 59(3), 1043-1049.
- Mohr, T. B., Juneja, V. K., Thippareddi, H. H., Schaffner, D. W., Bronstein, P. A., Silverman, M., & Cook Jr, L. V. (2015). Assessing the performance of *Clostridium perfringens* cooling models for cooked, uncured meat and poultry products. *Journal of food protection*, 78(8), 1512-1526.
- Mukherjee, K., Altincicek, B., Hain, T., Domann, E., Vilcinskis, A., & Chakraborty, T. (2010). *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(1), 310-317.
- Murray, E. G. D., Webb, R. A., & Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(4), 407-439.
- Mylonakis, E., Hohmann, E. L., & Calderwood, S. B. (1998). Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. *Medicine*, 77(5), 313-336.
- Ndob, A. M., Melas, M., & Lebert, A. (2015). *Physical-chemical Properties of Foods: New Tools for Prediction*. Elsevier.
- Nieminen, T. T., Koskinen, K., Laine, P., Hultman, J., Såde, E., Paulin, L., ... & Auvinen, P. (2012). Comparison of microbial communities in marinated and unmarinated broiler meat by metagenomics. *International journal of food microbiology*, 157(2), 142-149.

- Nieminen, T. T., Väliälä, H., Säde, E., Paloranta, A., Koskinen, K., & Björkroth, J. (2012). The effect of marination on lactic acid bacteria communities in raw broiler fillet strips. *Frontiers in microbiology*, 3, 376.
- Nychas, G. J. E., Marshall, D. L., & Sofos, J. N. (2007). Meat, poultry, and seafood. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition* (pp. 105-140). American Society of Microbiology.
- Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Mohareb, F. (2016). Novel approaches for food safety management and communication. *Current Opinion in Food Science*, 12, 13-20.
- Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat science*, 78(1-2), 77-89.
- Nyfeldt, A. (1929). Etiologie de la mononucleose infectieuse. *CR Soc. Biol*, 101, 590-591.
- Oakley, B. B., Morales, C. A., Line, J. E., Seal, B. S., & Hiatt, K. L. (2012). Application of high-throughput sequencing to measure the performance of commonly used selective cultivation methods for the foodborne pathogen *Campylobacter*. *FEMS microbiology ecology*, 79(2), 327-336.
- O'driscoll, B., Gahan, C., & Hill, C. (1997). Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis Analysis of the Acid Tolerance Response in *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(7), 2679-2685.
- Orsi, R. H., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(12), 5273-5287.
- Orsi, R. H., den Bakker, H. C., & Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(2), 79-96.
- Orsi, R. H., den Bakker, H. C., & Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(2), 79-96.
- Oscar, T. E. (2005). Validation of lag time and growth rate models for *Salmonella* Typhimurium: acceptable prediction zone method. *Journal of Food Science*, 70(2), M129-M137.
- Ottaviani, F., Ottaviani, M., & Agosti, M. (1997). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes* [foods]. *Industria Alimentari (Italy)*.
- Pagán, R., Condón, S., & Sala, F. J. (1997). Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(8), 3225-3232.
- Painter, J., & Slutsker, L. (2007). Listeriosis in humans. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 161, 85.
- Palmer, M. (2001). The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon*, 39(11), 1681-1689.
- Panagou, E. Z., Papadopoulou, O., Carstensen, J. M., & Nychas, G. J. E. (2014). Potential of multispectral imaging technology for rapid and non-destructive determination of the microbiological quality of beef filets during aerobic storage. *International journal of food microbiology*, 174, 1-11.

- Papadopoulou, O., Panagou, E. Z., Tassou, C. C., & Nychas, G. J. (2011). Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Research International*, 44(10), 3264-3271.
- Paramithiotis, S., Hadjilouka, A., & Drosinos, E. H. (2014). Listeria pathogenicity island 1. Structure and function. *Listeria monocytogenes: Food Sources, Prevalence and Management Strategies*. Nova Publishers, 265-282.
- Parida, S. K., Domann, E., Rohde, M., Müller, S., Darji, A., Hain, T., ... & Chakraborty, T. (1998). Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of Listeria monocytogenes into human endothelial cells. *Molecular microbiology*, 28(1), 81-93.
- Parish, M. E., & Higgins, D. P. (1989). Survival of Listeria monocytogenes in low pH model broth systems. *Journal of Food Protection*, 52(3), 144-147.
- Patchett, R. A., Kelly, A. F., & Kroll, R. G. (1991). Respiratory activity in Listeria monocytogenes. *FEMS microbiology letters*, 78(1), 95-98.
- Pawar S.C., Sarate R.M., Ghosh J.S. (2011). Spoilage of chilled chicken meat and liver by psychrophilic lipase. *American Journal of Food Technology* 6, 166-172.
- Phan- Thanh, L., & Mahouin, F. (1999). A proteomic approach to study the acid response in Listeria monocytogenes. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 20(11), 2214-2224.
- Pine, L., Malcolm, G. B., Brooks, J. B., & Daneshvar, M. I. (1989). Physiological studies on the growth and utilization of sugars by Listeria species. *Canadian journal of microbiology*, 35(2), 245-254.
- Pinner, Robert W., et al. "Role of Foods in Sporadic Listeriosis: II. Microbiologic and Epidemiologic Investigation." *Jama* 267.15 (1992): 2046-2050.
- Pooni, G. S., Mead, G. C. 1984. Prospective use of temperature function integration for predicting the shelf-life of non-frozen poultry-meat products. *Food Microbiology*, 1(1), 67-78.
- Portnoy, D. A., Jacks, P. S., & Hinrichs, D. J. (1988). Role of hemolysin for the intracellular growth of Listeria monocytogenes. *Journal of Experimental Medicine*, 167(4), 1459-1471.
- Praveen, P. K., Debnath, C., Shekhar, S., Dalai, N., & Ganguly, S. (2016). Incidence of Aeromonas spp. infection in fish and chicken meat and its related public health hazards: A review. *Veterinary world*, 9(1), 6.
- Premaratne, R. J., Lin, W. J., & Johnson, E. A. (1991). Development of an improved chemically defined minimal medium for Listeria monocytogenes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(10), 3046-3048.
- Raffelsbauer, D., Bubert, A., Engelbrecht, F., Scheinpflug, J., Simm, A., Hess, J., ... & Goebel, W. (1998). The gene cluster inlC2DE of Listeria monocytogenes contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Molecular and General Genetics MGG*, 260(2-3), 144-158.
- Rahkila, R., Johansson, P., Säde, E., & Björkroth, J. (2011). Identification of Enterococci from Broiler Products and a Broiler Processing Plant and Description of Enterococcus viikkiensis sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(4), 1196-1203.
- Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T. A., & Ball, A. (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of bacteriology*, 149(1), 1-5.
- Raveneau, J. A. C. Q. U. E. S., Geoffroy, C. H. R. I. S. T. I. A. N. E., Beretti, J. L., Gaillard, J. L., Alouf, J. E., & Berche, P. (1992). Reduced virulence of a Listeria monocytogenes phospholipase-

deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infection and immunity*, 60(3), 916-921.

Regulation, E. C. (2004). No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Union L*, 226, 22-82.

Rocourt, J. and Cossart, P. (1997). *Listeria monocytogenes*. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville, *Food microbiology fundamentals and frontiers*. pp. 352-337. Washington, DC: ASM Press.

Roche, M.S., Velge, P., Liu, D. (2008). "Virulence determination." In Liu Dongyou (ed.). *Handbook of Listeria monocytogenes*. CRC Press pp. 241-270.

Rocourt, J. O. C. E. L. Y. N. E., & Buchrieser, C. (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 161, 1.

Rodriguez-Romo, L. A., & Yousef, A. E. (2005). Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by ozone and UV radiation. *Journal of Food Protection*, 68(4), 711-717.

Romia, M.B, Bernardez, M.A. (2009). Multivariate Calibration of Quantitative Analysis. In: Sun D.W.(ed.) *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Oxford: Elsevier Inc.

Romick, T. L., Fleming, H. P., & McFeeters, R. F. (1996). Aerobic and anaerobic metabolism of *Listeria monocytogenes* in defined glucose medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(1), 304-307.

Ropodi, A. I., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. (2016). Data mining derived from food analyses using non-invasive/non-destructive analytical techniques; determination of food authenticity, quality & safety in tandem with computer science disciplines. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 11-25.

Ropodi, A., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2013, September). Assessment of microbiological quality and authenticity of minced meat using multispectral image analysis. In *8th International Conference on Predictive Modelling in Food, Paris-France, Oral Presentation*.

Ross, T. (1993). *A philosophy for the development of kinetic models in predictive microbiology* (Doctoral dissertation, University of Tasmania).

Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*, 81(5), 501-508.

Ross, T., Dalgaard, P. (2003). Secondary Models. In: McKellar, R.C., Lu, X.(eds.) *Modeling Microbial Responses in Food*. Florida: CRC Press.

Rouger, A., Remenant, B., Prévost, H., & Zagorec, M. (2017). A method to isolate bacterial communities and characterize ecosystems from food products: Validation and utilization in as a reproducible chicken meat model. *International journal of food microbiology*, 247, 38-47.

Russell, S. M. (2008). The effect of an acidic, copper sulfate-based commercial sanitizer on indicator, pathogenic, and spoilage bacteria associated with broiler chicken carcasses when applied at various intervention points during poultry processing. *Poultry science*, 87(7), 1435-1440.

Sabet, C., Lecuit, M., Cabanes, D., Cossart, P., & Bierne, H. (2005). LPXTG protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. *Infection and immunity*, 73(10), 6912-6922.

- Sabet, C., Lecuit, M., Cabanes, D., Cossart, P., & Bierne, H. (2005). LPXTG protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. *Infection and immunity*, 73(10), 6912-6922.
- Såde, E., Murros, A., & Björkroth, J. (2013). Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry. *Food microbiology*, 34(2), 252-258.
- Sauders, B.D. and Wiedmann, M. (2007) .“Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment.” In E.T Ryser and E.H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety* (3rd edn.). Boca Raton, FL: CRC Press pp. 21-53.
- Schlech III, W. F. (1997). *Listeria gastroenteritis*—old syndrome, new pathogen.
- Schlech III, W. F., & Acheson, D. (2000). Foodborne listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, 31(3), 770-775.
- School of Biotechnology. Stockholm 2008.
- Scotti, Mariela, et al. (2007). "The PrfA virulence regulon." *Microbes and Infection* 9.10. 1196-1207.
- Seeliger, H. P. R., & Höhne, K. (1979). Chapter II serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In *Methods in microbiology* (Vol. 13, pp. 31-49). Academic Press.
- Seeliger, H. P. R., and Jonesy, D. (1986): Genus *Listeria* pirie 1940. In Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2, P. H. A. Sneathy, N. S. Mair, N. E. Sharpe, and J. G. Holt (Eds.)
- Seeliger, H. P., & Bockemühl, J. (1968). Critical studies on the question of acapsular formation in *Listeria monocytogenes*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 1. Abt. Medizinisch-hygienische Bakteriologie, Virusforschung und Parasitologie. Originale*, 206(2), 216.
- Sergelidis, D., & Abraham, A. (2009). Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. *Food control*, 20(1), 1-10.
- Shabala, L., Budde, B., Ross, T., Siegumfeldt, H., & McMeekin, T. (2002). Responses of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability monitored by measurements of intracellular pH and viable counts. *International journal of food microbiology*, 75(1-2), 89-97.
- Shahamat, M., Seaman, A., & Woodbine, M. (1980). Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations. *Zentralblatt für Bakteriologie. 1. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, 246(4), 506-511.
- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health.
- Shen, A., & Higgins, D. E. (2006). The MogR transcriptional repressor regulates nonhierarchical expression of flagellar motility genes and virulence in *Listeria monocytogenes*. *PLoS pathogens*, 2(4), e30.
- Silva C.M.G. and Gloria M.B.A. (2002). Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4 oC and in chicken-based meat products. *Food Chemistry* 78, 241–248.
- stress and its meat oxidative stability. *World's Poultry Science Journal* 62, 53-70.
- Suárez, M., González- Zorn, B., Vega, Y., Chico- Calero, I., & Vázquez- Boland, J. A. (2001). A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cellular microbiology*, 3(12), 853-864.



- Swaminathan, B. (2001). *Listeria monocytogenes*. In: M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville (eds), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd edition. ASM Press, Washington DC pp. 383–409.
- Tabouret, M., De Rycke, J., Audurier, A., & Poutrel, B. (1991). Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* isolates in immunocompromised mice in relation to listeriolysin production. *Journal of Medical Microbiology*, 34(1), 13-18.
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D. A., McMeekin, T. A., & Ross, T. (2000). Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(11), 4979-4987.
- Tsakanikas, P., Pavlidis, D., & Nychas, G. J. (2015). High throughput multispectral image processing with applications in food science. *PLoS one*, 10(10), e0140122.
- Tsakanikas, P., Pavlidis, D., Panagou, E., & Nychas, G. J. (2016). Exploiting multispectral imaging for non-invasive contamination assessment and mapping of meat samples. *Talanta*, 161, 606-614.
- USDA Food Composition Databases. (2019). Software developed by the National Agricultural Library v.3.9.5.2\_2019-05-07. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/333978>
- Van Nierop, W., Duse, A. G., Marais, E., Aithma, N., Thothobolo, N., Kassel, M., ... & Bloomfield, S. F. (2005). Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology*, 99(1), 1-6.
- Vasseur, C., Baverel, L., Hebraud, M., & Labadie, J. (1999). Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of applied microbiology*, 86(3), 469-476.
- Vermeulen, A., Gysemans, K. P. M., Bernaerts, K., Geeraerd, A. H., Debevere, J., Devlieghere, F., & Van Impe, J. F. (2009). Modelling the influence of the inoculation level on the growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* as a function of pH, aw and acetic acid. *International journal of food microbiology*, 135(2), 83-89.
- Voet, D., Voet, J.G. (2005). *Biochemistry* (3 izd.). Wiley. ISBN 978-0-471-19350-0.
- Vogel, B. F., Hansen, L. T., Mordhorst, H., & Gram, L. (2010). The survival of *Listeria monocytogenes* during long term desiccation is facilitated by sodium chloride and organic material. *International journal of food microbiology*, 140(2-3), 192-200.
- Wagner, M., and J. McLauchlin. (2008). *Listeria monocytogenes: biology*. W: *Handbook of Listeria monocytogenes*, Red. Liu D., New York: 3-20.
- Walker, S. J., Archer, P., & Banks, J. G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 68(2), 157-162.
- Wang, G. Y., Wang, H. H., Han, Y. W., Xing, T., Ye, K. P., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2017). Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken in vitro and in situ. *Food microbiology*, 63, 139-146.
- Ward, T. J., Ducey, T. F., Usgaard, T., Dunn, K. A., & Bielawski, J. P. (2008). Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(24), 7629-7642.

- Wassenaar, T.M.; Newell, D.G. (2006). The genus *Campylobacter*. *In the Prokaryotes: Vol. 7: proteobacteria: delta and epsilon subclasses. Deeply rooting bacteria*. Springer Science & Business Media.
- Waterman, S. R., & Small, P. L. C. (1998). Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(10), 3882-3886.
- Waters, A. E., Contente-Cuomo, T., Buchhagen, J., Liu, C. M., Watson, L., Pearce, K., ... & Keim, P. S. (2011). Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US meat and poultry. *Clinical Infectious Diseases*, 52(10), 1227-1230.
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., & den Bakker, H. C. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(1), 286-292.
- Wilkins, P. O., Bourgeois, R., & Murray, R. G. E. (1972). Psychrotrophic properties of *Listeria monocytogenes*. *Canadian journal of microbiology*, 18(5), 543-551.
- Wing, E. J., & Gregory, S. H. (2002). *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *The Journal of infectious diseases*, 185(Supplement\_1), S18-S24.
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 58(2), 109-130.
- Wood, L. V., & Woodbine, M. (1979). Low temperature virulence of *Listeria monocytogenes* in the avian embryo. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*, 243(1), 74-81.
- Wood, S., Maroushek, N., & Czuprynski, C. J. (1993). Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. *Infection and immunity*, 61(7), 3068-3072.
- Yousef, A. E., & Courtney, P. D. (2003). Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. *Microbial stress adaptation and food safety*, 1, 1-30.
- Zhang, Q. Q., Han, Y. Q., Cao, J. X., Xu, X. L., Zhou, G. H., & Zhang, W. Y. (2012). The spoilage of air-packaged broiler meat during storage at normal and fluctuating storage temperatures. *Poultry science*, 91(1), 208-214.
- Zwietering, M. H., Wiltjes, T., DE WIT, J. C., & RIET, K. V. T. (1992). A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection*, 55(12), 973-979.

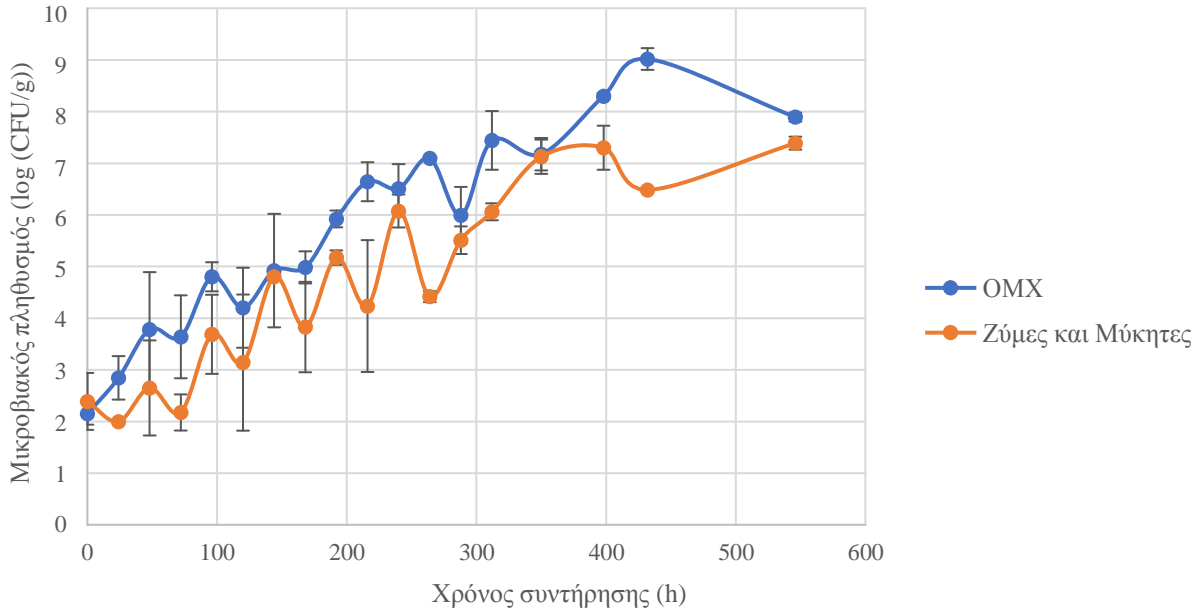
## 6.2. Ελληνική βιβλιογραφία

- Βουδούρης Ε.Κ., Κοντομηνάς Μ.Γ. (2002). Εισαγωγή στην Χημεία Τροφίμων. ΟΕΔΒ, Αθήνα, έκδοση 2002.
- Γιατράκου, Β. (2010). *Μελέτη της ποιότητας και υγιεινής ενός νωπού προϊόντος πουλερικών (σουβλάκι κοτόπουλο/πιπεριά): επίδραση του συνδυασμού συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας και θυμαρέλαιου/χιτοζάνης* (Doctoral dissertation, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Χημείας).
- Μαυρουδής, Η. (2015). Τεχνικές ανάλυσης εικόνας/σήματος με εφαρμογές στον έλεγχο της ποιότητας και ασφάλειας τροφίμων.

Σπυρέλλη, Ε. (2018). Αντικατάσταση μικροβιολογικών αναλύσεων χοιρινού κιμά με τη χρήση αισθητήρων.

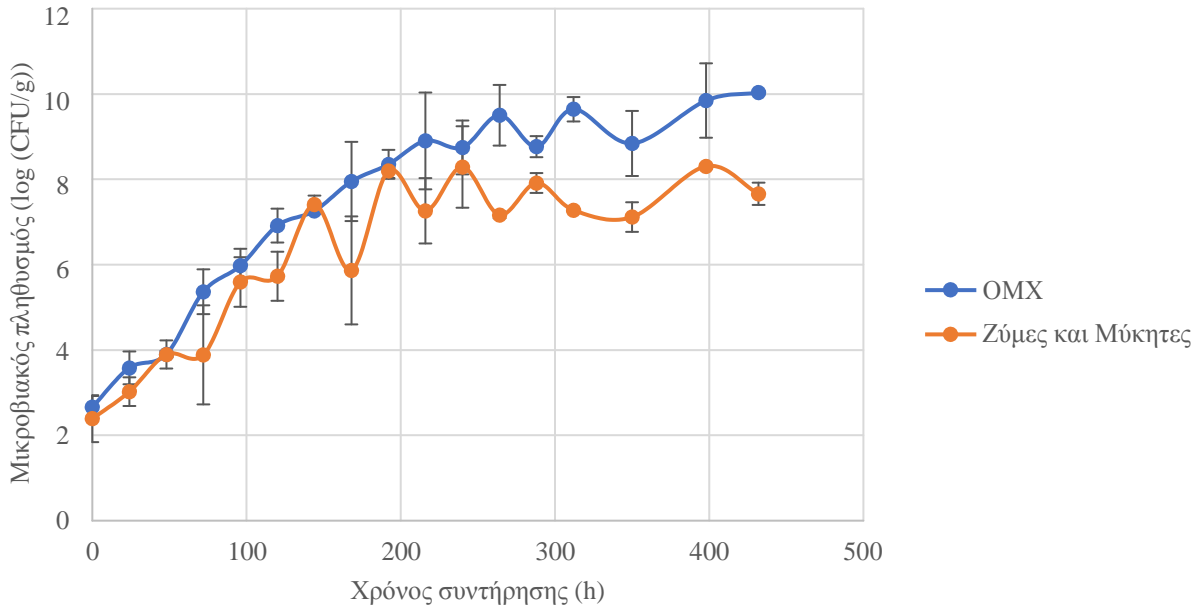
## Παράρτημα

4 °C

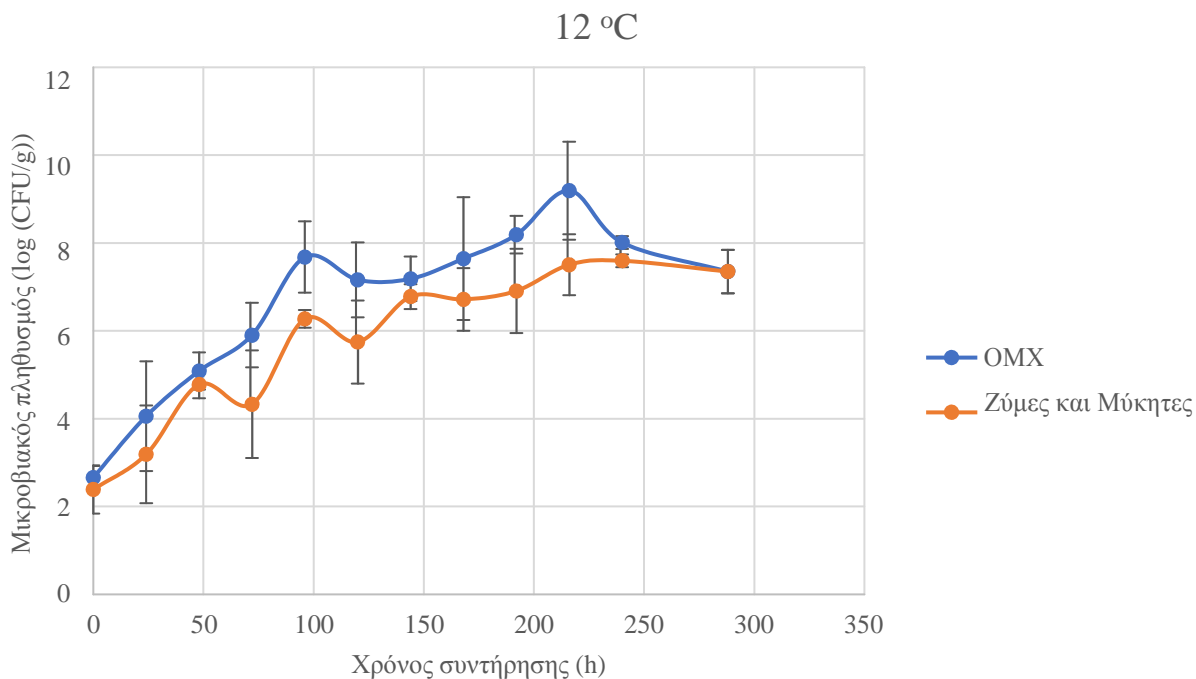


Γράφημα 1: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση κοτομπουκιών στους 4 °C για την OMX και το μικροβιακό πληθυσμό ζυμών και μυκήτων.

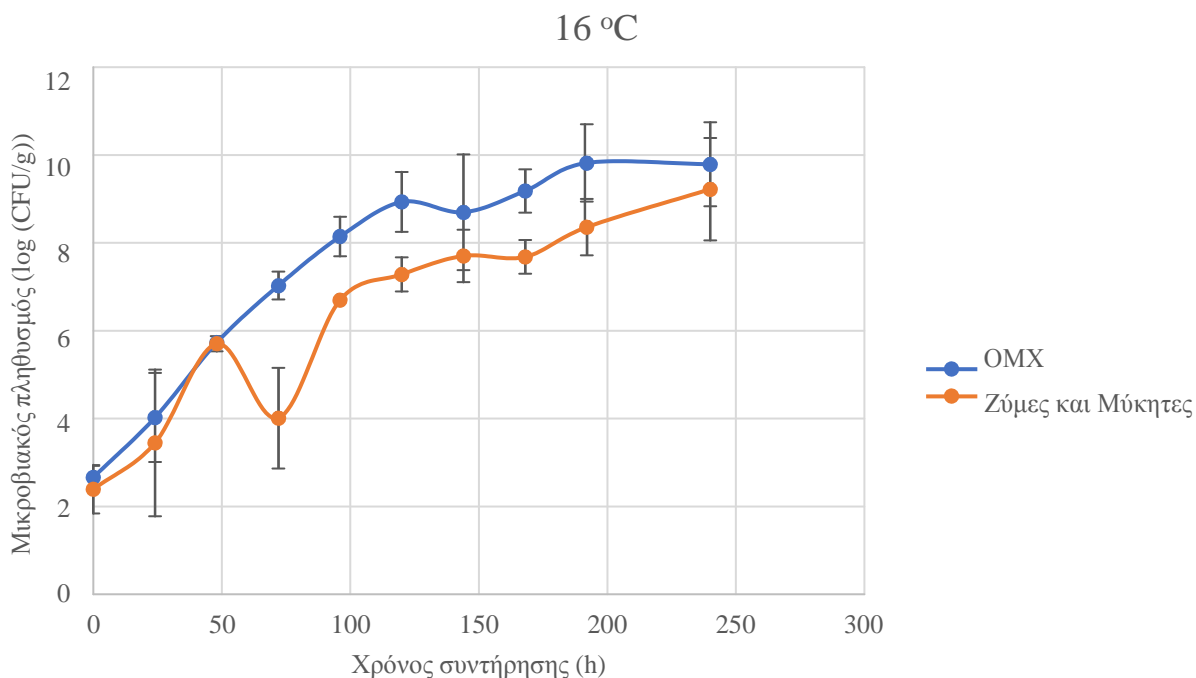
8 °C



Γράφημα 2: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση κοτομπουκιών στους 8 °C για την OMX και το μικροβιακό πληθυσμό ζυμών και μυκήτων.



Γράφημα 3: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση κοτομπουκιών στους 12 °C για την OMX και το μικροβιακό πληθυσμό ζυμών και μυκήτων.



Γράφημα 4: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση κοτομπουκιών στους 16 °C για την OMX και το μικροβιακό πληθυσμό ζυμών και μυκήτων.