

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:**

**ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**

**Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Ποσοτικοποίηση της επίδρασης και αλληλεπίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων στην αδρανοποίηση των ειδών του γένους *Bacillus spp.* με τη χρήση meta-analysis.

**Άννα Ε. Ματζάνα**

Επιβλέπων Καθηγητής:

Σκανδάμης Παναγιώτης, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

2019

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων

### ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ποσοτικοποίηση της επίδρασης και αλληλεπίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων στην αδρανοποίηση των ειδών του γένους *Bacillus spp.* με τη χρήση meta-analysis.

“Quantification of the effect and interaction of environmental factors on the inactivation of species of genus *Bacillus spp.* using meta-analysis.”

**Άννα Ε. Ματζάνα**

Εξεταστική Επιτροπή:

Σκανδάμης Παναγιώτης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής ΓΠΑ

Δροσινός Ελευθέριος, Καθηγητής ΓΠΑ

## **Ποσοτικοποίηση της επίδρασης και αλληλεπίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων στην αδρανοποίηση των ειδών του γένους *Bacillus spp.* με τη χρήση meta-analysis.**

Τμήμα Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Το βακτήριο *Bacillus spp.* έχει αποκτήσει σημασία για τη βιομηχανία τροφίμων καθώς κυρίως το είδος *Bacillus cereus* ευθύνεται για πολλά κρούσματα τροφικών δηλητηριάσεων και ασθενειών.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της ποσοτικής επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων στην αδρανοποίηση των ειδών και στελεχών του *Bacillus* και την κατάρτιση μαθηματικών συναρτήσεων. Για το σκοπό αυτό έγινε προσπάθεια χρήσης meta-analysis με συγκέντρωση 67 παλαιότερων πρωτογενών μελετών οι οποίες αξιοποιήθηκαν για τη συλλογή των ποσοτικών δεδομένων. Εξάχθηκαν δεδομένα για θρεπτικά υποστρώματα, τιμές θερμοκρασίας (T), pH, ενεργότητας ύδατος ( $a_w$ ), πίεσης (P) και άλλων παραγόντων και 1986 τιμές Dvalue, για 21 είδη και 51 στελέχη.

Οι τιμές Dvalue μετατράπηκαν σε λογαριθμικές  $\ln D$  και πραγματοποιήθηκε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση (UNIANOVA) με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS, για το σύνολο των δεδομένων, για κάθε είδος και στέλεχος ξεχωριστά και ακόμη για διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας. Παρατηρήθηκε μεγάλη μεταβλητότητα η οποία φάνηκε να μειώνεται όταν η ανάλυση εξειδικεύτηκε σε συγκεκριμένα στελέχη του κάθε είδους και σε διαφορετικά υποστρώματα. Το είδος *B.cereus* παραμένει το κυρίαρχο είδος και η θερμοκρασία (T) φαίνεται να είναι ο πιο σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας στη διαδικασία θανάτωσης του *Bacillus*, αλλά επίσης προέκυψε πολύ σημαντική η αλληλεπίδραση μεταξύ της θερμοκρασίας, του pH και του  $a_w$  σε διάφορους πιθανούς συνδυασμούς 2 ή 3 παραγόντων. Η χρήση στην ανάλυση πολλών αρχικών μελετών έχει σημαντικά οφέλη, αλλά αυξάνει την παρατηρούμενη μεταβλητότητα οδηγώντας στην ανάγκη για αναζήτηση πηγών μεταβλητότητας ώστε να μπορεί να περιγραφεί καλύτερα η αντικειμενική κατάσταση.

**Επιστημονική περιοχή:** Ασφάλεια τροφίμων

**Λέξεις κλειδιά:** *Bacillus*, αδρανοποίηση ειδών, ποσοτικοποίηση, meta-analysis, παλινδρόμηση, στελέχη, περιβαλλοντικοί παράγοντες, pH,  $a_w$ , θερμοκρασία, Dvalue

**Quantification of the effect and interaction of environmental factors on the inactivation of species of genus *Bacillus spp.* using meta-analysis.**

Department of Biotechnology

Laboratory of Food Quality Control and Hygiene

**ABSTRACT**

*Bacillus spp.* has lately gained importance in the food industry since *Bacillus cereus* is responsible for many outbreaks of food poisoning and disease.

The aim of the present study is to investigate the quantitative effect of environmental factors on inactivation of *Bacillus* species and strains and the design of mathematical equations. To this end, an attempt was made to use a meta-analysis by collecting information of 67 earlier primary studies which were used to collect the quantitative data. Data on nutrient substrates, temperature (T), pH, water activity (aw), pressure (P) and other factors and 1986 Dvalue values were extracted, 21 species and 51 strains were involved in this study.

Dvalues were converted to logarithmic lnD and multivariate linear regression (UNIANOVA) was performed using SPSS statistical package, for all data sets, for each species and strain separately and even for different substrates. High variability was observed which appeared to decrease when the assay specialized in specific strains of each species and on different substrates. *B.cereus* remains the predominant species and temperature (T) appears to be the most important environmental factor in the inactivation process, but the interaction between temperature, pH and aw in several possible combinations of 2 or 3 factors, also appeared to be significant. The use of many initial studies in the analysis has many benefits, but increases the observed variability leading to the need to search for sources of variability so that the objective situation can be better described.

**Scientific area:** Food safety

**Key words:** *Bacillus*, species inactivation, quantification, meta-analysis, regression, strains, environmental factors, pH, aw, temperature, Dvalue

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT .....	4
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 Γενικά.....	6
1.2 Σημασία του <i>Bacillus spp.</i> για τη βιομηχανία τροφίμων.....	7
1.2.1 <i>Bacillus cereus</i> .....	8
1.3 Meta-analysis.....	9
2.ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	10
2.1 Συλλογή δεδομένων και κριτήρια επιλογής:.....	10
2.2 Είδη και στελέχη .....	12
2.3 Θρεπτικά υποστρώματα .....	14
2.4 Στατιστική ανάλυση.....	18
2.4.1 Πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση .....	21
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	23
3.1 Έλεγχος συσχέτισης .....	23
3.2 Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης για είδη και στελέχη .....	23
3.3 Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης για υποστρώματα .....	31
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	44
4.1 Επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στην αδρανοποίηση ως προς τα διάφορα είδη και στελέχη του <i>Bacillus spp.</i> .....	44
4.2 Επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στην αδρανοποίηση ως προς τα διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας του <i>Bacillus spp.</i> .....	47
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	54

# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Γενικά

Είναι πλέον αδιαμφισβήτητο γεγονός, ότι τα παθογόνα βακτήρια αποτελούν την αιτία ασθενειών ήπιας ή υψίστης σοβαρότητας οι οποίες σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσουν και στο θάνατο (Aguirre et al., 2012). Ένας από αυτούς τους μικροοργανισμούς, είναι και το γένος *Bacillus* ο οποίος ανήκει στα θετικά κατά Gram βακτήρια και χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό σπορίων ραβδοειδούς μορφής (Byrne 2006 et al., 2006). Ανήκει στην οικογένεια: *Bacillaceae* τάξης: *Bacillales*, κλάσης: *Bacilli* του Φύλου: *Firmicutes*. Τα περισσότερα από τα είδη του *Bacillus* είναι υποχρεωτικά αερόβια βακτήρια αλλά υπάρχουν και είδη τα οποία λειτουργούν ως προαιρετικά αναερόβιοι οργανισμοί.

Ο πρωταρχικός ξενιστής των ειδών *Bacillus* είναι το έδαφος, αλλά μπορούν να ανιχνευθούν και σε σκόνη, νερό, τρόφιμα, οργανική ύλη σε αποσύνθεση και ακόμη και σε νοσοκομειακό εξοπλισμό. Ο *Bacillus spp.* χαρακτηρίζεται από την ιδιότητα που έχει να σχηματίζει ενδοσπόρια και να παραμένει σε αδρανή κατάσταση για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα, γεγονός που δυσκολεύει την καταπολέμησή του (Briggs, 1966). Αναπτύσσεται με μεγαλύτερη ευκολία σε θρεπτικό άγαρ ή μέσο πεπτόνης, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία που ευνοεί την ανάπτυξή του είναι 25-37°C. Τα βλαστικά κύτταρα (vegetative cells), μπορούν να θανατωθούν μέσα σε μία ώρα σε θερμοκρασία 55°C, ενώ ενδεικτικά τα σπόρια του είδους *B.subtilis* αντέχουν σε βρασμό για ώρες. Κάποια είδη του γένους *Bacillus* χρησιμοποιούνται στη φαρμακοβιομηχανία για την παραγωγή αντιβιοτικών (πχ. βακιτρακίνη από *B.licheniformis* ή *B.subtilis*, πολυμυξίνη από *B.polymyxa*).

Στην παρούσα μελέτη, έγινε μία προσπάθεια να αναζητηθούν οι παράγοντες που κυρίως επιδρούν στην αδρανοποίηση του *Bacillus spp.* καθώς και οι τυχόν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων παραγόντων. Επιπλέον, μέσω της στατιστικής ανάλυσης των συλλεχθέντων δεδομένων, αναζητήθηκαν μοτίβα που κυριαρχούν στην αντίδραση του μικροοργανισμού όταν βρεθεί σε συνθήκες διάφορων περιβαλλοντικών παραγόντων. Η ανάλυση βασίστηκε σε δεδομένα τα οποία συλλέχθηκαν από δημοσιευμένες έγκυρες μελέτες που αφορούν σε πλειοψηφία μόνο στο γένος *Bacillus*, αλλά σε κάποιες από αυτές αναφέρονται και άλλα γένη τα οποία δεν λήφθηκαν υπόψιν στη συγκεκριμένη μελέτη. Επιπροσθέτως, οι έρευνες

αυτές αναφέρονται στην θανάτωση των ειδών *Bacillus* με τη χρήση κυρίως της παραδοσιακής θερμικής επεξεργασίας αλλά και άλλων τεχνικών.

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με τη χρήση της οποίας διερευνήθηκε η εξάρτηση της Dvalue και πιο συγκεκριμένα του lnD από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και την αλληλεπίδρασή τους στις διάφορες συνθήκες, ανά διαφορετικό είδος και ακόμη και ανά διαφορετικό στέλεχος του κάθε είδους. Ως D value (decimal reduction time) ορίζεται ο χρόνος, ο οποίος απαιτείται, σε μία συγκεκριμένη συνθήκη ή σε συνδυασμό συνθηκών, ώστε να μειωθεί ο πληθυσμός του εκάστοτε μικροοργανισμού, κατά ένα λογαριθμικό κύκλο (ο οποίος αντιστοιχεί σε θανάτωση του 90% των μικροοργανισμών).

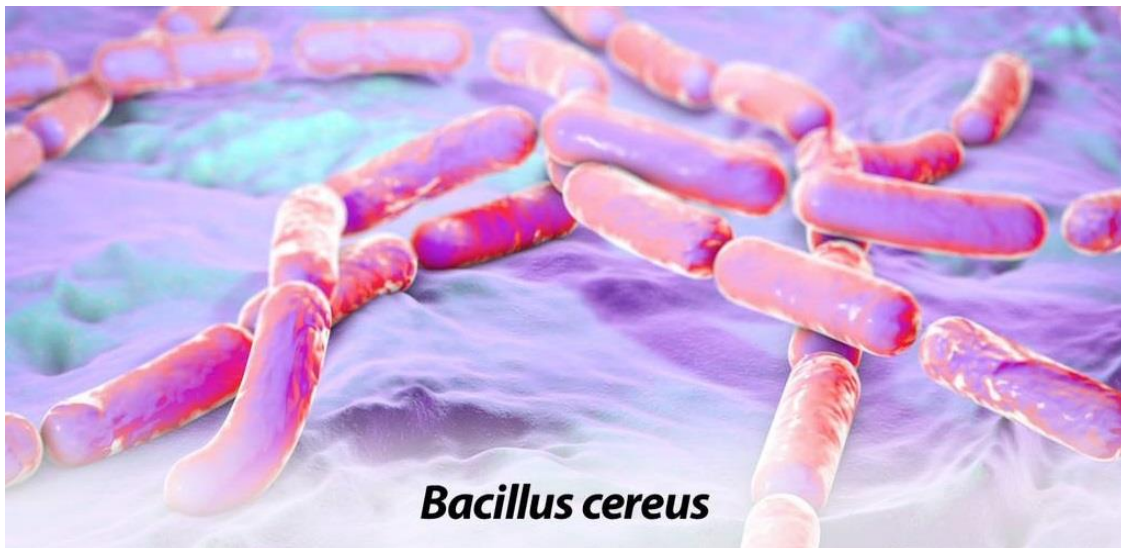
## **1.2 Σημασία του *Bacillus spp.* για τη βιομηχανία τροφίμων**

Ο *Bacillus* είναι αρκετά γνωστός στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς μπορεί να επιφέρει μεγάλη οικονομική καταστροφή (Baril et al, 2012). Ειδικότερα το είδος *Bacillus cereus* θεωρείται ένα από τα πιο συχνά εμφανιζόμενα παθογόνα τροφίμων, το οποίο μπορεί να προκαλέσει σημαντικές αλλοιώσεις ποικίλων προϊόντων και κατά συνέπεια τροφικές δηλητηριάσεις (Delgado et al., 2004). Τα είδη του γένους *Bacillus* έχουν αποτελέσει αντικείμενο αρκετών ερευνών -κάποιες από τις οποίες αξιοποιήθηκαν και στην παρούσα μελέτη- καθώς σε πολλές περιπτώσεις είναι δύσκολο να αδρανοποιηθούν και να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά, λόγω και της ιδιότητάς τους να σχηματίζουν ενδοσπόρια και να παραμένουν αδρανή για μεγάλο χρονικό διάστημα (Berendsen et al, 2015).

Τα περισσότερα κρούσματα ασθενειών έλαβαν χώρα σε χώρους μαζικής εστίασης, φυλακές, κλινικές, νηπιαγωγεία, ξενοδοχεία και άλλους χώρους που διατίθενται τρόφιμα σε ευρεία κλίμακα. Επίσης, τα πιο πολλά περιστατικά παρατηρήθηκαν στην κατανάλωση προϊόντων με βάση το ρύζι συνήθως σε συνδυασμό με λαχανικά αλλά και σε άλλες κατηγορίες τροφών όπως το κόκκινο κρέας, γαλοπούλα, αμυλούχα τρόφιμα, ακόμη και σε ροφήματα σοκολάτας.

### 1.2.1 *Bacillus cereus*

Το είδος *Bacillus cereus* συγκεκριμένα, είναι ο αιτιολογικός παράγοντας δύο γαστρεντερικών ασθενειών καθώς κατά την εκθετική του ανάπτυξη παράγονται η εντεροτοξίνη που προκαλεί διάρροια και η εμετική τοξίνη η οποία προκαλεί εμετό (Van Opstal et al., 2004).



**Εικόνα 1.2.1:** Το είδος *Bacillus cereus*

(<https://study.com/academy/lesson/bacillus-cereus-morphology-characteristics.html>)

Έχει τη δυνατότητα σε θερμοκρασία 30°C να διπλασιαστεί από 20 λεπτά-3 ώρες ανάλογα με το τρόφιμο. Οι ασθένειες που προκαλεί με συμπτώματα: σοβαρή ναυτία, εμετό και διάρροια οφείλονται κυρίως στη διατήρηση και επιβίωση των ενδοσπορίων -που αναφέρθηκαν παραπάνω- στις περιπτώσεις που τα τρόφιμα δεν έχουν συντηρηθεί ή έχουν μαγειρευτεί με λάθος τρόπο (όπως η σύντομη αναθέρμανση του ρυζιού ή το γρήγορο τηγάνισμα του) με αποτέλεσμα να μην καταστρέφεται η προσχηματισμένη τοξίνη (Byrne 2006 et al., 2006). Επίσης, ένα άλλο πρόβλημα στο χειρισμό των τροφίμων είναι οι ακατάλληλες συνθήκες ψύξης που έχουν ως αποτέλεσμα τη βλάστηση των ενδοσπορίων. Η εμφάνιση του *Bacillus cereus* σε αρκετές κατηγορίες τροφών, αποτελεί τεράστιο πρόβλημα για τη βιομηχανία τροφίμων καθώς σε κάποιες περιπτώσεις καθίσταται αδύνατο να εφαρμοστεί επαρκής θέρμανση ώστε να θανατωθούν τα σπόρια του οργανισμού. Επίσης, περαιτέρω δυσκολία προκαλεί το όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον των καταναλωτών τα τελευταία χρόνια για λιγότερο επεξεργασμένα τρόφιμα, με αποτέλεσμα οι εταιρείες



τροφίμων να εφαρμόζουν ηπιότερες μεθόδους επεξεργασίας και αυτό αυξάνει τον κίνδυνο για την ασφάλεια των προϊόντων (Aguirre et al., 2012).

Σε γενικές γραμμές, τα μαγειρεμένα τρόφιμα που δεν είναι για άμεση κατανάλωση θα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασίες κάτω από 10°C ή πάνω από 50°C, ενώ για τα προϊόντα που προορίζονται για αποθήκευση, η ψύξη θα πρέπει να είναι γρήγορη σε θερμοκρασία <8-10 °C, ώστε να αποφευχθεί η βακτηριακή ανάπτυξη ή να μειωθεί σημαντικά ο ρυθμός αύξησης. Επιπλέον, εκτός από την ανεπαρκή συντήρηση των τροφίμων, ένας άλλος παράγοντας που ευθύνεται για τη διάδοση της μόλυνσης είναι η έλλειψη καθαριότητας στον εξοπλισμό παρασκευής τροφίμων.

### 1.3 Meta-analysis

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων και συνθηκών στην αδρανοποίηση των ειδών και στελεχών του γένους *Bacillus*, με τη χρήση στατιστικών μεθόδων μετά-ανάλυσης (meta-analysis). Η meta-analysis στηρίζεται στη χρήση στατιστικών μεθόδων κατά τις οποίες συγκεντρώνονται, συγχωνεύονται και επανεξετάζονται, ποσοτικά στοιχεία που προέρχονται από παλαιότερες έρευνες, με τελικό σκοπό τη διερεύνηση τάσεων ή μοτίβων (McQuestin et al., 2009).

Τα τελευταία χρόνια εμφανίζονται περισσότερες επιστημονικές μελέτες που χρησιμοποιούν τη μέθοδο της meta-analysis στη μικροβιολογία, καθώς αποτιμάται ως ένα σημαντικό εργαλείο για να αντιμετωπιστεί η πληθώρα αναπάντητων ερωτημάτων, αλλά είναι απαραίτητο για την εφαρμογή της, να υπάρχει ένας συγκεκριμένος αριθμός πρωτογενών μελετών. Από τις μελέτες αυτές εξάγονται τα δεδομένα που προέκυψαν, κάτω από κάθε φορά, διαφορετικές πειραματικές συνθήκες ώστε να αξιοποιηθούν στη meta-analysis (McQuestin et al., 2009). Ένα φαινόμενο που παρατηρείται κατά τη χρήση μεθόδων meta-analysis είναι η εμφάνιση διασποράς η οποία εν μέρει οφείλεται στη μη ελεγχόμενη μεταβλητότητα που παρατηρείται μεταξύ πολλών διαφορετικών πρωτογενών μελετών που αξιοποιούνται. Η μεταβλητότητα αυτή είναι αποτέλεσμα των πραγματικών διαφορών που προκύπτουν από την ετερογένεια ή ποικιλομορφία ενός πληθυσμού και τις περισσότερες φορές είναι δύσκολο να μειωθεί με επιπλέον πειράματα και μελέτες. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαία η προσπάθεια εξεύρεσης των πηγών μεταβλητότητας και περιγραφής της

παρατηρούμενης διασποράς, ώστε να αποτυπωθεί όσο το δυνατό πιο αντικειμενικά η πραγματική κατάσταση και τα πιθανά αποτελέσματα (Jaloustre et al., 2012).

## 2.ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Συλλογή δεδομένων και κριτήρια επιλογής:

Οι δημοσιευμένες μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν ως βάση για την εξαγωγή δεδομένων τα οποία αξιοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, χρονολογούνται από το έτος 1966 μέχρι και το 2015. Η έρευνα ώστε να επιλεγθούν οι συγκεκριμένες μελέτες έγινε μέσω του διαδικτύου σε γνωστές ακαδημαϊκές βάσεις δεδομένων και οι λέξεις-κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής : «*Bacillus spp.*», « Thermal inactivation *Bacillus*», «Inactivation kinetics *Bacillus*», «Bacterial inactivation», « Heat resistance *Bacillus*», «Non thermal inactivation *Bacillus*», «Death kinetics *Bacillus*» «D value *Bacillus*». Από τα αποτελέσματα της έρευνας, αξιοποιήθηκαν μόνο μελέτες γραμμένες στην αγγλική γλώσσα και επίσης αποκλείστηκαν μελέτες που δεν παρείχαν πληροφορίες σχετικά με Dvalues του μικροοργανισμού *Bacillus* σε οποιαδήποτε συνθήκη.

Η πλειοψηφία των μελετών έχει ως αντικείμενο τη θερμική επεξεργασία, άλλα πέραν αυτής συμπεριλήφθηκαν και έρευνες που πραγματεύονται άλλες μεθόδους θανάτωσης του μικροοργανισμού. Συγκεκριμένα η εφαρμογή πίεσης, συνήθως σε συνδυασμό με τη θερμική επεξεργασία είναι μια εναλλακτική μέθοδος καθώς και η HPTS (>500Mpa), η οποία αποτελεί θερμική μέθοδο επεξεργασίας υποβοηθούμενη από εφαρμογή πολύ υψηλής πίεσης. Επίσης σε κάποιες από τις μελέτες εφαρμόστηκε μέθοδος παλλόμενων ηλεκτρικών πεδίων μόνη της ή σε συνδυασμό με την εφαρμογή πίεσης και θερμότητας. Επιπλέον, μία αναδυόμενη τεχνική είναι ο θερμοσυντονισμός (Thermosonication) που χρησιμοποιείται κυρίως για τη συντήρηση υγρών τροφίμων και απενεργοποιεί τη δράση συγκεκριμένων ενζύμων. Άλλες μέθοδοι που αναφέρθηκαν είναι η χρήση αέριου υπεροξειδίου του υδρογόνου (Gaseous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), καθώς και αέριου όζοντος (gaseous O<sub>3</sub>), μη θερμικού πλάσματος εκκένωσης ατμοσφαιρικού αερίου, Ar/O<sub>2</sub> plasma jet, He/O<sub>2</sub> plasma jet ,συνδυασμός θερμότητας και χρήσης υδρουπεροξειδίων στην απενεργοποίηση ενζύμων (t-

BOOH, cumOOH, PAA), χρήση νανοσυνθέτων (UV+TiO<sub>2</sub>-MWNTs nanocomposites) και χρήση διοξειδίου του άνθρακα (Supercritical CO<sub>2</sub>).

Από τις 67 μελέτες που αξιοποιήθηκαν, η πλειοψηφία τους, δηλαδή οι 47 έρευνες παρείχαν δεδομένα που προέκυψαν από την εφαρμογή linear regression, 5 από αυτές χρησιμοποίησαν μοντέλο Weibull, 3 Non-linear regression, 4 μοντέλο Bigelow και οι υπόλοιπες 6 άλλα μοντέλα

Από κάθε μελέτη εξάχθηκαν οι παρακάτω πληροφορίες: διάφορα είδη του γένους *Bacillus*, διαφορετικά στελέχη του κάθε είδους, μέθοδοι και τεχνικές επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκαν για την αδρανοποίηση του μικροοργανισμού (Heat, Gaseous Ozone κλπ.), η θερμοκρασία, το pH, η ενεργότητα ύδατος (aw), η πίεση (P), η σχετική υγρασία (R.H), η θερμοκρασία δημιουργίας σπορίων (Sporulation Temperature), η θερμοκρασία επώασης (Incubation Temperature), τα μαθηματικά μοντέλα που εφαρμόστηκαν σε κάθε μελέτη, τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Επίσης, από όλες τις μελέτες εξάχθηκαν οι τιμές Dvalues για κάθε είδος και στέλεχος *Bacillus* που εξετάστηκε σε διαφορετικές συνθήκες.

Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, συλλέχθηκαν από μελέτες που αφορούν στο γένος *Bacillus spp* και αναφέρονται στην αδρανοποίηση του μικροοργανισμού και στο βαθμό αντοχής του σε διαφορετικές μεθόδους επεξεργασίας, σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες σε κάθε περίπτωση. Οι 67 μελέτες παρείχαν 2131 εγγραφές δεδομένων που προσέφεραν πληροφορίες για είδη *Bacillus*, στελέχη, μεθόδους επεξεργασίας, υποστρώματα, τιμές θερμοκρασίας, pH, ενεργότητας ύδατος, πίεσης και σχετικής υγρασίας. Το dataset των Dvalues αποτελείται από 1986 εγγραφές που αποκτήθηκαν κάτω από ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες οι οποίες μετατράπηκαν σε lnD για ορθότερη χρήση στη στατιστική ανάλυση σε διαφορετικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ο αριθμός των Dvalues είναι μικρότερος από το σύνολο των εγγραφών γιατί σε κάποιες μελέτες δεν υπήρχαν αποτελέσματα για Dvalue. Συλλέχθηκαν δεδομένα για 21 είδη και 51 στελέχη.

## 2.2 Είδη και στελέχη

Τα είδη *Bacillus* για τα οποία συλλέχθηκαν τα δεδομένα από τις μελέτες είναι τα εξής:

*B.cereus*: n=862

*B.stearothermophilus*: n=410

*B.subtilis*: n=362

*B.coagulans*: n=116

*B.licheniformis*: n=112

*B.sporothermodurans*: n=86

*B.anthraxis*: n=45

*B.megaterium*: n=33

*B.amyloliquefaciens*: n=18

*B.pumillus*: n=16

*B.oleronius*: n=12

*B.sphaericus*: n=7

*B.alvei*: n=7

*B.amylolyticus*: n=7

*B.weihenstephanensis*: n=6

*B.atrophaeous*: n=6

*B.ruris* sp. Nov: n=6

*B.fordii*: n=6

*B.flexus*: n=4

*B.brevis*: n=2

*B.polymyxa*: n=1

και 7 ακόμη εγγραφές από είδη *Bacillus* που δεν αναφέρονται ονομαστικά.

Τα στελέχη κάθε είδους που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη είναι τα εξής (ανά είδος):

***B.cereus***: Bce1, DSM 4313, DSM 626, NCTC 07464, NZR 984 (psychotroph.), INRA AVZ 421, INRA AVTZ 415, ATCC 4342, ATCC 7004, ATCC 9818, AHU 1357, ATTC2 (Surrogate of *B.anthraxis*), ATCC 9818, EPSO-41WR, 42WR, 43WR, 44HR, 45HR, 47HR, 50UR, T, D17, CNRZ 110, LMG 6923, CUETM 93/60, CUETM 93/61, CUETM 93/62, CECT 131, B 687, ADQP 407, F 3484/77 (atoxicogenic type), F 4810/72 (emetic type), F 4165/75 (emetic type), F 4552/75 (emetic type), F 4433/73 (diarrheal type), F 2769/77 (diarrheal type), B 4ac (diarrheal type), ATCC 1479-8, psychrotrophic και mesophilic strains και κάποια ακόμη στελέχη που δεν αναφέρονται ονομαστικά.

***B.stearothermophilus***: NCA 1518, NCTC 10339, NCIB 8919, TH 24, ATCC 12980, FS 7954, ATCC 7953, ATCC 15951, ATCC 15952, NCIB 8920, NCIB 8923, IAM 1035, PCIF, 1518, B 631, IAM 12043, IAM 11001

***B.subtilis***: 5230, A, ATCC 9372, ATCC 6633, Spanish type culture 4524, MD2, IFO 3134, IFO 13721, NCTC 10073, PS 832 Wild type, 168, B 692, IAM 12118, PS 1899 (dacB), PS 356 ( $\alpha$ - $\beta$ -), PS 2211 ( $\alpha$ - $\beta$ -dacB), SA 22 και κάποια ακόμη στελέχη που δεν αναφέρονται ονομαστικά.

***B.coagulans***: 185A, Spanish type culture 4522, ATCC 8038, ATCC 7050, IFFI 10144, IAM 1194 και ένα στέλεχος που δεν αναφέρεται ονομαστικά.

***B.licheniformis***: AD 978, AHU 1532, Spanish type culture 4523, ATCC 14580, DSM 13, IAM 13417, MB 1882, MB 1880

***B.sporothermodurans***: IC4, J16, MB 1188, MB 1316, MB 1317, MB 1501, MB 1503, MB 1504, MB 1505

***B.anthraxis***: 7702, ANR-1, 9131, RP 42, Sterne strain

***B.megaterium***: AHU 1374, ATCC 19213, IAM 1166 και κάποια στελέχη που δεν αναφέρονται ονομαστικά.

***B.amyloliquefaciens***: TMW 2,479 Fad 82

***B.pumillus***: A40 και ένα στέλεχος που δεν αναφέρεται ονομαστικά.

***B.oleronius***: MB 397 και στέλεχος που δεν αναφέρεται ονομαστικά.

*B.sphaericus*: 5 στελέχη που δεν αναφέρονται ονομαστικά.

*B.alvei*: 2 στελέχη που δεν αναφέρονται ονομαστικά.

*B.amylyolyticus*: 1 στέλεχος που δεν αναφέρεται ονομαστικά.

*B.weihenstephanensis*: KBAB4

*B.atrophaeous*: Δεν αναφέρονται ονομαστικά.

*B.ruris sp. Nov*: MB 1873

*B.fordii*: MB1878

*B.flexus*: 1316

*B.brevis*: B 636

*B.polymyxa*: Δεν αναφέρονται ονομαστικά

### 2.3 Θρεπτικά υποστρώματα

Οι μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν παρείχαν δεδομένα τα οποία εξάχθηκαν σε πειράματα με διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Τα υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

Νερό

Milk and dairy food (Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα): Αποβουτυρωμένο γάλα, μη αποβουτυρωμένο γάλα, μη αποστειρωμένο γάλα, milk-no nisin (γάλα χωρίς νισίνη) milk-nisin (γάλα με νισίνη). Στην τελευταία περίπτωση, το γάλα χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα ζύμωσης για την παραγωγή νισίνης. Η νισίνη είναι μία εμπορικά διαθέσιμη βακτηριοκίνη που παράγεται από το *Lactococcus lactis* ATCC 11454 και χρησιμοποιείται ως φυσικός παράγοντας στη βιοδιατήρηση των τροφίμων.

BSA (Bovine serum albumin) είναι πρωτεΐνη αλβουμίνης ορού που προέρχεται από αγελάδες.

Tomato: Τομάτα σε χυμό ή σε πουρέ.

**Ringer's solution:** Είναι διάλυμα διαφόρων αλάτων στο νερό. Συνήθως περιέχει NaCl (χλωριούχο νάτριο), KCl (χλωριούχο κάλιο), CaCl<sub>2</sub> (χλωριούχο ασβέστιο) και NaHCO<sub>3</sub> (διττανθρακικό νάτριο που χρησιμοποιείται για την εξισορρόπηση του pH), μερικές φορές και με άλλα μέταλλα, όπως χλωριούχο μαγνήσιο, διαλυμένα σε αποσταγμένο νερό.

**Chickpea extract:** Εκχύλισμα ρεβιθιού.

**Beef slurry:** Βόειο κρέας.

**Asparagus:** Σπαράγγι σε πουρέ.

**Egg:** Αυγό σε σκόνη ή πατέ.

**Carrot:** Καρότο σε χυμό

**Cloudberry jam:** Μαρμελάδα

**Mechanically separated poultry meat:** Μηχανικά διαχωρισμένο κρέας πουλερικών

**Rice:** Μαγειρεμένο ρύζι και νερό ρυζιού

**Pork luncheon roll:** Χοιρινό ρολό

**Soy:** Σόγια

**Pulp:** Πολτός

**Silage:** Φρέσκο χορτάρι

**Acidified mushroom extract:** Όξινο διάλυμα εκχυλίσματος μανιταριών.

**UHT-based Vanilla drink:** Ρόφημα βανίλιας σε εξαιρετικά υψηλή θερμοκρασία.

**Feed concentrate:** Συμπύκνωμα ζωοτροφών.

**Buffer and homogenised foods:** Ρυθμιστικό μέσο και ομογενοποιημένα τρόφιμα.

**Buffer:** Ρυθμιστικό διάλυμα pH, χρησιμοποιείται ως μέσο για τη διατήρηση του pH σε σχεδόν σταθερή τιμή.

**Phosphate buffer (Butterfield's buffer):** Ένα απλό φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 5.8-7.4). Χρησιμοποιείται παντού σε βιολογικά πειράματα λόγω προσαρμογής σε ευρεία περιοχή pH. Είναι εξαιρετικά υδατοδιαλυτό, αλλά αναστέλλει την ενζυμική δραστηριότητα και καθιζάνει σε αιθανόλη.

Sodium phosphate buffer: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου.

PBs buffer (Phosphate-buffered saline): Αλατούχος ορός ρυθμισμένος με φωσφορικό. Είναι διάλυμα άλατος με βάση το νερό το οποίο συνήθως περιέχει όξινο φωσφορικό νάτριο, χλωριούχο νάτριο και σε κάποιες περιπτώσεις χλωριούχο κάλιο και δισόξινο φωσφορικό κάλιο.

ACEs buffer: Αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1960 για να παρέχει ρυθμιστικά διαλύματα με pH: 6.15-8.35.

Mclvaine buffer: Είναι ρυθμιστικό διάλυμα που αποτελείται από κιτρικό οξύ και όξινο φωσφορικό νάτριο. Μπορεί να παρασκευαστεί σε pH=2.2 – 8, με ανάμιξη δύο αποθεματικών διαλυμάτων.

Difco: Θρεπτικό άγαρ ή ζωμός.

NA (Nutrient Agar): Θρεπτικό άγαρ. Συνήθως περιλαμβάνει πεπτόνη, εκχύλισμα βοδινού ή εκχύλισμα ζύμης, άγαρ, χλωριούχο νάτριο, αποσταγμένο νερό.

FNA: Το άγαρ φθορισμού-απονιτροποίησης για την ανίχνευση της χρωστικής φθορεσκεΐνης και την πλήρη αναγωγή του νιτρικού άλατος σε αέριο άζωτο. Η πεπτική πέψη του ζωικού ιστού και η ενζυμική υδρόλυση καζεΐνης παρέχουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά.

CAA: Άγαρ κεφαλεξΐνης-αζτρεοναμ-αραβινόζης.

TSA (Tryptic soy agar): Άγαρ τρυπτόνης σόγιας. Περιέχει ενζυμικά προϊόντα πέψης καζεΐνης και αλεύρου σόγιας τα οποία παρέχουν αμινοξέα και άλλες αζωτούχες ουσίες και το καθιστούν θρεπτικό μέσο για μία ποικιλία οργανισμών. Η γλυκόζη είναι η πηγή ενέργειας, το χλωριούχο νάτριο διατηρεί την ωσμωτική ισορροπία ενώ το φωσφορικό κάλιο δρα ως ρυθμιστικό διάλυμα για την διατήρηση του pH.

TSB (Tryptone Salt Broth) + acid: Ζωμός άλατος τρυπτόνης. Το ενζυμικό υδρολυμένο άλας καζεΐνης παρέχει αζωτούχες ενώσεις και άλλα βασικά θρεπτικά συστατικά ανάπτυξης. Το χλωριούχο νάτριο διατηρεί την ωσμωτική ισορροπία. Στους 25 °C επιτυγχάνεται pH 7+0,2 ή -0,2. Για το όξινο περιβάλλον χρησιμοποιήθηκαν τα εξής: Malonic acid (μηλονικό οξύ), citric acid (κιτρικό οξύ), malic acid (μηλικό οξύ), GDL acid (οξύ της γλυκονό-δ-λακτόνης), lactic acid (γαλακτικό οξύ), adipic acid (αδιπικό οξύ), acetic acid (οξικό οξύ), succinic acid (ηλεκτρικό οξύ).



TGE (Tryptone Glucose Yeast Extract Agar): Το άγαρ εκχυλίσματος ζύμης γλυκόζης χρησιμοποιείται κυρίως για τον υπολογισμό της βακτηριακής ανάπτυξης στο γάλα και γενικά στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το εκχύλισμα ζύμης παρέχει αζωτούχες και ανθρακικές ενώσεις, αμινοξέα μακριάς αλυσίδας, σύμπλεγμα βιταμίνης Β και άλλα θρεπτικά συστατικά. Η γλυκόζη είναι η πηγή ενέργειας.

YPTD (Yeast Extract Peptone-Tryptone-Dextrose): Αποτελείται από εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη, δεξτρόζη, βιοτίνη και ζωμό σόγιας τρυπτόνης.

BHI (Brain Heart Infusion Broth): Η έγχυση καρδιάς, εγκεφάλου είναι ένα πλούσιο σε θρεπτικά μέσο ανάπτυξης μικροοργανισμών. Η παρασκευή του γίνεται συνδυάζοντας μία έγχυση από τη βραστή καρδιά και τον εγκέφαλο των βοοειδών ή των χοίρων με μία ποικιλία άλλων θρεπτικών συστατικών.

Olive/vegetable oil: Φυτικό λάδι, ελαιόλαδο.

Mineral/Commercial oil: Ορυκτέλαιο, εμπορικό λάδι.

Heat-resistant silicon oil: Ανθεκτικό στη θερμότητα, λάδι πυριτίου.

LiCl solution: Διάλυμα χλωριούχου λιθίου. Επιλέγεται για τον έλεγχο της σχετικής υγρασίας του υπερκείμενου χώρου επειδή παράγει ειδική πίεση υδρατμών ανάλογα με τη συγκέντρωση και τη θερμοκρασία του.

NaCl solution: Διάλυμα χλωριούχου νατρίου

Sucrose solution: Διάλυμα σακχαρόζης

Glycerol solution: Διάλυμα γλυκερόλης. Η γλυκερόλη χρησιμοποιείται σε πολλά ρυθμιστικά διαλύματα με σκοπό την αύξηση της πυκνότητας του διαλύματος.

Frankfurter emulsion slurry + acid: Εναιώρημα γαλακτώματος λουκάνικων σε όξινο περιβάλλον. Τα οξέα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: malic acid, acetic acid, citric acid, lactic acid, HCl.

## 2.4 Στατιστική ανάλυση

Αρχικά συγκεντρώθηκαν οι τιμές Dvalues που εξάχθηκαν από τις δημοσιευμένες μελέτες που αξιοποιήθηκαν και ομαδοποιήθηκαν σε αντιστοιχία με τις συνθήκες που επικράτησαν κατά την εξαγωγή τους. Τα data οργανώθηκαν σε φύλλο Excel περιλαμβάνοντας όλες τις πληροφορίες που αξιοποιήθηκαν: Είδη και στελέχη του Bacillus, σπόρια ή βλαστικά κύτταρα, μέθοδοι επεξεργασίας, υποστρώματα, θερμοκρασία (T), θερμοκρασία σποριοποίησης (Tsp), θερμοκρασία επώασης (Tinc), pH, ενεργότητα ύδατος (aw), πίεση (P), σχετική υγρασία (R.H), μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν στις έρευνες. Οι τιμές για τη Θερμοκρασία (T) που προέκυψαν από τα δεδομένα κυμαίνονται από 20-190°C με μέση τιμή 100.5 °C, οι τιμές για το pH από 2.30-8.06 με μέση τιμή 6.35 και οι τιμές για την ενεργότητα ύδατος (aw) από 0.18-1 με μέση τιμή 0.88. Τέλος, οι τιμές για την Πίεση (P) εμφανίζονται από 0.10Mpa-700Mpa με μέση τιμή 315.44Mpa. Στον Πίνακα 2.4 φαίνεται ένα μέρος των δεδομένων που συλλέχθηκαν και οργανώθηκαν από τις διάφορες ερευνητικές μελέτες.

Στη συνέχεια, για να γίνει μία πρώτη εκτίμηση των στοιχείων που συλλέχθηκαν, πραγματοποιήθηκε έλεγχος συσχέτισης της μεταβλητής D με κάθε ποσοτική μεταβλητή (T, Tsp, Tinc, pH, aw, P, R.H).

**Πίνακας 2.4:** Μέρος δεδομένων που συλλέχθηκαν από τις πρωτογενείς μελέτες.

Species	Strain	Inoculum	Treatment	Media	T (°C)	T <sub>sp</sub> (°C)	T <sub>in</sub> (°C)	pH	aw	P (MPa)	R.H.	lnD	References
<i>B.subtilis</i>	5320	Spores	Heat	Butterfield's buffer	105			7.2				2.83	L.H. Ababouch et al. (1995)
<i>B.cereus</i>	Bce1	Spores+ Vegeta ble cells	Heat	Dairy food	100			5.5	0.95			1.67	I. Albert et al. (2005)
<i>B.coagulans</i>	185A	Spores	Pressure +Heat	Tomato juice	85			4.23		600		0.47	H. Daryaei et al. (2013)
<i>B.cereus</i>	INRA AVTZ 415	Spores	Heat	FNA	85			7				2.83	A. Fernandez et al. (1999)
<i>B.cereus</i>	ATCC 4342	Spores	Heat	Mclvaine buffer	100	45		7				1.62	I. Gonzalez et al. (1999)
<i>B.subtilis</i>		Spores	Heat	15m LiCl (0.1M phosphate buffer)	95			7	0.29			3.56	Harnulv et al. (1972)
<i>B.cereus</i>	ATCC 7004	Spores	Heat	NaCl solution (4.0M)	110			7.65	0.84			-2.45	M. Mazas et al. (1999)
<i>B.licheniformis</i>	Spanish Type Culture 4523	Spores	Heat	Buffer and homogenised foods	102			4				-2.51	A. Palop et al. (1996)
<i>B.stearothermophilus</i>	ATCC 7953	Spores	PATP*	Egg patty	105					700		-0.63	S. Rajan et al. (2006)

<i>B.licheniformis</i>		Spores	Pressure+ Heat	Carrot juice	50		5.5	600	0.64	Y. B. Tola, H. S. Ramaswamy (2014)	
<i>B.subtilis</i>	168	Spores	Heat (Ultra High T)	Skim milk (0.6% fat)	92		6.7		2.62	A. Jagannath and T. Tsuchido (2003)	
<i>B.cereus</i>	CNRZ 110	Spores	Heat	Citrate-phosphate buffer	105		5.5	0.95	-2.07	S. Gaillard et al. (1998)	
<i>B.stearothermophilus</i>	ATCC 7953	Spores	Heat	Frankfurter emulsion slurry	121		5.2		0.82	Lynch and Potter (1987)	
<i>B.anthraxis</i>	RP 42	Spores	HHPH*	Sterile distilled water	20		7	500	5.08	Clery-Barraud et al. (2003)	
<i>B.licheniformis</i>	IAM 13 417	Spores	Heat	Heat-resistant silicon oil	90	35	55		2.40	A. Nakayama et al. (1996)	
<i>B.subtilis</i>	Var.niger	Spores	Dry Heat		105			0.14	4.36	J. P. Brannen and D. M. Garst (1972)	
<i>B.cereus</i>	ADQP 407	Spores	Heat	TSB	100		7	1	1.72	I. Leguerine et al. (2011)	
<i>B.sporothermodurans</i>	MB 1188	Spores	Heat (Ultra High T)	UHT-based vanilla drink	125		37		-1.53	P. Scheldeman (2004)	
<i>B.coagulans</i>	56 186 A	Spores	Heat+ H2O2	Difco	24		55		0.59	R.T Toledo et al. (1973)	
<i>B.amyloliquefaciens</i>	Fad 82	Spores	PATP *	Egg patty mince	95		7.25	0.99	500	2.45	Rajan et al. (2005)

\*PATP: Pressure Assisted Thermal Processing

\*\*HHPH: High Hydrostatic Pressure + Heat

### 2.4.1 Πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση

Ακολούθως για την πραγματοποίηση της κύριας στατιστικής ανάλυσης, οι τιμές Dvalue μετατράπηκαν σε λογαριθμικές lnD για διευκόλυνση ως προς τη χρήση των δεδομένων στη στατιστική ανάλυση και στην εξαγωγή αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων. Για την ανάλυση έγινε χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος UNIANOVA (Univariate Analysis of Variance), μονομερής ανάλυση διακύμανσης για μία εξαρτημένη μεταβλητή.

Διενεργήθηκε έλεγχος για την ισότητα των μέσων, t-test για έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των παραμέτρων και υπολογισμός των βαθμών ελευθερίας, του συντελεστή προσδιορισμού  $R^2$  και του προσαρμοσμένου για τους βαθμούς ελευθερίας του μοντέλου  $Radj^2$ . Τα αποτελέσματα που προκύπτουν κάθε φορά από την ανάλυση αποτυπώνονται σε πίνακα με τίτλο Test of between-Subjects Effects ο οποίος δείχνει την ανάλυση της διακύμανσης για την εξαρτημένη μεταβλητή ως προς τις ανεξάρτητες μεταβλητές και την αλληλεπίδρασή τους. Επίσης γίνεται επιλογή εμφάνισης του πίνακα με τίτλο Parameter Estimates στον οποίο αποτυπώνονται οι παράμετροι της κάθε συνάρτησης, η στατιστική σημαντικότητά τους (κάθε παράμετρος θεωρείται σημαντική για  $P < 0.05$ ), τα τυπικά σφάλματα (St. Error) καθώς και τα ανώτερα και κατώτερα όρια των διαστημάτων εμπιστοσύνης (95% confidence interval).

Τα δεδομένα χωρίστηκαν αρχικά σε 5 διαφορετικά σετ δεδομένων τα οποία αντιστοιχούν σε 5 διαφορετικά είδη του γένους *Bacillus*, τα οποία εμφανίστηκαν ως κυρίαρχα στην πρώτη ανάλυση: *B.cereus*, *B.stearothermophilus*, *B.subtilis*, *B.coagulans* και *B.licheniformis*.

Σε κάθε σετ δεδομένων εφαρμόστηκε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση. Ως εξαρτημένη μεταβλητή στην κύρια στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η μεταβλητή lnD και ως ανεξάρτητες μεταβλητές, η θερμοκρασία (T), το pH, η ενεργότητα ύδατος ( $a_w$ ), η Πίεση (P), η σχετική υγρασία (R.H), η θερμοκρασία δημιουργίας σπορίων ( $T_{sp}$ ) και η θερμοκρασία επώασης ( $T_{inc}$ ). Οι δύο τελευταίοι παράγοντες συμμετείχαν σε περιορισμένο βαθμό στην ανάλυση, λόγω του μικρού αριθμού εγγραφών. Επίσης, σε κάθε σετ έγινε έλεγχος της αλληλεπίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών ανά 2 ή ανά 3, ανάλογα με την κάθε περίπτωση. Κατά τον ίδιο τρόπο, κάθε σετ δεδομένων ανά είδος χωρίστηκε σε επιμέρους σετ δεδομένων ανά στέλεχος του κάθε είδους, εκτός από τις περιπτώσεις που τα στελέχη εμφανίζονταν σε πολύ μικρό αριθμό δεδομένων και δεν είχε νόημα η επεξεργασία

τους. Σε κάθε σετ δεδομένων κάθε στελέχους, εφαρμόστηκε πολλαπλή παλινδρόμηση κατά τον ίδιο τρόπο όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Και στις δύο περιπτώσεις καταρτίστηκε όπου ήταν δυνατό μία συνάρτηση ως αποτέλεσμα της προσπάθειας ανεύρεσης μίας τάσης ή ενός μοτίβου στη συμπεριφορά της εξαρτημένης μεταβλητής  $\ln D$ , ως αποτέλεσμα της επίδρασης κάθε ανεξάρτητης μεταβλητής χωριστά αλλά και των πιθανών συνδυασμών τους.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο συντελεστής προσδιορισμού  $R^2$  που υπολογίστηκε σε κάθε εφαρμογή της παλινδρόμησης, μετρά το ποσοστό της διακύμανσης της εξαρτημένης μεταβλητής που εξηγείται από την ανεξάρτητη μεταβλητή.

Παρατηρώντας τα στοιχεία που συλλέχθηκαν από την εφαρμογή της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης αρχικά για τα διαφορετικά είδη και κατόπιν για διάφορα στελέχη του κάθε είδους του μικροοργανισμού *Bacillus*, έγινε αντιληπτό ότι υπάρχει ένα ποσοστό μεταβλητότητας το οποίο δεν μπορεί να εξηγηθεί. Επομένως, θεωρήθηκε απαραίτητο να διερευνηθούν και άλλες συνθήκες πέρα από την ιδιαιτερότητα του κάθε είδους και στελέχους, όπως είναι η επίδραση διαφορετικών υποστρωμάτων στη διαδικασία ανάπτυξης του κάθε είδους ή και στελέχους στο συνολικό αποτέλεσμα της ταχύτητας της αδρανοποίησης του οργανισμού σε σχέση με τους βασικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες  $T$ ,  $pH$ ,  $a_w$ ,  $R.H$ ,  $T_{in}$ ,  $T_{sp}$ .

Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε κατά τον ίδιο τρόπο και δεύτερη πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση αυτή τη φορά για κάθε διαφορετικό θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο καλλιεργήθηκε ο *Bacillus*. Για κάθε ένα από αυτά τα θρεπτικά υλικά πραγματοποιήθηκε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση με το  $\ln D$  στη θέση της εξαρτημένης μεταβλητής και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες ( $T$ ,  $pH$ ,  $a_w$ ,  $R.H$ ,  $T_{in}$ ,  $T_{sp}$ ) στη θέση των ανεξάρτητων μεταβλητών. Όπως και στην αρχική παλινδρόμηση, έτσι και εδώ, ελέγχθηκε κάθε πιθανός συνδυασμός μεταξύ 2, 3 μεταβλητών καθώς και μεταξύ κάθε πιθανής συνδυασμένης επίδρασης τους πάνω στην εξαρτημένη μεταβλητή. Επίσης σε κάποιες περιπτώσεις που ήταν στατιστικά σημαντικές, διερευνήθηκε και η επίδραση των διαφορετικών ειδών και στελεχών σε συνδυασμό με το εκάστοτε θρεπτικό υλικό.

## 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Έλεγχος συσχέτισης

Για μία αρχική εκτίμηση των συλλεχθέντων δεδομένων πραγματοποιήθηκε ένας έλεγχος συσχέτισης των μεταβλητών ανά δύο και έγινε ταυτόχρονη σύγκριση με διαγράμματα διασποράς. Η ανάλυση έγινε ανά είδος και τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

*B.cereus*: Σε ποσοστό 93.3% των περιπτώσεων παρατηρήθηκε συσχέτιση Dvalue, T. Στο 6.6% παρατηρήθηκε συσχέτιση D<sub>aw</sub> και στο 6,6% συσχέτιση D<sub>pH</sub>. Σημειώνεται ότι σε ποσοστό 78.78% παρατηρήθηκε διασπορά τιμών.

*B.stearothermophilus*: Σε ποσοστό 87.5% παρατηρήθηκε συσχέτιση D,T , συσχέτιση D<sub>pH</sub> σε ποσοστό 12.5% και συσχέτιση D,P σε ποσοστό 6.25%. Παρατηρήθηκε διασπορά τιμών σε ποσοστό 64.7%.

*B.subtilis*: Σε ποσοστό 81.1% των περιπτώσεων παρατηρήθηκε συσχέτιση D,T, σε 9% συσχέτιση D<sub>aw</sub> και σε 18.18% συσχέτιση D,R.H. Σημειώνεται ότι παρατηρήθηκε διασπορά τιμών σε ποσοστό 84,6%.

*B.coagulans*: Σε ποσοστό 80% παρατηρήθηκε συσχέτιση D, T και σε 20% συσχέτιση D,P. Παρατηρήθηκε διασπορά τιμών στο 80%.

*B.licheniformis*: Σε ποσοστό 80% παρατηρήθηκε συσχέτιση D,T, συσχέτιση D,P σε ποσοστό 20% και σε ποσοστό 20% συσχέτιση D,R.H. Παρατηρήθηκε διασπορά τιμών σε ποσοστό 60%.

Ελέγχθηκαν και τα είδη *B.megaterium*, *B.anthraxis*, *B.sporothermodurans*, *B.pumillus* και *B.alvei* αλλά τα αρχικά data ήταν περιορισμένα ποσοτικά, ώστε να μπορέσει να βγει ασφαλές συμπέρασμα.

### 3.2 Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης για είδη και στελέχη

Αφού μετατράπηκαν οι τιμές D σε τιμές lnD, ακολουθήθηκε η εφαρμογή πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για κάθε είδος του μικροοργανισμού *Bacillus* ξεχωριστά. Τα είδη τα οποία εξετάστηκαν είναι τα εξής :

*B.cereus*: n=862

*B.stearothermophilus*: n=410

*B.subtilis*: n=362

*B.coagulans*: n=116

*B.licheniformis*: n=112

τα οποία είναι και τα είδη τα οποία συγκέντρωσαν τον περισσότερο όγκο αρχικών δεδομένων κατά την πρωτογενή έρευνα των διαφόρων μελετών. Τα υπόλοιπα είδη συμμετείχαν ως πληροφορίες στη γενική μελέτη του μικροοργανισμού αλλά δεν εξετάστηκαν ξεχωριστά καθώς ήταν μικρός ο αριθμός της πληροφορίας που αντιπροσώπευαν.

Κατά την πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση, η μεταβλητή lnD αντιμετωπίστηκε ως dependent variable και οι υπόλοιπες μεταβλητές T, pH, aw, P, R.H, Tsp (sporulation temperature) ως covariates, ανεξάρτητες μεταβλητές. Επίσης ελέγχθηκε κάθε πιθανός συνδυασμός ανεξάρτητων μεταβλητών, είτε κάθε μία ως μεμονωμένος παράγοντας, είτε ανά 2, είτε ανά 3 όπου ήταν δυνατό. Κατά αυτό τον τρόπο, εξετάστηκε όχι μόνο η επίδραση κάθε περιβαλλοντικού παράγοντα ξεχωριστά στην εξαρτημένη μεταβλητή, αλλά και η πιθανή συνδυασμένη επίδραση δύο ή περισσότερων παραγόντων.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα στελέχη κάθε είδους από τα παραπάνω 5 που αναφέρθηκαν, αποκλείοντας κατά τον ίδιο τρόπο τα στελέχη τα οποία δεν παρουσίαζαν ενδιαφέρον λόγω μικρού αριθμού εγγραφών (data).

Στο τέλος της διαδικασίας κάθε φορά, ελέγχθηκε η στατιστική σημαντικότητα των συντελεστών, υπολογίστηκαν οι παράμετροι και τα  $R^2$ . Από τα παραπάνω καταρτίστηκαν οι συναρτήσεις οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.1. Ο Πίνακας 3.2.1 αποτελείται από 4 στήλες οι οποίες αντιπροσωπεύουν από αριστερά προς τα δεξιά τα είδη (Species) του *Bacillus*, τα διάφορα στελέχη του κάθε είδους (Strains), τις συναρτήσεις που προέκυψαν από την παλινδρόμηση (παρατίθενται μόνο οι συναρτήσεις με παραμέτρους στατιστικά σημαντικές, για τις οποίες ισχύει πιθανότητα  $P < 0.05$ ) και το Συντελεστή Προσδιορισμού προσαρμοσμένου για τους βαθμούς ελευθερίας του μοντέλου ( $R_{adj}^2$ ) που παρατίθεται στην τελευταία στήλη. Στις περιπτώσεις της πίεσης (P), της σχετικής υγρασίας (R.H), της θερμοκρασίας επώασης (Tin) και της θερμοκρασίας δημιουργίας σπορίων (Tsp) υπάρχουν



πολύ λίγα αρχικά δεδομένα από τις πειραματικές μελέτες που αξιοποιήθηκαν και επομένως δεν εμφανίζονται σε πολλές συναρτήσεις, οπότε δεν μπορεί να διεξαχθεί και ασφαλές συμπέρασμα για το ρόλο αυτών των παραγόντων.

**Πίνακας 3.2.1:** Συναρτήσεις επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων στην εξαρτημένη μεταβλητή lnD για διαφορετικά είδη και στελέχη του γένους Bacillus.

Species	Strain	Linear Regression Equation	Radj <sup>2</sup>
<i>B.stearothermophilus</i>		1)lnD=4.355-0.057*T+0.288*pH	0.271
		2)lnD=6.091-0.070*T+0.002*T*pH	0.269
		3)lnD=-2.057+1.284*pH-0.009*T*pH	0.257
	ATCC 7953	lnD=3.467-0.035*T	0.434
	ATCC 12980	1)lnD=-3.837+6.270*pH-0.046*T*pH	0.916
		2)lnD=30.021-0.274*T+0.568*pH	0.912
		3)lnD=33.400-0.301*T+0.005*T*pH	0.910
	TH 24	lnD=16.219-0.139*T	0.400
	NCIB 8920	1)lnD=47.376-0.387*T	0.966
		2)lnD=1.225+2.731*P-0.023*T*P	0.680
	NCIB 8923	1)lnD=37.131-0.294*T	0.982
		2)lnD=1.475+3.360*P-0.028*T*P	0.574
	ATCC 15951	1)lnD=15.648-0.163*T+2.821*pH-0.018*T*pH	0.987
		2)lnD=27.926-0.261*T+0.589*pH	0.982
		3)lnD=31.165-0.286*T+0.005*T*pH	0.978
	4)lnD=-4.692+6.373*pH-0.046*T*pH	0.972	
ATCC 15952	1)lnD=-5.618+6.445*pH-0.046*T*pH	0.967	
	2)lnD=27.189-0.265*T+0.766*pH	0.964	
	3)lnD=31.522-0.300*T+0.006*T*pH	0.959	
NCTC 10339	lnD=15.204-0.105*T	0.985	
NCIB 8919	lnD=37.475-0.300*T	0.852	
<i>B.cereus</i>		1)lnD=57.029-0.277*T-8.558*pH-30.294*aw+0.050*T*pH+7.425*P-0.037*T*pH*aw	0.501

	2)lnD=30.022-1.895*pH- 0.310*T*aw- 0.016*T*pH+0.037*T*pH*aw	0.500
	3)lnD=18.577-2.014*pH- 0.186*T*aw+2.055*pH*aw	0.499
	4)lnD=36.147-0.112*T-2.826*pH- 0.256*T*aw+0.030*T*pH*aw	0.498
CNRZ 110	<b>1)lnD=198.340-1.840*T- 33.211*pH- 201.015*aw+0.332*T*pH+1.829* T*aw+38.267*pH*aw- 0.378*pH*aw</b>	<b>0.986</b>
	2)lnD=14.349- 0.183*T*aw+2.000*pH*aw- 0.015*T*pH*aw	0.983
	3)lnD=24.106-0.101*T- 17.681*aw+3.307*pH*aw- 0.028*T*pH*aw	0.983
	4)lnD=38.099-0.126*T-29.914*aw- 0.022*T*pH+2.831*pH*aw	0.982
	5)lnD=11.386+2.410*pH- 0.151*T*aw-0.019*T*pH	0.982
	6)lnD=17.991-0.007*T*pH- 0.224*T*aw+1.297*pH*aw	0.981
	7)lnD=22.497-0.117*T+2.837*pH- 14.345*aw-0.024*T*pH	0.980
	8)lnD=14.548- 17.681*aw+5.108*pH*aw- 0.047*T*pH*aw	0.980
ATCC 9818	<b>1)lnD=23.923+0.340*T- 0.614*T*aw- 0.070*T*pH+0.077*T*pH*aw</b>	<b>0.849</b>
	2)lnD=23.870+0.169*T-5.069*pH- 0.428*T*aw+5.643*pH*aw	0.847
	3)lnD=85.259-0.214*T-7.720*pH- 67.935*aw+8.539*pH*aw	0.842
ATCC 4342	<b>1)lnD=28.205-0.309*T+0.097*Tsp</b>	<b>0.985</b>
	2)lnD=46.303-2.678*pH- 0.485*T*aw- 0.028*T*pH+0.058*T*pH*aw	0.916
	3)lnD=74.423-0.265*T-5.668*pH- 51.066*aw+6.087*pH*aw	0.913
	4)lnD=64.157-0.201*T-5.180*pH- 0.453*T*aw+0.053*T*pH*aw	0.912
	5)lnD=28.713-3.240*pH- 0.297*T*aw+3.388*pH*aw	0.908
	6)lnD=27.289-0.029*T*pH- 0.283*T*aw+0.030*T*pH*aw	0.905

ATCC 7004	<b>1)lnD=24.115+0.333*T-0.633*T*aw-0.070*T*pH+0.077*T*pH*aw</b>	<b>0.926</b>
	2)lnD=84.162-0.246*T-7.304*pH-65.636*aw+7.969*pH*aw	0.920
	3)lnD=49.987-3.594*pH-0.552*T*aw-0.024*T*pH+0.066*T*pH*aw	0.912
	4)lnD=30.864+0.147*T-49.988*aw-0.054*T*pH+5.861*pH*aw	0.910
	5)lnD=24.602-2.645*pH-0.270*T*aw+2.817*pH*aw	0.905
	6)lnD=30.754-33.719*aw-0.034*T*pH+3.638*pH*aw	0.900
ATCC 1479-8	<b>lnD=-315.472+3.323*T+49.382*pH-0.518*T*pH</b>	<b>0.864</b>
NZRM 984 (psychotroph)	<b>lnD=5.078-0.057*T</b>	<b>0.597</b>
ADQP 407	1)lnD=54.428-0.378*T-18.278*aw+0.005*T*pH	0.690
	2)lnD=54.428-0.345*T-21.601*aw+0.475*pH*aw	0.690
	3)lnD=32.827-0.345*T+3.086*pH-2.611*pH*aw	0.690
	4)lnD=36.150-0.196*T-0.183*T*aw+0.005*T*pH	0.690
	5)lnD=16.586+19.564*aw+0.005*T*pH-0.378*T*aw	0.690
	6)lnD=19.909-21.601*aw+5.406*pH*aw-0.049*T*pH*aw	0.690
	7)lnD=54.428-56.120*aw-0.049*T*pH+5.406*pH*aw	0.690
	8)lnD=51.104-0.345*T+0.475*pH-18.278*aw	0.690
T	<b>lnD=31.020-0.314*T</b>	<b>0.679</b>
EPSO-41WR,42WR,43WR,44HR,45HR,47HR,50UR	<b>lnD=24.979-0.252*T</b>	<b>0.799</b>
INRA AVZ 421	<b>lnD=28.697-0.277*T</b>	<b>0.994</b>
INRA AVTZ 415	<b>lnD=27.171-0.286*T</b>	<b>1</b>
<i>B.subtilis</i>	1)lnD=4.507-0.384*pH*aw	0.397
	2)lnD=4.451-0.027*T*aw	0.354
ATCC 9372	1)lnD=12.931-0.082*T+0.632*R.H	0.925

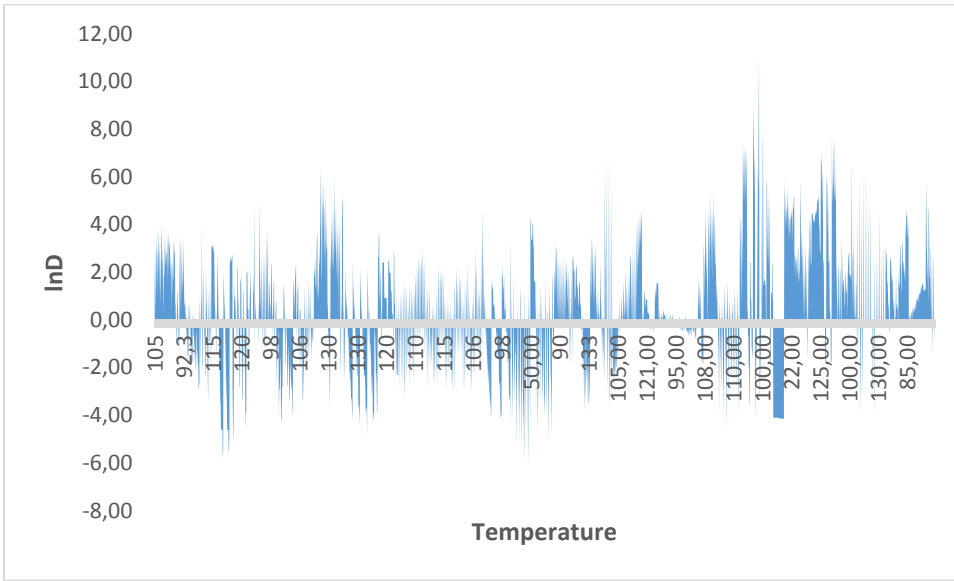
		2)lnD=13.209- 0.085*T+0.006*T*R.H	0.925
Spanish Type Culture 4524		<b>1)lnD=28.964-0.256*T- 0.064*Tinc</b>	<b>0.961</b>
		2)lnD=26.387-0.232*T- 0.001*T*Tinc	0.960
		3)lnD=1.613+0.587*Tinc- 0.006*T*Tinc	0.925
168		<b>1)lnD=-6.271+5.294*pH- 0.043*T*pH</b>	<b>0.992</b>
		2)lnD=20.353-0.285*T+1.258*pH	0.991
		3)lnD=28.659- 0.373*T+0.013*T*pH	0.990
MD2		<b>lnD=17.465-0.117*T</b>	<b>0.939</b>
<i>B.coagulans</i>		<b>1)lnD=6.363-0.078*T- 0.001*P+0.004*T*pH</b>	<b>0.890</b>
		2)lnD=5.529-0.071*T-(1.373E- 5)*T*P+0.004*T*pH	0.887
		3)lnD=4.320-0.061*T+0.461*pH	0.882
		4)lnD=5.084-0.062*T- 0.001*P+0.292*pH	0.880
		5)lnD=4.215-0.053*T+0.300*pH- (1.358E-5)*T*P	0.877
Spanish Type culture 4522		<b>lnD=11.855-0.135*T+2.396*pH- 0.017*T*pH</b>	<b>0.990</b>
ATCC 7050		<b>1)lnD=-3.852+8.217*pH- 0.067*T*pH</b>	<b>0.900</b>
		2)lnD=31.874- 0.330*T+0.009*T*pH	0.898
		3)lnD=27.640-0.291*T+0.973*pH	0.898
ATCC 8038		<b>lnD=26.920-0.260*T</b>	<b>0.954</b>
<i>B.licheniformis</i>		<b>1)lnD=5.574- 0.038*T+0.003*T*pH</b>	<b>0.963</b>
		2)lnD=4.865-0.024*T+0.131*pH	0.962
		3)lnD=5.574-0.024*T+(5.111E- 6)*T*pH*P	0.962
		4)lnD=8.004-0.086*T+0.131*pH- 0.006*P	0.961
		5)lnD=5.542- 0.004*T*pH+(1.316E-5)*T*pH*P	0.960
		6)lnD=8.712-0.100*T- 0.006*P+0.003*T*pH	0.961
		7)lnD=8.712-0.086*T-0.008*P	0.961
		8)lnD=3.717+0.338*pH- 0.004*T*pH	0.960
Spanish Type culture 4523		<b>lnD=-7.020+6.139*pH- 0.050*T*pH</b>	<b>0.984</b>

Κατά τον ίδιο τρόπο, πραγματοποιήθηκε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση για όλα τα data που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη (2131 εγγραφές και 1986 Dvalues και lnD values) για όλα τα είδη και στελέχη του γένους *Bacillus* ταυτόχρονα και το αποτέλεσμα φαίνεται στον Πίνακα 3.2.2. Στον Πίνακα 3.2.2 συμπεριλήφθηκαν μόνο οι συναρτήσεις με παραμέτρους στατιστικά σημαντικές. Οι υπόλοιπες απορρίφθηκαν. Σε κάποια είδη ή στελέχη παρατίθενται περισσότερες συναρτήσεις η μία κάτω από την άλλη με πρώτη αυτή που περιγράφει καλύτερα τα δεδομένα αδρανοποίησης. Όταν εμφανίζεται ένα μόνο μοντέλο αυτό συμβαίνει γιατί είναι το μόνο στατιστικά σημαντικό είτε γιατί οι υπόλοιπες συναρτήσεις που προέκυψαν εμφάνιζαν πολύ μικρή τιμή  $R^2$ .

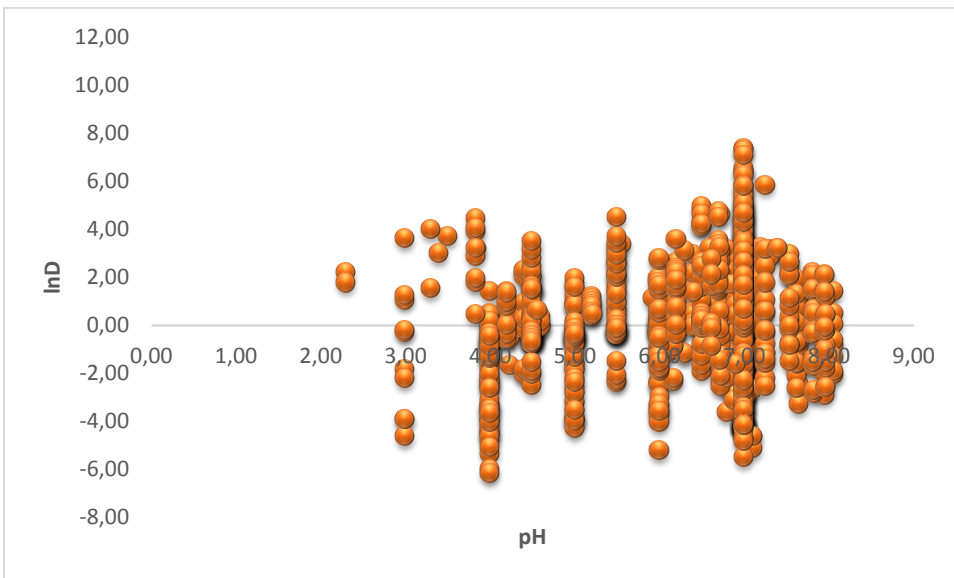
**Πίνακας 3.2.2:** Συναρτήσεις επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων στην εξαρτημένη μεταβλητή lnD για το γένος *Bacillus*.

<b>Genus</b>	<b>Linear Regression Equation</b>	<b>Radj<sup>2</sup></b>
<i>Bacillus spp.</i>	1)lnD=3.669-0.078*T-0.011*P+0.984*pH-(1.439E-5)*T*P*pH	0.779
	2)lnD=1.495-0.074*T+1.260*pH+(6.376E-5)*T*P-0.002*P*pH	0.769
	3)lnD=6.651-0.077*T+0.504*pH-0.011*P+(6.677E-5)*T*P	0.742
	4)lnD=3.397-0.048*T+0.572*pH-0.005*P	0.722
	5)lnD=60.149-0.283*T-8.627*pH-33.096*aw+0.047*T*pH+7.388*pH*aw-0.033*T*pH*aw	0.544

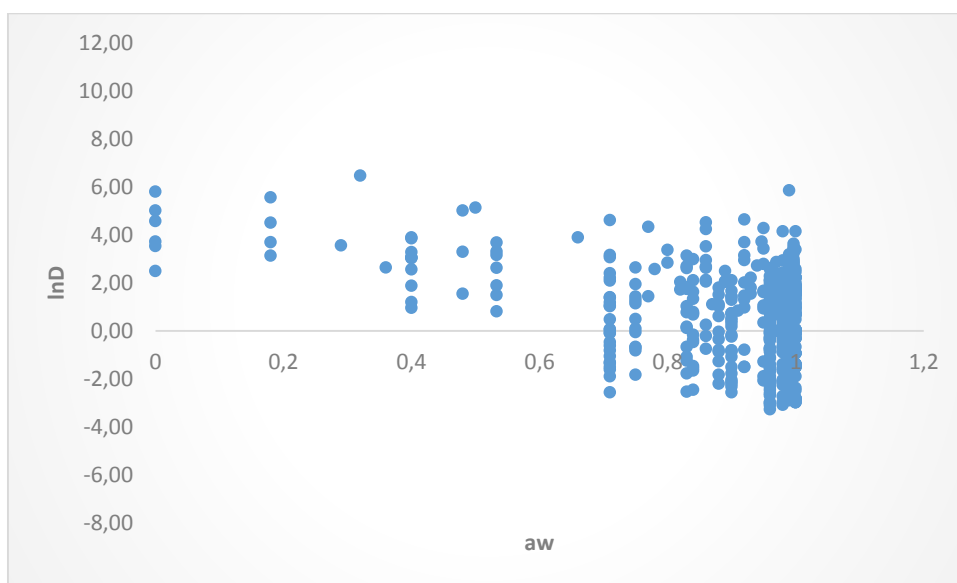
Επίσης, καταρτίστηκαν διαγράμματα διασποράς με τις κυρίαρχες ανεξάρτητες μεταβλητές T, pH, aw στον οριζόντιο άξονα και την εξαρτημένη μεταβλητή lnD στον κατακόρυφο άξονα για μια οπτική παρατήρηση του συνόλου των δεδομένων, δηλαδή για όλες τις εγγραφές και τα είδη και στελέχη του *Bacillus*. Το διάγραμμα για τη θερμοκρασία φαίνεται στο Σχήμα 3.2.1, για το pH στο σχήμα 3.2.2 και για το aw στο Σχήμα 3.2.3 αντίστοιχα.



**Σχήμα 3.2.1:** InD values όλων των ειδών Bacillus της μελέτης σε διαφορετικές θερμοκρασίες



**Σχήμα 3.2.2:** InD values όλων των ειδών Bacillus της μελέτης σε διαφορετικά pH



**Σχήμα 3.2.3:** lnD values όλων των ειδών *Bacillus* της μελέτης σε διαφορετικά aw

### 3.3 Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης για υποστρώματα

Μετά την πρώτη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στην ανθεκτικότητα που επιδεικνύουν διαφορετικά είδη και στελέχη του γένους *Bacillus spp.* στη διαδικασία θανάτωσης του μικροοργανισμού, διαπιστώθηκε ότι αρκετές συναρτήσεις δεν περιγράφουν αποτελεσματικά τη σχέση της εξαρτημένης μεταβλητής lnD με τις ανεξάρτητες μεταβλητές. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχουν πηγές μεταβλητότητας που χρειάζεται να διερευνηθούν, όπως αντικατοπτρίζεται σε πολλές τιμές του συντελεστή προσδιορισμού  $R^2$  που εμφανίζονται πολύ χαμηλότερες από το 1.

Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε και δεύτερη πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση με την ίδια εξαρτημένη και τις ίδιες ανεξάρτητες μεταβλητές, ανάλογα βέβαια όπως και προηγουμένως με το πλήθος των εγγραφών, λαμβάνοντας υπόψιν αυτή τη φορά την επίδραση των θρεπτικών υποστρωμάτων. Στις περιπτώσεις της πίεσης (P), της σχετικής υγρασίας (R.H), της θερμοκρασίας επώασης ( $T_{in}$ ) και της θερμοκρασίας δημιουργίας σπορίων ( $T_{sp}$ ) υπάρχουν πολύ λίγα αρχικά δεδομένα από τις πειραματικές μελέτες που

αξιοποιήθηκαν και επομένως δεν εμφανίζονται σε πολλές συναρτήσεις, οπότε δεν μπορεί να διεξαχθεί και ασφαλές συμπέρασμα για το ρόλο αυτών των παραγόντων.

Τα στοιχεία για τα θρεπτικά υποστρώματα είναι ποιοτικά και για αυτό το λόγο διενεργήθηκε γραμμική παλινδρόμηση με τις ίδιες μεταβλητές αλλά στη περίπτωση αυτή τα ποσοτικά δεδομένα προέρχονται μόνο από τα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τα συγκεκριμένα θρεπτικά υλικά. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν συμπεριλήφθηκαν όλα τα στοιχεία για όλα τα υποστρώματα που εμφανίσθηκαν στην παρούσα μελέτη καθώς κάποια υλικά εμφανίζονται σε πολύ μικρό πλήθος εγγραφών (λίγες μελέτες) και δεν μπορούν να αξιοποιηθούν στη στατιστική ανάλυση. Η ανάλυση έγινε όπου χρειαζόταν και συνδυαστικά με τα δεδομένα για τα διαφορετικά είδη και τα στελέχη του μικροοργανισμού και το πώς αυτά συμπεριφέρονται στα διαφορετικά θρεπτικά υλικά σε συνάρτηση με το περιβάλλον τους. Επίσης θεωρήθηκε χρήσιμο να συμπεριληφθεί στην ανάλυση της παρούσας μελέτης και η επίδραση των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκαν πειραματικά στη θανάτωση του *Bacillus*, αλλά δεν υπήρχαν πολλές εγγραφές για διαφορετικές μεθόδους καθώς στις μελέτες που αξιοποιήθηκαν κυριάρχησε η κλασική θερμική επεξεργασία.

Σε παραπάνω ενότητα έγινε αναλυτική αναφορά στα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες οι οποίες αξιοποιήθηκαν για την εξαγωγή των δεδομένων (data) πάνω στα οποία στηρίχθηκε η παρούσα εργασία. Κάποια από τα υποστρώματα αυτά εμφανίσθηκαν σε μικρό πλήθος εγγραφών με αποτέλεσμα να μην συμπεριληφθούν στην πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση που διενεργήθηκε με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης του υποστρώματος στην αδρανοποίηση του μικροοργανισμού σε σχέση με τους διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Βεβαίως οι αντίστοιχες εγγραφές αξιοποιήθηκαν στην αρχική πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση για τα είδη και τα στελέχη του *Bacillus*, καθώς και συνολικά για το γένος *Bacillus*.

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν και το αντίστοιχο πλήθος εγγραφών (n) για το κάθε ένα, ώστε να ελεγχθεί η επίδραση τους στην αδρανοποίηση του *Bacillus* είναι τα εξής:

Νερό: n=71

Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα: n=237

Τομάτα σε χυμό ή πουρέ: n=43

Σπαράγγι: n=29



Καρότο σε χυμό: n=29

Ρυθμιστικά διαλύματα pH (buffers) όλα μαζί και χωριστά: n=549

Εναιώρημα γαλακτώματος λουκάνικου (Frankfurter emulsion slurry): n=45

Διάλυμα γλυκερόλης: n=61

Διάλυμα σακχαρόζης: n=48

Διάλυμα χλωριούχου νατρίου: n=75

Διάλυμα χλωριούχου λιθίου: n=64

Ζωμός άλατος τρυπτόνης (TSB): n=135

Άγαρ φθορισμού-απονιτροποίησης (FNA): n=43

Θρεπτικό άγαρ ή ζωμός (Difco): n=56

Τα είδη και τα στελέχη τα οποία μελετήθηκαν ήταν τα εξής:

*B.subtilis*

*B.cereus*: ATCC 7004, ATCC 9818, ATCC 4342, INRA AVZ 421, INRA AVTZ 415

*B.stearothermophilus*: TH 24

*B.licheniformis*

*B.coagulans*: Spanish type culture, ATCC 8038

*B.anthraxis*: RP 42

Σε κάθε περίπτωση, όπως και παραπάνω ελέγχθηκε η στατιστική σημαντικότητα των συντελεστών, υπολογίστηκαν οι παράμετροι και τα  $R^2$ . Οι συναρτήσεις που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3. Ο Πίνακας 3.3 αποτελείται από 5 στήλες οι οποίες αντιπροσωπεύουν από αριστερά προς τα δεξιά τα υποστρώματα (media) που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, τα είδη (Species) του *Bacillus*, τα διάφορα στελέχη του κάθε είδους (Strains), τις συναρτήσεις που προέκυψαν από την παλινδρόμηση και το Συντελεστή Προσδιορισμού προσαρμοσμένο για τους βαθμούς ελευθερίας του μοντέλου ( $Radj^2$ ) που παρατίθεται στην τελευταία στήλη.

Σε κάποιες γραμμές που δεν αναφέρεται είδος ή στέλεχος ή και τα δύο, η παλινδρόμηση πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των δεδομένων (από διάφορα είδη ή στελέχη) για το

συγκεκριμένο υπόστρωμα. Στη στήλη Linear Regression Equation αναγράφονται οι συναρτήσεις που περιγράφουν καλύτερα τα δεδομένα της αδρανοποίησης του *Bacillus*. Η επιλογή των συναρτήσεων έγινε με βάση τον συντελεστή προσδιορισμού, προσαρμοσμένου για τους βαθμούς ελευθερίας του μοντέλου  $R_{adj}^2$ . Όσο πιο κοντά στο 1 είναι ο  $R_{adj}^2$  τόσο καλύτερα περιγράφει το μοντέλο τα δεδομένα. Επίσης διενεργήθηκε και ένα t test ώστε να ελεγχθεί η σημαντικότητα κάθε παραμέτρου στο μοντέλο. Αν η πιθανότητα  $P < 0.05$ , η παράμετρος θεωρείται στατιστικά σημαντική. Στην αντίθετη περίπτωση απορρίπτεται. Στον Πίνακα εμφανίζονται μόνο οι συναρτήσεις των οποίων οι παράμετροι είναι στατιστικά σημαντικές. Επίσης στις περιπτώσεις που εμφανίζονται περισσότερα από ένα μοντέλα, παρατίθενται στη σειρά το ένα κάτω από το άλλο, με πρώτο το μοντέλο που περιγράφει καλύτερα τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν. Σε άλλες περιπτώσεις εμφανίζεται μόνο ένα μοντέλο είτε γιατί ήταν το μόνο στατιστικά σημαντικό είτε γιατί οι υπόλοιπες συναρτήσεις εμφάνιζαν πολύ μικρό  $R^2$  αυτοτελώς ή σε σύγκριση με τον  $R^2$  του πρώτου μοντέλου.

**Πίνακας 3.3:** Συναρτήσεις επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων στην εξαρτημένη μεταβλητή lnD ως προς τα διαφορετικά θρεπτικά υλικά στα οποία καλλιεργήθηκαν είδη και στελέχη του γένους *Bacillus*.

Media	Species	Strain	Linear Regression Equation	$R_{adj}^2$
Water			1) $\ln D = 8.612 - 0.053 * T - 0.006 * P$	<b>0.899</b>
			2) $\ln D = 6.236 - 0.029 * T - (6.293E-5) * T * P$	0.848
	<i>B.stearother mophilus</i>	TH24 (UHT)	$\ln D = 27.494 - 0.213 * T$	<b>0.938</b>
		TH24 (UHT oilbath/capillary tube technique and computer controlled reactor)	$\ln D = -3.916 - 0.002 * T$	<b>0.575</b>
Milk + Dairy	<i>B.anthraxis</i>	RP 42 (HHP)	$\ln D = 9.220 - 0.055 * T - 0.008 * P$	<b>0.831</b>
			1) $\ln D = 10.422 - 0.097 * T$	<b>0.600</b>
			2) $\ln D = 10.622 - 0.057 * T - 0.588 * pH$	0.574

	<i>B.subtilis</i>		1)lnD=-6.259+5.291*pH-0.043*T*pH	0.992
			2)lnD=20.355-0.285*T+1.256*pH	0.991
			3)lnD=28.647-0.372*T+0.013*T*pH	0.990
	<i>B.cereus</i>		lnD=654.960-6.857*T-118.790*pH*aw+1.250*T*pH*aw	0.890
	<i>B.stearothermophilus</i>		lnD=22.514-0.180*T	0.870
	<i>B.licheniformis</i>		lnD=19.358-0.174*T	0.725
Skim milk			lnD=-926.371+9.373*T+143.278*pH-1.449*T*pH	0.741
No skim milk			lnD=148.414-1.511*T-20.428*pH+0.210*T*pH	0.750
Tomato	<i>B.coagulans</i>		lnD=12.110-0.124*T	0.455
			lnD=12.252-0.121*T	0.630
		Spanish Type Culture	1)lnD=7.621-0.101*T+2.812*pH-0.020*T*pH	0.998
			2)lnD=4.200+4.776*pH-0.037*T*pH	0.982
			3)lnD=23.421-0.236*T+0.004*T*pH	0.968
		ATCC 8038	lnD=26.932-0.260*T	0.954
	<i>B.licheniformis</i>		1)lnD=7.146+6.204*pH-0.050*T*pH	0.987
			2)lnD=19.451-0.250*T+0.863*pH	0.953
			3)lnD=23.570-0.288*T+0.008*T*pH	0.934
Asparagus			1)lnD=4.453+3.063*pH-0.023*T*pH	0.480
			2)lnD=8.179-0.114*T+0.495*pH	0.449
			3)lnD=10.539-0.134*T+0.004*T*pH	0.437
	<i>B.coagulans</i>		1)lnD=10.268-0.125*T+2.779*pH-0.020*T*pH	0.994
			2)lnD=-4.258+5.323*pH-0.041*T*pH	0.970
			3)lnD=24.906-0.250*T+0.004*T*pH	0.968
	<i>B.licheniformis</i>		1)lnD=-7.106+5.995*pH-0.048*T*pH	0.984

		2)lnD=16.597- 0.226*T+0.891*pH	0.929
		3)lnD=20.533- 0.262*T+0.008*T*pH	0.904
Egg		<b>lnD=31.981-0.274*T- 0.035*P</b>	<b>0.922</b>
Carrot		<b>1)lnD=5.570- 0.038*T+0.003*T*pH</b>	<b>0.962</b>
		<b>2)lnD=4.862- 0.024*T+0.131*pH</b>	<b>0.962</b>
		3)lnD=8.707-0.086*T- 0.008*P	0.961
		4)lnD=7.998- 0.086*T+0.131*pH- 0.006*P	0.961
		5)lnD=8.707-0.100*T- 0.006*P+0.003*T*pH	0.961
		6)lnD=3.716+0.338*pH- 0.004*T*pH	0.960
		7)lnD=4.862- 0.086*T+0.703*pH- 0.001*pH*P	0.955
Buffers		<b>1)lnD=69.745-0.248*T- 5.952*pH- 51.107*aw+6.895*pH*aw</b>	<b>0.888</b>
		<b>2)lnD=21.626+0.238*T- 5.673*pH- 0.516*T*aw+6.595*pH*aw</b>	<b>0.888</b>
		3)lnD=24.594+0.225*T- 0.535*T*aw- 0.062*T*pH+0.072*T*pH *aw	0.886
		4)lnD=68.725-0.278*T- 46.841*aw- 0.057*T*pH+0.066*T*pH *aw	0.877
		5)lnD=43.227-0.156*T- 3.383*pH- 0.337*T*aw+0.043*T*pH *aw	0.851
		6)lnD=69.622-0.455*T- 3.084*pH- 29.764*aw+0.040*T*pH* aw	0.846
Buffer	<i>B.subtilis</i>	<b>lnD=28.983-0.256*T- 0.064*Tin</b>	<b>0.961</b>
Phosphate Buffer		<b>1)lnD=44.502-0.502*T- 4.526*pH+0.056*T*pH</b>	<b>0.590</b>

(Butterfield's buffer)		2)lnD=13.899-0.185*T+0.009*T*pH	0.567
Phosphate Buffer	<i>B.cereus</i>	1)lnD=198.340-1.840*T-33.211*pH-201.015*aw+0.332*T*pH+1.829*T*aw+38.267*pH*aw-0.378*T*pH*aw	<b>0.986</b>
		2)lnD=24.106-0.101*T-17.681*aw+3.307*pH*aw-0.028*T*pH*aw	0.983
		3)lnD=11.386+2.410*pH-0.151*T*aw-0.019*T*pH	0.982
		4)lnD=38.099-0.126*T-29.914*aw-0.022*T*pH+2.831*pH*aw	0.982
		5)lnD=22.497-0.117*T+2.837*pH-14.345*aw-0.024*T*pH	0.980
		6)lnD=21.468-0.105*T+0.567*pH-0.151*T*aw	0.977
		7)lnD=38.099-0.248*T-17.681*aw+0.607*pH*aw	0.976
		8)lnD=24.586-0.105*T-0.185*T*aw+0.006*T*pH*aw	0.975
		9)lnD=24.586-0.137*T-0.151*T*aw+0.006*T*pH	0.974
		10)lnD=-2.080+2.964*pH+1.956*pH*aw-0.047*T*pH*aw	0.973
		11)lnD=38.099-0.280*T-14.345*aw+0.006*T*pH	0.973
		12)lnD=21.472-0.248*T+2.964*pH-2.545*pH*aw	0.969
Mclvaine Buffer	<i>B.subtilis</i>	lnD=22.460-0.224*T+0.056*Tsp	<b>0.670</b>
	<i>B.cereus</i>	lnD=16.471-0.187*T+0.060*Tsp	<b>0.440</b>
	<i>B.stearothermophilus</i>	1)lnD=11.909-0.131*T+3.318*pH-0.022*T*pH	<b>0.952</b>
		2)lnD=-4.429+6.167*pH-0.045*T*pH	0.944

			3)lnD=30.223- 0.277*T+0.004*T*pH	0.941
Frankfurter			1)lnD=12.302- 0.183*T+0.017*T*pH	0.463
			2)lnD=3.353- 0.105*T+1.955*pH	0.449
			3)lnD=-8.725+4.552*pH- 0.023*T*pH	0.427
Glycerol solution			1)lnD=16.031-0.066*T- 0.100*T*aw	0.493
			2)lnD=8.974+8.011*aw- 0.174*T*aw	0.492
			3)lnD=25.257-0.152*T- 10.636*aw	0.491
	<i>B.cereus</i>	ATCC 9818	1)lnD=3966.789-0.227*T- 583.035*pH- 4195.910*aw+620.370*pH*aw	0.981
			2)lnD=25.694+35.593*T- 38.064*T*aw- 5.300*T*pH+5.628*T*pH*aw	0.975
			3)lnD=41.196-0.221*T- 170.366*aw+22.438*pH*aw	0.884
			4)lnD=25.150-0.079*T- 1.485*T*aw+0.195*T*pH*aw	0.883
			5)lnD=16.257- 1.455*T*aw+1.504*pH*aw+0.177*T*pH*aw	0.879
			6)lnD=- 112.687+20.403*pH- 0.168*T*aw-0.012*T*pH	0.876
			7)lnD=25.103-1.296*T- 0.169*T*aw+0.181*T*pH	0.876
			8)lnD=-117.282- 0.221*T+23.496*pH- 2.822*pH*aw	0.876
			9)lnD=41.345-1.507*T- 19.033*aw+0.190*T*pH	0.874
			10)lnD=- 126.399+21.131*pH+1.478*pH*aw- 0.038*T*pH*aw	0.870
			11)lnD=12.535- 0.256*T*aw+2.126*pH*aw	0.836
			12)lnD=24.572-0.111*T- 0.123*T*aw	0.824

Sucrose solution		$\ln D = 347.977 - 0.150 * T - 54.638 * pH - 333.955 * a_w + 54.816 * pH * a_w$	<b>0.407</b>
NaCl solution		1) $\ln D = 924.024 - 0.173 * T - 118.538 * pH - 906.968 * a_w + 118.597 * pH * a_w$ 2) $\ln D = 17.989 + 8.061 * T - 8.240 * T * a_w - 1.077 * T * pH + 1.078 * T * pH * a_w$	<b>0.506</b> 0.499
	<i>B. cereus</i>	ATCC 7004	
		1) $\ln D = 4.794 - 0.072 * T * a_w + 2.965 * pH * a_w - 0.028 * T * pH * a_w$ 2) $\ln D = 14.944 - 0.013 * T * pH - 0.174 * T * a_w + 1.489 * pH * a_w$ 3) $\ln D = 25.110 - 0.026 * T * pH - 0.274 * T * a_w + 0.028 * T * pH * a_w$ 4) $\ln D = 25.078 - 0.197 * T - 0.065 * T * a_w$ 5) $\ln D = 72.603 - 0.690 * T - 5.590 * pH - 6.153 * a_w + 0.058 * T * pH$ 6) $\ln D = 4.724 + 2.712 * pH - 0.064 * T * a_w - 0.026 * T * pH$ 7) $\ln D = 23.691 - 0.256 * T + 0.935 * pH - 0.821 * pH * a_w$ 8) $\ln D = 5.103 + 2.824 * pH * a_w - 0.037 * T * pH * a_w$ 9) $\ln D = 30.470 - 0.250 * T - 0.888 * pH * a_w$	<b>0.989</b> 0.988 0.985 0.985 0.984 0.981 0.980 0.957 0.949
		ATCC 4342	
		1) $\ln D = 27.333 + 8.749 * T - 9.051 * T * a_w - 1.178 * T * pH + 1.182 * T * pH * a_w$ 2) $\ln D = 961.381 - 0.266 * T - 122.020 * pH - 937.899 * a_w + 122.472 * pH * a_w$ 3) $\ln D = 30.600 - 3.473 * pH - 0.290 * T * a_w + 3.311 * pH * a_w$ 4) $\ln D = 27.333 - 0.226 * T - 0.044 * T * a_w$	<b>0.960</b> 0.956 0.942 0.934

	5)lnD=27.358-0.029*T*pH-0.258*T*aw+0.028*T*pH*aw	0.933
	6)lnD=4.325+3.391*pH*aw-0.039*T*pH*aw	0.933
	7)lnD=32.383-31.823*aw-0.036*T*pH+3.552*pH*aw	0.925
	8)lnD=31.863-0.266*T-0.666*pH*aw	0.922
ATCC 9818	<b>1)lnD=519.478-0.415*T-66.559*pH-479.316*aw+0.038*T*pH+64.648*pH*aw-0.014*T*pH*aw</b>	<b>0.994</b>
	<b>2)lnD=485.351-0.092*T-62.519*pH-463.887*aw+63.203*pH*aw-0.148*T*aw</b>	<b>0.994</b>
	3)lnD=533.078-0.567*T-67.019*pH-476.484*aw+0.046*T*pH+62.730*pH*aw	0.993
	4)lnD=25.394+4.138*T-4.414*T*aw-0.575*T*pH+0.581*T*pH*aw	0.992
	5)lnD=494.691-0.226*T-61.794*pH-474.496*aw+62.443*pH*aw	0.990
	6)lnD=14.133-0.012*T*pH-0.150*T*aw+1.689*pH*aw	0.988
	7)lnD=24.581-2.747*pH-0.249*T*aw+3.143*pH*aw	0.987
	8)lnD=25.417-0.026*T*pH-0.255*T*aw+0.029*T*pH*aw	0.987
	9)lnD=25.412-0.219*T-0.034*T*aw+0.003*T*pH	0.986



	<b>10)</b> $\ln D = 25.412 - 0.195 * T - 0.058 * T * a_w + 0.003 * T * pH * a_w$	0.986
	<b>11)</b> $\ln D = 3.947 - 0.056 * T * a_w + 3.204 * pH * a_w - 0.026 * T * pH * a_w$	0.985
	<b>12)</b> $\ln D = 3.974 - 5.905 * a_w + 4.003 * pH * a_w - 0.034 * T * pH * a_w$	0.985
	<b>13)</b> $\ln D = 22.651 - 0.226 * T + 0.819 * pH - 0.494 * pH * a_w$	0.984
	<b>14)</b> $\ln D = 25.458 - 0.191 * T - 0.040 * T * a_w$	0.983
	<b>15)</b> $\ln D = 29.401 - 31.103 * a_w - 0.031 * T * pH + 3.618 * pH * a_w$	0.979
	<b>16)</b> $\ln D = 4.316 + 3.105 * pH * a_w - 0.033 * T * pH * a_w$	0.961
	<b>17)</b> $\ln D = 28.850 - 0.223 * T - 0.570 * pH * a_w$	0.958
LiCl solution	<b>1)</b> $\ln D = -77.144 + 1.010 * T + 12.059 * pH - 0.148 * T * pH - 0.314 * pH * a_w$	<b>0.764</b>
	<b>2)</b> $\ln D = -74.560 + 1.001 * T + 11.701 * pH - 2.283 * a_w - 0.146 * T * pH$	0.763
	<b>3)</b> $\ln D = 26.081 - 3.026 * pH + 1.614 * pH * a_w - 0.019 * T * pH * a_w$	0.744
<i>B.cereus</i>	<b>1)</b> $\ln D = 19.065 + 0.550 * T - 0.051 * T * a_w - 0.087 * T * pH$	<b>0.531</b>
	<b>2)</b> $\ln D = 75.274 - 7.093 * pH - 0.051 * T * a_w - 0.018 * T * pH$	0.530
	<b>3)</b> $\ln D = 89.782 - 0.142 * T - 8.924 * pH - 0.050 * T * a_w$	0.530
	<b>4)</b> $\ln D = 23.780 + 0.499 * T - 5.310 * a_w - 0.087 * T * pH$	0.529
	<b>5)</b> $\ln D = 89.104 - 0.187 * T - 8.259 * pH - 0.653 * pH * a_w$	0.528
	<b>6)</b> $\ln D = 90.244 - 10.846 * pH - 0.208 * T * a_w + 2.061 * pH * a_w$	0.527
	<b>7)</b> $\ln D = 70.208 - 8.332 * pH + 2.071 * pH * a_w - 0.026 * T * pH * a_w$	0.524
ATCC 7004	<b>1)</b> $\ln D = 1199.059 - 0.248 * T - 145.787 * pH -$	<b>0.976</b>

	<b>1217.270*aw+151.049*pH*aw</b>	
	<b>2)lnD=24.066+11.624*T-12.299*T*aw-1.473*T*pH+1.526*T*pH*aw</b>	<b>0.976</b>
ATCC 4342	<b>1)lnD=26.201-3.182*T+331.232*aw+0.372*T*pH-42.162*pH*aw</b>	<b>0.988</b>
	<b>2)lnD=3.176+24.930*aw-0.036*T*pH*aw</b>	0.985
	<b>3)lnD=46.594-5.512*pH-0.285*T*aw+3.185*pH*aw</b>	0.983
	<b>4)lnD=24.673-4.260*T+4.328*T*aw+0.509*T*pH-0.549*T*pH*aw</b>	0.981
	<b>5)lnD=1.998+3.331*pH*aw-0.036*T*pH*aw</b>	0.980
	<b>6)lnD=319.085-2.899*T-36.773*pH+0.336*T*pH-0.548*pH*aw</b>	0.979
	<b>7)lnD=24.599-0.026*T*pH-0.045*T*aw</b>	0.975
	<b>8)lnD=24.572-0.026*T*pH-0.006*T*pH*aw</b>	0.975
ATCC 9818	<b>1)lnD=23.600-1.816*T+170.954*aw+0.201*T*pH-21.513*pH*aw</b>	<b>0.996</b>
	<b>2)lnD=13.006-0.287*T+13.403*aw+0.022*T*pH-0.016*T*pH*aw</b>	0.995
	<b>3)lnD=11.388-0.013*T*pH-0.144*T*aw+1.930*pH*aw</b>	0.995
	<b>4)lnD=12.972+13.438*aw-0.015*T*pH-0.293*T*aw+0.021*T*pH*aw</b>	0.994
	<b>5)lnD=143.669-0.218*T-15.059*pH-1.193*T*aw+0.150*T*pH*aw</b>	0.993
	<b>6)lnD=0.856+3.407*pH*aw-0.032*T*pH*aw</b>	0.991
	<b>7)lnD=24.965-0.029*T*pH-</b>	0.990

			$0.282 \cdot T \cdot a_w + 0.035 \cdot T \cdot \text{pH} \cdot a_w$	
			<b>8) <math>\ln D = 22.192 - 2.714 \cdot \text{pH} - 0.254 \cdot T \cdot a_w + 3.412 \cdot \text{pH} \cdot a_w</math></b>	0.990
			<b>9) <math>\ln D = 25.261 - 30.057 \cdot a_w - 0.029 \cdot T \cdot \text{pH} + 3.772 \cdot \text{pH} \cdot a_w</math></b>	0.988
TSB			<b>1) <math>\ln D = -2.271 - 2.968 \cdot \text{pH} + 0.035 \cdot T \cdot \text{pH}</math></b>	<b>0.772</b>
			<b>2) <math>\ln D = -21.810 + 0.205 \cdot T + 0.004 \cdot T \cdot \text{pH}</math></b>	0.771
			<b>3) <math>\ln D = -24.595 + 0.234 \cdot T + 0.421 \cdot \text{pH}</math></b>	0.770
TSB (no acid)	<i>B.cereus</i>	ADQP 407	<b>1) <math>\ln D = 51.104 - 0.345 \cdot T + 0.475 \cdot \text{pH} - 18.278 \cdot a_w</math></b>	0.690
			<b>2) <math>\ln D = 54.428 - 0.049 \cdot T \cdot \text{pH} - 56.120 \cdot a_w + 5.406 \cdot \text{pH} \cdot a_w</math></b>	0.690
			<b>3) <math>\ln D = 54.428 - 0.378 \cdot T - 18.278 \cdot a_w + 0.005 \cdot T \cdot \text{pH}</math></b>	0.690
			<b>4) <math>\ln D = 54.428 - 0.345 \cdot T - 21.601 \cdot a_w + 0.475 \cdot \text{pH} \cdot a_w</math></b>	0.690
			<b>5) <math>\ln D = 32.827 - 0.345 \cdot T + 3.086 \cdot \text{pH} - 2.611 \cdot \text{pH} \cdot a_w</math></b>	0.690
			<b>6) <math>\ln D = 36.150 - 0.196 \cdot T - 0.183 \cdot T \cdot a_w + 0.005 \cdot T \cdot \text{pH}</math></b>	0.690
			<b>7) <math>\ln D = 16.586 + 19.564 \cdot a_w + 0.005 \cdot T \cdot \text{pH} - 0.378 \cdot T \cdot a_w</math></b>	0.690
			<b>8) <math>\ln D = 19.909 - 21.601 \cdot a_w + 5.406 \cdot \text{pH} \cdot a_w - 0.049 \cdot T \cdot \text{pH} \cdot a_w</math></b>	0.690
FNA			<b><math>\ln D = 21.146 - 0.212 \cdot T</math></b>	<b>0.566</b>
	<i>B.cereus</i>	INRA AVZ 421	<b><math>\ln D = 28.697 - 0.277 \cdot T</math></b>	<b>0.994</b>
		INRA AVTZ 415	<b><math>\ln D = 27.171 - 0.286 \cdot T</math></b>	<b>1</b>
Difco			<b><math>\ln D = 12.612 - 0.111 \cdot R.H</math></b>	<b>0.834</b>

## 4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 4.1 Επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στην αδρανοποίηση ως προς τα διάφορα είδη και στελέχη του *Bacillus spp.*

Επίδραση της T:

Η θερμοκρασία συμμετέχει σε όλες τις συναρτήσεις είτε ως μεμονωμένος παράγοντας είτε ως μία από τις ανεξάρτητες μεταβλητές σε μία πολυπαραγοντική αλληλεπίδραση μεταξύ 2 ή 3 περιβαλλοντικών παραγόντων. Στην πλειοψηφία των συναρτήσεων τόσο για τα είδη όσο και τα στελέχη του *Bacillus* που συμμετείχαν στην ανάλυση, η θερμοκρασία ως μεμονωμένος παράγοντας επιδρά θετικά στην ταχύτητα αδρανοποίησης. Επομένως μεγαλύτερη θερμοκρασία οδηγεί σε γρηγορότερη θανάτωση του οργανισμού. Στις μόνες περιπτώσεις που η επίδραση της θερμοκρασίας έχει το αντίθετο αποτέλεσμα δηλαδή μείωση της ταχύτητας αδρανοποίησης είναι 5 συναρτήσεις για τα στελέχη ATCC 9818, ATCC 7004, ATCC 1479-8 του *B.cereus*. Είναι πιθανό αυτά τα στελέχη να διαφοροποιούνται όσο αφορά στην επίδραση της θερμοκρασίας κατά τη διαδικασία αδρανοποίησής τους σε σύγκριση με άλλα στελέχη του ίδιου είδους ή με άλλα είδη. Αναζητήθηκε κάποιο μοτίβο μοντέλου παραγόντων και αλληλεπιδράσεων που να εξηγεί αυτή τη διαφορά στις συγκεκριμένες συναρτήσεις αυτών των στελεχών αλλά δεν προέκυψε κάποιο συγκεκριμένο αποτέλεσμα.

Επίδραση του pH:

Το pH συμμετέχει, είτε ως μεμονωμένος επιδρών παράγοντας είτε σε αλληλεπίδραση με άλλες μεταβλητές, στο 76% των συναρτήσεων, γεγονός που δηλώνει τη σημαντικότητα του στη διαδικασία θανάτωσης του μικροοργανισμού. Σε μεγαλύτερο ποσοστό (60%), το pH επιδρά αρνητικά στη αδρανοποίηση, υψηλότερη τιμή pH οδηγεί σε πιο αργή θανάτωση του *Bacillus*. Στις συναρτήσεις αυτές παρατηρήθηκε ότι κατά πλειοψηφία εμφανίζεται αλληλεπίδραση της θερμοκρασίας με το pH ( $T \cdot pH$ ) η οποία επιδρά θετικά στην ταχύτητα αδρανοποίησης, επομένως η επίδραση της θερμοκρασίας στο pH ενδέχεται να εξουδετερώνει την αρνητική επιβολή του pH στη θανάτωση του οργανισμού. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε σε όλα τα στελέχη των ειδών *B.stearothermophilus*, *B.subtilis* και *B.licheniformis* και μόνο σε έξι περιπτώσεις του είδους *B.cereus* για τα στελέχη CNRZ 110, ATCC 1479-8, ADQP 407.

Σε ποσοστό 40% των συναρτήσεων, το pH προκαλεί θετικό αποτέλεσμα στην αδρανοποίηση. Στην πλειοψηφία αυτών των συναρτήσεων εμφανίζεται ταυτόχρονη αλληλεπίδραση δύο ή τριών παραγόντων (T, pH, aw) και σε μεγαλύτερο βαθμό παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ θερμοκρασίας και ενεργότητας ύδατος ( $T \cdot aw$ ) και μεταξύ pH και ενεργότητας ύδατος ( $pH \cdot aw$ ), άλλοτε με θετικό και άλλοτε με αρνητικό πρόσημο στη συνάρτηση. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε σε συναρτήσεις που προέκυψαν από την ανάλυση του *B.cereus*.

Επίδραση του aw:

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα της πρώτης πολλαπλής παλινδρόμησης, παρατηρούμε ότι η ενεργότητα ύδατος εμφανίζεται αυτόνομα ή συμμετέχοντας σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεταβλητών σε μικρότερο ποσοστό (39%). Συγκεκριμένα απουσιάζει εντελώς από τις συναρτήσεις που αφορούν στα είδη *B.stearothermophilus* και *B.licheniformis*, αποδεικνύοντας ότι μάλλον για αυτά τα είδη *Bacillus*, το aw δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη σημασία ως επιδρών παράγοντας στη διαδικασία αδρανοποίησής του. Από την άλλη πλευρά, φαίνεται να παρουσιάζει ενδιαφέρον για το είδος *B.cereus* καθώς εμφανίζεται σε όλα σχεδόν τα μοντέλα που προέκυψαν από την ανάλυση των δεδομένων του. Επιπλέον, συμμετέχει και στο μοντέλο για το είδος *B.subtilis* αλλά μόνο στη στατιστική ανάλυση για το σύνολο των δεδομένων του. Στις συναρτήσεις που προέκυψαν από τις επιμέρους εξιδεικευμένες αναλύσεις για τα είδη ή στελέχη, το aw δεν φαίνεται να έχει κάποια σημασία.

Σε όλες τις συναρτήσεις η ενεργότητα ύδατος παρουσιάζει θετική επίδραση στην ταχύτητα αδρανοποίησης του οργανισμού, δηλαδή υψηλότερη τιμή aw οδηγεί σε γρηγορότερη θανάτωση. Επιπλέον, στην πλειοψηφία αυτών των συναρτήσεων εμφανίζονται η θερμοκρασία και το pH και ως μεμονωμένοι παράγοντες και ως συμμετέχοντες σε δύο ή περισσότερες πολυπαραγοντικές αλληλεπιδράσεις. Η ερμηνεία μπορεί να είναι ότι η επίδραση του aw στον οργανισμό *Bacillus* και πιο συγκεκριμένα στο είδος *B.cereus*, παρουσιάζει ενδιαφέρον να μελετηθεί όταν συνοδεύεται από ταυτόχρονη αλληλεπίδραση του με τους άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Από την παρατήρηση των αποτελεσμάτων της στατιστικής ανάλυσης προκύπτει ότι στις περισσότερες περιπτώσεις όταν η ανάλυση πραγματοποιείται στο σύνολο των δεδομένων για κάθε είδος χωρίς διαφοροποίηση σε συγκεκριμένα στελέχη, οι συναρτήσεις δεν

περιγράφουν αποτελεσματικά τα δεδομένα. Όταν όμως η ανάλυση εξειδικεύεται σε συγκεκριμένα στελέχη, εμφανίζεται μεγαλύτερη βελτίωση στην περιγραφή των δεδομένων αδρανοποίησης (inactivation data). Αυτό φαίνεται από τον συντελεστή προσδιορισμού  $R_{adj}^2$  που παρουσιάζει αύξηση της τιμής του και πλησιάζει το 1.

Οι διαφορές ανάμεσα στις γενικές συναρτήσεις για κάθε είδος και τα μοντέλα της εξειδικευμένης ανάλυσης σε κάθε στέλεχος φαίνεται στον Πίνακα 3.2.2. Για το είδος *B.cereus* το γενικό μοντέλο χαρακτηρίζεται από  $R_{adj}^2=0.501$ , ενώ όταν η ανάλυση ειδικεύεται στα στελέχη του, τότε παρατηρείται μεγάλη αύξηση στην τιμή του  $R_{adj}^2$ , ανάλογα και με το στέλεχος. Συγκεκριμένα για τα στελέχη CNRZ 110:  $R_{adj}^2=0.986$ , ATCC 9818:  $R_{adj}^2=0.849$ , ATCC 4342: 0.985, ATCC 7004: 0.926, ATCC 1479-8: 0.864, EPSO 41WR, 42WR, 43WR, 44HR, 45HR, 47HR, 50UR: 0.799, INRA AVZ 421: 0.994 και INRA AVTZ 415:  $R_{adj}^2=1$ . Υπάρχουν όμως και τρεις περιπτώσεις στελεχών που η ανάλυσή τους δεν προσθέτει στην περιγραφή των δεδομένων: NZRM 984 (psychotroph):  $R_{adj}^2=0.597$ , ADQP 407: 0.690 και T: 0.679. Στην περίπτωση του είδους *B.stearotherophilus* είναι ιδιαίτερος εμφανής η μεταβλητότητα που παρουσιάζουν τα δεδομένα όταν η ανάλυση είναι γενική χωρίς εξειδίκευση στα στελέχη του είδους. Για το γενικό μοντέλο, ο συντελεστής προσδιορισμού είναι ιδιαίτερος χαμηλός:  $R_{adj}^2=0.271$  και ουσιαστικά η συνάρτηση δεν περιγράφει καθόλου αντικειμενικά τα δεδομένα αδρανοποίησης. Όταν όμως η ανάλυση γίνεται για κάθε στέλεχος ξεχωριστά τα μοντέλα βελτιώνονται σημαντικά. Για ATCC 12980:  $R_{adj}^2=0.916$ , NCIB 8920: 0.966, NCIB 8923: 0.982, ATCC 15951: 0.987, ATCC 15952: 0.967, NCTC 10339: 0.985 και NCIB 8919: 0.852. Προέκυψαν όμως δύο συναρτήσεις στελεχών με σχετικά χαμηλό  $R_{adj}^2$ , αλλά και πάλι πιο αποτελεσματικές συγκριτικά με το γενικό μοντέλο. Συγκεκριμένα για το ATCC 7953:  $R_{adj}^2=0.434$  και για TH 24:  $R_{adj}^2=0.400$ . Κάτι αντίστοιχο με το *B.stearotherophilus*, παρατηρείται και στην περίπτωση του είδους *B.subtilis*, όπου το γενικό μοντέλο χαρακτηρίζεται από  $R_{adj}^2=0.397$ , ενώ για τα στελέχη ο συντελεστής προσδιορισμού πλησιάζει το 1. Για ATCC 9372: 0.925, Spanish Type Culture 4524: 0.961, 168: 0.992 και MD2: 0.939.

Αντίθετα στις περιπτώσεις των ειδών *B.coagulans* και *B.licheniformis* δεν παρατηρήθηκε μεγάλη μεταβλητότητα καθώς και τα γενικά μοντέλα αλλά και οι συναρτήσεις που προέκυψαν από την εξειδίκευση της ανάλυσης στα επιμέρους στελέχη, περιγράφουν με αποτελεσματικό τρόπο τα δεδομένα. Είναι όμως πιθανό η έλλειψη μεταβλητότητας που παρατηρήθηκε να οφείλεται στο γεγονός ότι και για τα δυο αυτά είδη τα εισαγόμενα δεδομένα ήταν λιγότερα σε αριθμό και κάποια από αυτά προέρχονταν από ίδιες μελέτες. Για

το είδος *B.coagulans* το γενικό μοντέλο χαρακτηρίζεται από  $R_{adj}^2=0.890$ , ενώ για τα στελέχη Spanish Type Culture 4522: 0.990, ATCC 7050: 0.900 και ATCC 8038: 0.954. Στην περίπτωση του *B.licheniformis* η συνάρτηση για το σύνολο των δεδομένων παρουσιάζει  $R_{adj}^2=0.963$  και το μοντέλο για το στέλεχος Spanish Type Culture 4523:  $R_{adj}^2=0.984$ .

Παρατηρώντας τα μοντέλα που προέκυψαν για το σύνολο των δεδομένων για όλα τα είδη και στελέχη του *Bacillus* που συμμετείχαν στην ανάλυση, συμπεραίνεται ότι οι συναρτήσεις που περιγράφουν καλύτερα τα δεδομένα, περιλαμβάνουν τις μεταβλητές: θερμοκρασία, pH και πίεση (P). Παρατηρήθηκε όμως ότι κάποιες παράμετροι είναι οριακά στατιστικά σημαντικές και η τιμή τους πολύ μικρή. Από την άλλη, για τη συνάρτηση που περιλαμβάνει τις τρεις κυρίαρχες μεταβλητές T, pH,aw, οι παράμετροι προκύπτουν στατιστικά σημαντικές και περιλαμβάνουν αρκετές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων, όμως ο συντελεστής προσδιορισμού υποδηλώνει ότι υπάρχει μέρος μεταβλητότητας που δεν έχει περιγραφεί. Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν η έλλειψη δεδομένων για αρκετά είδη που συμμετείχαν στην ανάλυση και η διασπορά οφείλεται και στην χρήση πειραματικών δεδομένων από πολυάριθμες μελέτες.

## **4.2 Επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στην αδρανοποίηση ως προς τα διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας του *Bacillus spp.***

Επίδραση της T:

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα που διεξάχθηκαν από την δεύτερη πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση, γίνεται αντιληπτό ότι η θερμοκρασία διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στη διαδικασία θανάτωσης του μικροοργανισμού σε όλες τις περιπτώσεις των υποστρωμάτων είτε στο σύνολο, είτε για μεμονωμένα είδη ή στελέχη. Συγκεκριμένα εμφανίζεται σε όλες τις συναρτήσεις, σε κάποιες από αυτές ως μεμονωμένος επιδρών παράγοντας και σε άλλες ως μία εκ των ανεξάρτητων μεταβλητών T,pH,aw συμμετέχοντας σε μία πολυπαραγοντική αλληλεπίδραση μεταξύ 2 ή 3 παραγόντων.

Επίσης παρατηρήθηκε ότι στην πλειοψηφία των δεδομένων, μεγαλύτερη θερμοκρασία οδηγεί σε μείωση του χρόνου που απαιτείται για να θανατωθεί ο μικροοργανισμός, άρα υψηλότερη θερμοκρασία σημαίνει και αποτελεσματικότερη αδρανοποίηση του *Bacillus* σε όλα σχεδόν τα υποστρώματα.

Σε μεμονωμένες περιπτώσεις όμως παρατηρήθηκε το αντίθετο, ότι δηλαδή η επίδραση της θερμοκρασίας ως μεμονωμένου παράγοντα είχε το αντίθετο αποτέλεσμα, δηλαδή μείωση της ταχύτητας αδρανοποίησης του *Bacillus*. Αυτό εμφανίστηκε στο αποβουτυρωμένο γάλα (skim milk), σε ρυθμιστικά διαλύματα (buffers), στο χλωριούχο νάτριο (NaCl), χλωριούχο λίθιο (LiCl), στο είδος *B.cereus* στο NaCl και LiCl και σε διάλυμα γλυκερόλης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε κατά πλειοψηφία, όταν υπήρχε ταυτόχρονη πολυπαραγοντική επίδραση της θερμοκρασίας με έναν ( $T^*pH$ ,  $T^*aw$ ) ή και με τους άλλους δύο ( $T^*pH^*aw$ ) περιβαλλοντικούς παράγοντες που εξετάστηκαν δηλαδή το pH και την ενεργότητα ύδατος aw. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι αλληλεπίδραση των παραγόντων μεταξύ τους, στην περίπτωση των  $T^*pH$  και  $T^*aw$  είχε αρνητικό πρόσημο στη συνάρτηση και θετική επίδραση στη θανάτωση του οργανισμού, ενώ ο παράγοντας  $T^*pH^*aw$  είχε αρνητική επίδραση στην ταχύτητα αδρανοποίησης.

#### Επίδραση του pH:

Το pH εμφανίζεται στις περισσότερες συναρτήσεις που περιγράφουν τα δεδομένα. Η μη συμμετοχή της ως ανεξάρτητης μεταβλητής σε κάποια μοντέλα μπορεί να οφείλεται στην ελλιπή διαθεσιμότητα πρωτογενών δεδομένων όπως για παράδειγμα στο γάλα για τα είδη *B.stearothermophilus* και *B.licheniformis* και στο Difco.

Σε άλλες όμως συναρτήσεις δεν υπάρχει η μεταβλητή pH, καθώς προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση ως μη στατιστικά σημαντική και απορρίπτεται. Αυτό παρατηρήθηκε όταν ως θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε τοματοχυμός ή πουρές τομάτας, αυγό, buffer, διάλυμα γλυκερόλης, FNA. Στις περιπτώσεις αυτές εκτός από το FNA, το pH προέκυψε μη στατιστικά σημαντικό όταν η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των δεδομένων για το εκάστοτε υπόστρωμα, ενώ όταν η ανάλυση ειδικεύτηκε σε συγκεκριμένο είδος ή στέλεχος το pH ήταν στατιστικά σημαντικό. Κατά τον τρόπο αυτό εξηγείται και ένα μέρος της μεταβλητότητας που εμφανίζεται στα μοντέλα που δεν περιλαμβάνουν το pH και το  $R^2$  είναι αρκετά μικρό. Από την άλλη όταν η στατιστική ανάλυση έγινε για κάποιο είδος ή στέλεχος ξεχωριστά, το μοντέλο που προκύπτει περιγράφει αποτελεσματικότερα τα δεδομένα, επομένως συμπεραίνεται ότι το είδος ή το στέλεχος του *Bacillus* θα πρέπει να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην επίδραση που έχει το pH στην αδρανοποίηση του οργανισμού, μόνο του ή σε αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες.

Παρατηρώντας τις συναρτήσεις στις οποίες συμμετέχει το pH ως μεμονωμένος περιβαλλοντικός παράγοντας διαπιστώνεται ότι στα μισά περίπου μοντέλα, επιδρά θετικά



στο  $\ln D$ , δηλαδή μεγαλύτερο pH οδηγεί σε πιο αργή θανάτωση του οργανισμού ενώ σε περιβάλλοντα χαμηλότερου pH, ο *Bacillus* παρουσιάζει πολύ μικρή ανθεκτικότητα. Επιπλέον στο 72% αυτών των συναρτήσεων υπάρχει αλληλεπίδραση του pH με τη θερμοκρασία T, η οποία έχει αρνητική επίδραση στην εξαρτημένη μεταβλητή  $\ln D$ . Επομένως θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι μπορεί να υπάρχει μία συσχέτιση ανάμεσα στην αρνητική επίδραση του pH μεμονωμένα στην αδρανοποίηση και στην ταυτόχρονη θετική αλληλεπίδραση  $T \cdot \text{pH}$ . Είναι πιθανό η επίδραση της θερμοκρασίας πάνω στο pH να εξουδετερώνει την αρνητική επίδραση του υψηλότερου pH στην αδρανοποίηση του *Bacillus*.

Από την άλλη πλευρά, στο υπόλοιπο 50% των συναρτήσεων, υψηλότερη τιμή pH φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας αδρανοποίησης του μικροοργανισμού. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε όταν στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω θρεπτικά υλικά: γαλακτοκομικά, buffers, διάλυμα σακχαρόζης, διαλύματα NaCl και LiCl και TSB. Επίσης, εξετάζοντας τα συγκεκριμένα μοντέλα φάνηκε ότι στο 80% των συναρτήσεων που το pH είχε αρνητική επίδραση στο  $\ln D$ , συνδυαζόταν με ταυτόχρονη αλληλεπίδραση του pH με το aw. Είναι επομένως πιθανό η ταυτόχρονη αλληλεπίδραση του pH με την ενεργότητα ύδατος να σχετίζεται με τη θετική επίδραση του pH στη θανάτωση του *Bacillus*. Επιπλέον η αλληλεπίδραση  $\text{pH} \cdot \text{aw}$  των δύο παραγόντων εμφανίζεται με θετικό πρόσημο στις συναρτήσεις, λειτουργεί δηλαδή ως ανασταλτικός παράγοντας αδρανοποίησης.

Επίδραση του aw:

Η ενεργότητα ύδατος aw εμφανίζεται στις συναρτήσεις που προέκυψαν από την ανάλυση σε ποσοστό 64.5%. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις υποστρωμάτων: γαλακτοκομικά, σπαράγγι, καρότο, phosphate και McInaine buffer, frankfurter emulsion, TSB και Difco, η απουσία του aw από τα αποτελέσματα οφείλεται αποκλειστικά στην έλλειψη πειραματικών δεδομένων από τις μελέτες που αξιοποιήθηκαν. Μόνο στην περίπτωση του αυγού ως θρεπτικό υλικό, το aw προέκυψε μη στατιστικά σημαντικό.

Επίσης, σε όλες τις συναρτήσεις το aw είχε αρνητική επίδραση στο  $\ln D$ . Δηλαδή μεγαλύτερη ενεργότητα ύδατος οδηγεί σε ταχύτερη θανάτωση του *Bacillus*. Εξάιρεση αποτελεί η περίπτωση του είδους *B. cereus* και συγκεκριμένα των στελεχών ATCC 4342 και ATCC 9818 σε θρεπτικό υλικό χλωριούχου λιθίου (LiCl), για τα οποία παρατηρείται αρνητική επίδραση της ενεργότητας ύδατος στην ταχύτητα θανάτωσης του

μικροοργανισμού. Στα μοντέλα που παρατηρήθηκε θετικό πρόσημο της μεταβλητής  $a_w$  ήταν της μορφής:

$$\ln D = a - b_1 * T + b_2 * a_w + b_3 * T * pH - b_4 * pH * a_w$$

ή της μορφής:

$$\ln D = a - b_1 * T + b_2 * a_w + b_3 * T * pH - b_4 * T * pH * a_w.$$

Το παραπάνω μπορεί να ερμηνευτεί ως εξής: Είναι πιθανό η αρνητική επίδραση του  $a_w$  στην αδρανοποίηση του *Bacillus*, να σχετίζεται με την ταυτόχρονη αρνητική αλληλεπίδραση της θερμοκρασίας με το pH και τη θετική αλληλεπίδραση του pH με το  $a_w$  ή και των τριών παραγόντων μαζί της θερμοκρασίας, του pH και του  $a_w$ .

Από την παρατήρηση των αποτελεσμάτων που εξάχθηκαν από τη στατιστική ανάλυση, προκύπτει ότι στις περισσότερες περιπτώσεις υποστρωμάτων, όταν η ανάλυση διενεργείται για το σύνολο των εγγραφών χωρίς διαφοροποίηση σε είδος ή στέλεχος, οι συναρτήσεις δεν περιγράφουν αποτελεσματικά τα δεδομένα.

Όταν όμως το dataset συγκεκριμενοποιείται σε συγκεκριμένα είδη ή και στελέχη, εμφανίζεται μεγάλη βελτίωση στην περιγραφή των δεδομένων αδρανοποίησης (inactivation data) από τα μοντέλα. Αυτό φαίνεται κι από τον μεγαλύτερο  $R^2$  που πλησιάζει περισσότερο την τιμή 1. Επίσης, στις περιπτώσεις της εξειδικευμένης ανάλυσης σε είδη και στελέχη, προκύπτουν μοντέλα με περισσότερες παραμέτρους (3-parameter models) και αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο ή τριών περιβαλλοντικών παραγόντων που περιγράφουν με μεγαλύτερη ακρίβεια τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση (Farakos et al., 2011).

Οι διαφορές αυτές ανάμεσα στα μοντέλα φαίνονται πολύ καθαρά στον Πίνακας 3.3. Για τα γαλακτοκομικά το γενικό μοντέλο χαρακτηρίζεται από  $R_{adj}^2 = 0.600$  ενώ όταν η ανάλυση ειδικεύεται σε είδη, η τιμή του  $R_{adj}^2$  αυξάνεται κατά πολύ και γίνεται συγκεκριμένα για το *B.subtilis*  $R_{adj}^2 = 0.992$ , για *B.cereus* 0.890, *B.stearothermophilus* 0.870 και λιγότερο για το

*B.licheniformis* 0,725. Για την τομάτα παρατηρείται ότι από τον  $Radj^2=0,455$  του γενικού μοντέλου υπάρχει μία μικρή αύξηση σε  $Radj^2=0,630$  για το μοντέλο του *B.coagulans* αλλά όταν η ανάλυση ειδικεύεται στα στελέχη του *B.coagulans* ο  $Radj^2$  αυξάνεται πολύ περισσότερο και συγκεκριμένα γίνεται για το Spanish Type culture:  $Radj^2=0,998$  και για ATCC 8038: 0,954. Επίσης αυξάνεται και για το είδος *B.licheniformis*  $Radj^2=0,987$ . Για το σπαράγγι, για το γενικό μοντέλο ο  $Radj^2$  είναι πολύ χαμηλός 0,480, ενώ όταν η ανάλυση ειδικεύεται για το είδος *B.coagulans* ο  $Radj^2=0,994$  και για το είδος *B.licheniformis* 0,984 αντίστοιχα. Παρομοίως για το phosphate buffer ο  $Radj^2$  του γενικού μοντέλου είναι 0,590 ενώ ειδικά για το *B.cereus* ανεβαίνει στην τιμή 0,986. Στο *Mclvaine buffer* παρατηρείται το εξής: ενώ το γενικό μοντέλο παρουσιάζει  $Radj^2=0,670$ , για το είδος *B.cereus* ο συντελεστής προσδιορισμού μειώνεται κι άλλο  $Radj^2=0,440$  που σημαίνει ότι όταν η ανάλυση ειδικεύεται στο συγκεκριμένο είδος δεν επιφέρει καμία βελτίωση στην περιγραφή των inactivation data. Αντιθέτως, όταν μελετάται το είδος *B.stearothermophilus* το μοντέλο που προκύπτει περιγράφει πολύ αποτελεσματικά τα δεδομένα:  $Radj^2=0,952$ . Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και στην περίπτωση του διαλύματος LiCl όπου για το σύνολο των δεδομένων ο συντελεστής προσδιορισμού για τη συνάρτηση είναι  $Radj^2=0,764$  ενώ για το είδος *B.cereus* ξεχωριστά παρατηρείται χαμηλότερη ακρίβεια στην περιγραφή των δεδομένων:  $Radj^2=0,531$  αλλά όταν η ανάλυση γίνεται για τα μεμονωμένα στελέχη του τα μοντέλα περιγράφουν πολύ αποτελεσματικά τα δεδομένα: ATCC 7004:  $Radj^2=0,976$ , ATCC 4342:  $Radj^2=0,988$  και ATCC:9818  $Radj^2=0,996$ . Για το διάλυμα γλυκερόλης το γενικό μοντέλο δεν περιγράφει ικανοποιητικά τα δεδομένα με  $Radj^2=0,493$  ενώ το μοντέλο για το είδος *B.cereus* και πιο συγκεκριμένα για το στέλεχος ATCC 9818 παρουσιάζει  $Radj^2=0,981$ . Αντίστοιχα για το διάλυμα NaCl ο  $Radj^2$  του γενικού μοντέλου είναι 0,506, ενώ για τα είδος *B.cereus* και συγκεκριμένα για τα στελέχη ATCC 7004:  $Radj^2=0,989$ , ATCC 4342:  $Radj^2=0,960$  και ATCC 9818  $Radj^2=0,994$ . Για το FNA ως θρεπτικό υλικό για το σύνολο των δεδομένων  $Radj^2=0,566$  ενώ για τα στελέχη του *B.cereus* INRA AVZ 421:  $Radj^2=0,994$  και INRA AVTZ 415:  $Radj^2=1$ .

Από την άλλη, σε κάποιες περιπτώσεις υποστρωμάτων παρατηρήθηκε ότι η εξειδίκευση της ανάλυσης δεν προσθέτει καθόλου στην περιγραφή των δεδομένων αδρανοποίησης όπως για το TSB όπου για το γενικό μοντέλο είναι  $Radj^2=0,772$  και για το είδος *B.cereus* και συγκεκριμένα για το στέλεχος ADQP 407 έχει ακόμη χαμηλότερη τιμή: 0,690. Επιπλέον για τα buffers συνολικά παρατηρήθηκαν πολύ μικρές διαφορές ανάμεσα στην ανάλυση για το σύνολο των εγγραφών και την πιο εξειδικευμένη ανάλυση για είδη και στελέχη.

Συμπεραίνεται ότι όταν η ανάλυση γίνεται για συγκεκριμένα είδη ή στελέχη του *Bacillus* που καλλιεργήθηκαν σε ένα συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό, στις περισσότερες περιπτώσεις η συνάρτηση που προκύπτει περιγράφει με αποτελεσματικό τρόπο τα δεδομένα. Αυτό υποδεικνύει ότι ένα μέρος της μεταβλητότητας που παρουσιάζεται οφείλεται στη διαφορετική συμπεριφορά που παρουσιάζουν μεταξύ τους τα είδη αλλά ακόμη και τα στελέχη ως προς τους διαφορετικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες που επιδρούν στην αδρανοποίησή τους. Επίσης, ένας άλλος λόγος ενδέχεται να είναι το γεγονός ότι κατά τη στατιστική ανάλυση για ένα συγκεκριμένο είδος ή στέλεχος, τα δεδομένα μπορεί να προέρχονται σε πλειοψηφία από τις ίδιες μελέτες και αυτό να εξηγεί τη μείωση της διασποράς. Γενικά στη meta-analysis, ένα μέρος της παρατηρούμενης διασποράς οφείλεται στη μη ελεγχόμενη μεταβλητότητα μεταξύ των μελετών καθώς καθεμία παρέχει διαφορετικές πληροφορίες για κινητική, είδη, στελέχη, περιβαλλοντικούς και άλλους παράγοντες οι οποίοι προέκυψαν κάτω από διαφορετικές πειραματικές συνθήκες (Jaloustre et al., 2009).

#### 4.3 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Είναι εμφανές ότι η θερμοκρασία είναι βασικός παράγοντας που επιδρά στη διαδικασία αδρανοποίησης του γένους *Bacillus* για το σύνολο των ειδών και στελεχών που μελετήθηκαν. Επίσης, γενικά για τον *Bacillus* φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο το pH και η πίεση και δευτερευόντως η ενεργότητα ύδατος και το  $a_w$ , γεγονός όμως που μπορεί να οφείλεται και στη συμμετοχή πολλών ειδών στη γενική ανάλυση για τα οποία υπήρξε έλλειψη ποσοτικών δεδομένων. Όταν η ανάλυση εξειδικεύεται σε συγκεκριμένα είδη και στελέχη, η P δεν συμμετέχει στις συναρτήσεις και όταν κάθε είδος και στέλεχος μελετάται ξεχωριστά, οι παράγοντες που επιδρούν σημαντικά είναι η θερμοκρασία και ακολούθως το pH και τελευταία η ενεργότητα ύδατος ( $a_w$ ). Επίσης οι συναρτήσεις που προκύπτουν, περιγράφουν με αποτελεσματικότητα τα δεδομένα οδηγώντας στο συμπέρασμα, ότι ένα μέρος της μεταβλητότητας που εμφανίζεται μπορεί να οφείλεται στις διαφορές στην ανθεκτικότητα που επιδεικνύουν διαφορετικά είδη και κυρίως διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους, στις μεθόδους επεξεργασίας που χρησιμοποιούνται για την αδρανοποίησή τους. Επιπλέον, περιλαμβάνουν πολλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των

μεταβλητών που δείχνει ότι είναι σημαντική η αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών περιβαλλοντικών παραγόντων στην τελική συμβολή στην ταχύτητα θανάτωσης.

Όταν η ανάλυση εξειδικεύτηκε στα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των ειδών *Bacillus*, οι συναρτήσεις που προέκυψαν, περιγράφουν ακόμη πιο αποτελεσματικά τα δεδομένα υποδηλώνοντας ότι ένα μέρος της αρχικής διασποράς μπορεί να οφείλεται και στα διαφορετικά θρεπτικά υλικά στα οποία αναπτύσσεται κάθε είδος ή στέλεχος. Στην περίπτωση των υποστρωμάτων εμφανίζεται ξανά η θερμοκρασία ως κυρίαρχος παράγοντας και ακολούθως το pH και το aw.

Από την παρατήρηση των διαφορετικών ειδών προκύπτει ότι ο *Bacillus cereus* είναι το πιο σημαντικό είδος για την εξαγωγή συμπερασμάτων ως προς το οργανισμό και παρατηρείται ότι οι συναρτήσεις που περιγράφουν τη συμπεριφορά του περιλαμβάνουν πολλούς συνδυασμούς αλληλεπιδράσεων μεταξύ των τριών περιβαλλοντικών παραγόντων (T,pH,aw), γεγονός που δείχνει ότι μπορεί να πρέπει να δοθεί μεγαλύτερο βάρος στο πως οι τεχνικές στην ασφάλεια των τροφίμων θα στοχεύουν τη συνδυασμένη προσαρμογή των περιβαλλοντικών παραγόντων για καλύτερο αποτέλεσμα.

Επίσης, σε κάποιες περιπτώσεις ειδών και στελεχών, όπως το *B.licheniformis*, τα δεδομένα ήταν λίγα οπότε είναι επισφαλές να προκύψουν γενικά συμπεράσματα. Αυτό συμβαίνει και για κάποια στελέχη ειδών που οι εγγραφές τους ήταν περιορισμένες και σε κάποιες περιπτώσεις προέρχονταν από την ίδια μελέτη. Επιπλέον δεν μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας. Σε γενικές γραμμές, φαίνεται να έχει σημασία για την αντιμετώπιση του *Bacillus spp.* η εξειδίκευση σε συγκεκριμένα στελέχη και κυρίως του *B.cereus*. Επίσης τα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, καθώς και η αλληλεπίδραση της θερμοκρασίας του pH και του aw με κυρίαρχο το ρόλο της θερμοκρασίας, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αδρανοποίηση του μικροοργανισμού.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. **Ababouch L.H, L. Gritmit, R. Eddafry and F.F. Busta. 1995.** Thermal inactivation kinetics of *Bacillus Subtilis* spores suspended in buffer and in oils. Journal of applied microbiology. **78**: 669-676.
2. **Aguirre Juan S., Juan A. Ordóñez and Gonzalo D. García de Fernando. 2012.** A comparison of the effects of E-beam irradiation and heat treatment on the variability of *Bacillus cereus* inactivation and lag phase duration of surviving cells. International Journal of Food Microbiology. **153**: 444–452.
3. **Ahn J., V.M. Balasubramaniam and A.E. Yousef. 2007.** Inactivation kinetics of selected aerobic and anaerobic bacterial spores by pressure-assisted thermal processing. International Journal of Food Microbiology. **113**: 321–329.
4. **Albert I. and P. Mafart. 2005.** A modified Weibull model for bacterial inactivation. International Journal of Food Microbiology. **100**: 197– 211
5. **Ananta Edwin, Volker Heinz, Oliver Schluter and Dietrich Knorr. 2001.** Kinetic studies on high-pressure inactivation of *Bacillus stearothersophilus* spores suspended in food matrices. Innovative Food Science & Emerging Technologies. **2**: 261-272.
6. **Barbeau Benoit, Debra Huffman, Chandra Mysore, Raymond Desjardins, Bernard Clement and Michele Prevost. 2005.** Examination of discrete and confounding effects of water quality parameters during the inactivation of MS2 phages and *Bacillus subtilis* spores with chlorine dioxide. J. Environ. Eng. Sci. **4**: 139–151.
7. **Baril Eugénie, Louis Coroller, Olivier Couvert, Ivan Leguérinel, Florence Postollec, Christophe Boulais, Frédéric Carlin and Pierre Mafart. 2012.** Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. Food Microbiology. **30**: 29-36
8. **Berendsen Erwin M., Marcel H. Zwietering, Oscar P. Kuipers and Marjon H.J. Wells-Bennik. 2014.** Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. Food Microbiology xxx: 1-8.
9. **Briggs A. 1966.** The Resistances of Spores of the Genus *Bacillus* to Phenol, Heat and Radiation. J. appl. Bact. **29**: 490-504.
10. **Brown K.L. 1994.** Spore resistance and ultra heat treatment processes. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement. **76**:67S-80S.
11. **Byrne B., G. Dunne and D.J. Bolton. 2006.** Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. Food Microbiology **23**: 803–808.

12. **Cho Hyung-Yong, Ahmed E. Yousef and Sudhir K. Sastry. 1999.** Kinetics of Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores by Continuous or Intermittent Ohmic and Conventional Heating. Department of Food Science and Technology and Department of Food, Agricultural and Biological Engineering, The Ohio State University.
13. **Condon S., A. Palop, J. Raso and F.J. Sala. 1996.** Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. Letters in Applied Microbiology. **22**: 149-152.
14. **Condon S., M. Bayarte and F.J. Sala. 1992.** Influence of the sporulation temperature upon the heat resistance of *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology. **73**:251-256
15. **Cook A.M. and R.J. Gilbert. 1968.** Factors affecting the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. I. The effect of recovery conditions on colony count of unheated and heated spores. Fd Technol. **3**: 285-293.
16. **Corradini Maria G., Mark D. Normand and Micha Peleg. 2005.** Calculating the efficacy of heat sterilization processes. Journal of Food Engineering. **67**: 59–69.
17. **Daryaei Hossein and V.M. Balasubramaniam. 2013.** Kinetics of *Bacillus coagulans* spore inactivation in tomato juice by combined pressure-heat treatment. Food Control. **30**: 68-175
18. **Davies F.L., H.M. Underwood, A.G. Perkin and H. Burton. 1977.** Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures  
I. Laboratory determination of temperature coefficients. J. Fd Technol. **12**: 115-129.
19. **Delgado Begona, Pablo S. Fernandez, Alfredo Palop and Paula M. Periago.2004.** Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions. Food Microbiology. **21**:327–334.
20. **Dogan Zeynep, Konrad Weidendorfer, Mareile Müller-Merbach, Fritz Lembke and Jorg Hinrichs. 2009.** Inactivation kinetics of *Bacillus* spores in batch- and continuous-heating systems. LWT - Food Science and Technology. **42**: 81–86
21. **Esnoz A., P.M. Periago, R. Conesa and A. Palop. 2006.** Application of artificial neural networks to describe the combined effect of pH and NaCl on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus*. International Journal of Food Microbiology. **106**: 153 – 158.
22. **Esteban María-Dolores, Juan-Pablo Huertas, Pablo S. Fernández and Alfredo Palop. 2013.** Effect of the medium characteristics and the heating and cooling rates on the nonisothermal heat resistance of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores. Food Microbiology. **34**: 58-163.
23. **Evelyn and Filipa V.M. Silva. 2015.** Thermosonication versus thermal processing of skim milk and beef slurry: Modeling the inactivation kinetics of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores. Food Research International **67**: 67–74.
24. **Fernandez P.S., M.J. Ocio, F. Rodrigo, M. Rodrigo and A. Martinez. 1996.** Mathematical model for the combined effect of temperature and pH on the thermal

resistance of *Bacillus stearothermophilus* and *Clostridium sporogenes* spores. International Journal of Food Microbiology. **32**: 225-233.

25. **Fernandez A., C. Salmeron, P.S. Fernandez and A. Martinez. 1999.** Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. Trends in Food Science & Technology. **10**: 158-162.

26. **Fernandez A., M.J. Ocio, P.S. Fernandez and A. Martinez. 2001.** Effect of heat activation and inactivation conditions on germination and thermal resistance parameters of *Bacillus cereus* spores. International Journal of Food Microbiology. **63**: 257–264.

27. **Fernandez A, J. Collado, L.M. Cunha, M.J. Ocio and A. Martinez. 2002.** Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. International Journal of Food Microbiology. **77**: 147– 153.

28. **Gonzalez I., M. Lopez, S. Martinez, A. Bernardo and J. Gonzalez. 1999.** Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different Temperatures. International Journal of Food Microbiology. **51**: 81–84.

29. **Gurney Tessa R., and L.B. Quesnel. 1980.** Thermal Activation and Dry-heat Inactivation of Spores of *Bacillus subtilis* MD2 and *Bacillus subtilis var.niger*. Journal of Applied Bacteriology. **48**: 231-247.

30. **Heinz Volker and Dietrich Knorr. 1996.** High Pressure Inactivation Kinetics of *Bacillus subtilis* Cells by a Three-State-Model Considering Distributed Resistance Mechanisms. Food Biotechnology. **10(2)**: 149-161.

31. **Hong Yun-Hee, Ji-Yong Park, Jong-Hyun Park, Myong-Soo Chung, Ki-Sung Kwon, Kyungsook Chung, Misun Won and Kyung-Bin Song.2008.** Inactivation of *Enterobacter sakazakii*, *Bacillus cereus*, and *Salmonella typhimurium* in powdered weaning food by electron-beam irradiation. Radiation Physics and Chemistry. **77**: 1097– 1100.

32. **Harnulv. B. G. And B.G. Snygg. 1972.** Heat Resistance of *Bacillus subtilis* Spores at Various Water Activities. J. appl. Bact. **35**: 615-624.

33. **Huemer Ingrid A., Nicolette Klijn, Henri W. J. Vogelsang and Leo P. M. Langeveld. 1998.** Thermal Death Kinetics of Spores of *Bacillus sporothermodurans* Isolated from UHT Milk. Int. Dairy Journal. **8**: 851-855.

34. **Ishizaki Kozo, Shinriki Nariko and Matsuyama Hidetoshi. 1986.** Inactivation of *Bacillus* spores by gaseous ozone. Journal of Applied Bacteriology. **60**: 67-72.

35. **Jaloustre S., L. Guillier, E. Morelli, V. Noël and M.L. Delignette-Muller.2012.** Modeling of *Clostridium perfringens* vegetative cell inactivation in beef-in-sauce products: A meta-analysis using mixed linear models. International Journal of Food Microbiology. **154**: 44–51.



36. **Jonsson U., B.G. Snygg and B.G. Harnulv. 1977.** Testing two models for the temperature dependence of the heat inactivation rate of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Journal of Food Science*. Vol. 42, No. 5.
37. **Larson Matthew A. and Benito J. Marinas. 2003.** Inactivation of *Bacillus subtilis* spores with ozone and Monochloramine. *Water Research*. **37**: 833–844.
38. **Lee Sung-Hwan, Smithi Pumprueg, Brij Moudgil and Wolfgang Sigmund. 2005.** Inactivation of bacterial endospores by photocatalytic nanocomposites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **40**: 93–98.
39. **Lim Jin-Pyo and Han S. Uhm. 2007.** Influence of oxygen in atmospheric-pressure argon plasma jet on sterilization of *Bacillus atrophaeus* spores. *Physics of plasmas*. **14**. DOI: 10.1063/1.2773705.
40. **Lopez M., I. Gonzalez, S. Condon and A. Bernardo. 1996.** Effect of pH heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *International Journal of Food Microbiology*. **28**: 405-410.
41. **Mallidis C.G. and D. Drizou. 1991.** Effect of simultaneous application of heat and pressure on the survival of bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriology*. **71**:285-288.
42. **Mathys Alexander, Volker Heinz, Friedel Herbert Schwartz and Dietrich Knorr. 2007.** Impact of agglomeration on the quantitative assessment of *Bacillus stearothermophilus* heat inactivation. *Journal of Food Engineering*. **81**: 380–387.
43. **Mazas Margarita, Sidonia Martinez, Mercedes Lopez, Ana Bernardo Alvarez and Roberto Martin. 1999.** Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores affected by the solutes used to control water activity of the heating medium. *International Journal of Food Microbiology*. **53**: 61–67.
44. **Mazas Margarita, Isaac Gonzalez, Mercedes Lopez, Josefa Gonzalez and Roberto Martin Sarmiento. 1995.** Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Science and Technology*. **30**: 71-78.
45. **McQuestin Olivia J., Craig T. Shadbolt and Tom Ross. 2009.** Quantification of the Relative Effects of Temperature, pH, and Water Activity on Inactivation of *Escherichia coli* in Fermented Meat by Meta-Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 75, No. 22 p. 6963–6972.
46. **Molin G. and K. Ostlund. 1976.** Dry-heat inactivation of *Bacillus subtilis* var. *niger* spores with special reference to spore density. *Can. J. Microbiol.* Vol. 22.
47. **Palop A., J. Raso, R. Pagan, S. Condon and F.J. Sala. 1996.** Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenised foods. *International Journal of Food Microbiology*. **29**: 1-10.

48. **Palop Alfredo, Glenn C. Rutherford and Robert E. Marquis. 1998.** Inactivation of enzymes within spores of *Bacillus megaterium* ATCC 19213 by Hydroperoxides. *Can. J. Microbiol.* **44**: 465-470.
49. **Palop Alfredo, Javier Raso, Rafael Pagan, Santiago Condon and Francisco J. Sala. 1999.** Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *International Journal of Food Microbiology.* **46**: 243–249.
50. **Park Sung Hee, V.M. Balasubramaniam, Sudhir K. Sastry and Jiyoun Lee. 2013.** Pressure–ohmic–thermal sterilization: A feasible approach for the inactivation of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Geobacillus stearothermophilus* spores. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* **19**: 115–123.
51. **Periago P.M., A. van Zuijlen, P.S. Fernandez, P.M. Klapwijk, P.F. ter Steeg, M.G. Corradini and M. Peleg. 2004.** Estimation of the non-isothermal inactivation patterns of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores in soups from their isothermal survival data. *International Journal of Food Microbiology* **95**: 205– 218.
52. **Rajan S., S. Pandrangi, V.M. Balasubramaniam and A.E. Yousef. 2006.** Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores in egg patties by pressure-assisted thermal processing. *LWT* **39**: 844–851.
53. **Reineke Kai, Alexander Mathys and Dietrich Knorr. 2011.** The Impact of High Pressure and Temperature on Bacterial Spores: Inactivation Mechanisms of *Bacillus subtilis* above 500 Mpa. *Journal of Food Science.* Vol. 76, Nr. 3.
54. **Reineke Kai, Isabel Doehner, Karl Schlumbach, Daniel Baier, Alexander Mathys and Dietrich Knorr. 2012.** The different pathways of spore germination and inactivation in dependence of pressure and temperature. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* **13**: 31–41.
55. **Santillana Farakos Sofia M. and Marcel H. Zwietering. 2011.** Data Analysis of the Inactivation of Foodborne Microorganisms under High Hydrostatic Pressure To Establish Global Kinetic Parameters and Influencing Factors. *Journal of Food Protection,* Vol. 74, No. 12. Pages 2097–2106.
56. **Sarrias J. A., M. Valero and M.C. Salmeron. 2002.** Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. *Food Microbiology.* **19**: 589-595.
57. **Siemer Claudia, Stefan Toepfl and Volker Heinz. 2014.** Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by pulsed electric fields (PEF) in combination with thermal energy - I. Influence of process- and product parameters. *Food Control* **39**: 163-171.
58. **Smelt J. P. P. M. and S. Brul. 2014.** Thermal inactivation of microorganisms. Department of Molecular Microbial Physiology and Food Safety University of Amsterdam. Science Park 904, Amsterdam, The Netherlands.
59. **Somavat Romel, Mohamed Hussein M.H. and Sudhir K. Sastry. 2013.** Inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spores under ohmic and conventional heating. *LWT - Food Science and Technology* **54**: 194-198.

60. **Spilimbergo S., N. Elvassore and A. Bertucco. 2002.** Microbial inactivation by high-pressure. *Journal of Supercritical Fluids*. **22**: 55–63.
61. **Spilimbergo Sara, Fariba Dehghani, Alberto Bertucco and Neil R. Foster. 2003.** Inactivation of Bacteria and Spores by Pulse Electric Field and High Pressure CO<sub>2</sub> at Low Temperature. University of Padova, Department of Chemical Engineering, via Marzolo 9 Padova, Italy. School of Chemical Engineering and Industrial Chemistry, The University of New South Wales, Sydney, Australia, 2052 DOI: 10.1002/bit.10554.
62. **Spilimbergo S., A. Bertucco, F.M. Lauro and G. Bertoloni. 2003.** Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO<sub>2</sub> treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **4**: 161–165.
63. **Spilimbergo S. and A. Bertucco. 2003.** Non-Thermal Bacteria Inactivation With Dense CO<sub>2</sub>. University of Padova, Department of Chemical Engineering, via Marzolo 9 Padova, Italy. DOI: 10.1002/bit.10783
64. **Stewart Cynthia M., C. Patrick Dunne, Anthony Sikes and Dallas G. Hoover. 2000.** Sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* and *Clostridium sporogenes* PA 3679 to combinations of high hydrostatic pressure and other processing parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. **1**: 49-56.
65. **Tola Yetenayet Bekele and Hosahalli S. Ramaswamy. 2014.** Combined effects of high pressure, moderate heat and pH on the inactivation kinetics of *Bacillus licheniformis* spores in carrot juice. *Food Research International*. **62**: 50–58.
66. **Torres J. Antonio and Gonzalo Velazquez. 2005.** Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering* **67**: 95–112.
67. **Van Asselt Esther D., and Marcel H. Zwietering. 2006.** A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. **107**: 73 – 82.
68. **Van Gerwen Suzanne J.C., Frank M. Rombouts, Klaas van't Riet and Marcel H. Zwietering. 1999.** A Data Analysis of the Irradiation Parameter D<sub>10</sub> for Bacteria and pores under Various Conditions. *J. Food Prot.*, Vol. 62, No. 9.
69. **Van Opstal Isabelle, Catherine F. Bagamboula, Suzy C.M. Vanmuysen, Elke Y. Wuytack and Chris W. Michiels. 2004.** Inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk by mild pressure and heat treatments. *International Journal of Food Microbiology* **92**: 227– 234.
70. **Waje C.K., S.Y. Jun, Y.K. Lee, B.N. Kim, D.H. Han, C. Jo and J.H. Kwon. 2009.** Microbial quality assessment and pathogen inactivation by electron beam and gamma irradiation of commercial seed sprouts. *Food Control* **20**: 200–204.
71. **Wescott G.G., T.M.Fairchild and P.M. Foegeding. 1995.** *Bacillus cereus* and *Bacillus stearothermophilus* Spore Inactivation in Batch and Continuous Flow Systems. *Journal of Food Science*. Volume 60, No. 3.

72. Zhang Jian, Sarah Burrows, Courtney Gleason, Michael A. Matthews, Michael J. Drews, Martine LaBerge and Yuehwei H. An. 2006. Sterilizing *Bacillus pumilus* spores using supercritical carbon dioxide. *Journal of Microbiological Methods*. **66**: 479–485.