



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ & ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της μεταβολής της μικροχλωρίδας και της επιβίωσης του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella Typhimurium* σε κιμά από όρνιθες κρεοπαραγωγής στις οποίες είχε χορηγηθεί σιτηρέσιο με φυτικά βιοενεργά συστατικά

Βασιλική Μ. Κουμπή

Επιβλέπων καθηγητής:

Ευστάθιος Πανάγου, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2024

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της μεταβολής της μικροχλωρίδας και της επιβίωσης του παθογόνου
βακτηρίου *Salmonella Typhimurium* σε κιμά από όρνιθες κρεοπαραγωγής
στις οποίες είχε χορηγηθεί σιτηρέσιο με φυτικά βιοενεργά συστατικά

Βασιλική Μ. Κουμπή

Εξεταστική Επιτροπή:

Ευστάθιος Ζ. Πανάγου, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Κωνσταντίνος Μουντζούρης, Καθηγητής ΓΠΑ

Νικόλαος Χωριανόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Μελέτη της μεταβολής της μικροχλωρίδας και της επιβίωσης του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella Typhimurium* σε κιμά από όρνιθες κρεοπαραγωγής, στις οποίες είχε χορηγηθεί σιτηρέσιο με φυτικά βιοενεργά συστατικά

ΠΜΣ Συστήματα Διαχείρισης Ασφάλειας & Ποιότητας Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση της μεταβολής της μικροχλωρίδας και της επιβίωσης του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella Typhimurium* B-62 σε κιμά κοτόπουλου, που προήλθε από ορνίθια κρεοπαραγωγής τα οποία πριν τη σφαγή είχαν δεχθεί διατροφική παρέμβαση με σιτηρέσιο πλούσιο σε φυτικά βιοενεργά συστατικά.

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα κιμά κοτόπουλου από όρνιθες κρεοπαραγωγής που είχαν υποβληθεί σε διατροφική δίαιτα με την προσθήκη διαφορετικής συγκέντρωσης φυτοβιοτικών (0, 1000 και 2000 mg/Kg τροφής). Πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις για την καταμέτρηση της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (PCA) και έλεγχος για την παρουσία του βακτηρίου *Salmonella* spp. σύμφωνα με την οδηγία ISO 6579-1:2017. Καταγράφηκαν οι τιμές του pH κατά τη διάρκεια του πειράματος και παράλληλα ελήφθησαν φάσματα FTIR τα οποία συσχετίστηκαν περαιτέρω με την παρουσία ή μη του μίγματος φυτοβιοτικού στον κιμά κοτόπουλου, μέσω αλγορίθμων μηχανικής μάθησης. Οι μέθοδοι ανάλυσης των φασμάτων περιλάμβαναν την Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) και την Ανάλυση OrthoPLS-DA, που αποτελεί πολυπαραγοντικό τύπο ανάλυσης με επίβλεψη, με σκοπό τη διαφοροποίηση των δειγμάτων κιμά ανάλογα με την παρουσία ή μη του μίγματος φυτοβιοτικού. Ακολούθησε δεύτερη σειρά πειραμάτων που περιλάμβανε εμβολιασμό των δειγμάτων με το στέλεχος *Salmonella Typhimurium* B-62 και συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία 4°C. Πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις για την καταμέτρηση της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (PCA) και του πληθυσμού του βακτηρίου *Salmonella Typhimurium* B-62 και παράλληλα καταγραφή των τιμών του pH. Τα πειράματα διήρκεσαν 10 ημέρες και οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στα χρονικά σημεία 0, 24, 72, 120, 168 και 240 h.

Τα αποτελέσματα του pH έδειξαν μεταβολή της τιμής του μεταξύ του 5,7-6,3 πριν την επιμόλυνση και 5,7-6,1 μετά την επιμόλυνση με το παθογόνο βακτήριο, κατά τη διάρκεια συντήρησης σε θερμοκρασία 4°C. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην τιμή του pH με την παρουσία μίγματος φυτοβιοτικού στο σιτηρέσιο σε σχέση με το μάρτυρα. Παράλληλα, τα αποτελέσματα της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας έδειξαν ότι σε κάθε χρονικό σημείο της

συντήρησης, ο πληθυσμός της OMX ήταν μικρότερος συγκριτικά με τον αντίστοιχο πληθυσμό στα δείγματα κιμά κοτόπουλου που δεν είχαν επιμολυνθεί με το παθογόνο βακτήριο, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί σε φαινόμενα ανταγωνισμού μεταξύ της OMX και του παθογόνου βακτηρίου, που συνέβαλαν στη διατήρηση χαμηλότερου πληθυσμού της OMX. Τα διαγράμματα έδειξαν ότι η Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών δεν είχε ικανοποιητική επίδραση στο διαχωρισμό των δειγμάτων μεταξύ μάρτυρα (απουσία μίγματος φυτοβιοτικού) και προσθήκης μίγματος φυτοβιοτικού στο σιτηρέσιο, καθώς παρατηρήθηκε αλληλοεπικάλυψη των δύο ομάδων σε επίπεδο απεικόνισης των δύο πρώτων Κυρίων Συνιστωσών. Ωστόσο, η ανάλυση με τη μέθοδο PLSDA έδειξε ικανοποιητικό διαχωρισμό των δύο κατηγοριών δειγμάτων, δείχνοντας πως η προσθήκη του μίγματος φυτοβιοτικού στο σιτηρέσιο της όρνιθας θα μπορούσε να επηρεάσει το κρέας και πως αυτή η επίδραση του μίγματος φυτοβιοτικού μπορεί να γίνει αντιληπτή μέσω της φασματοσκοπίας FTIR.

Επιστημονική περιοχή: Εμβολιασμός με τη χρήση παθογόνου βακτηρίου

Λέξεις κλειδιά: παθογόνα βακτήρια, φυτικά βιοενεργά συστατικά, φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Study of the microflora variation and survival of the pathogenic bacterium *Salmonella* Typhimurium in minced meat from broiler hens fed a ration containing plant bioactive ingredients

*M.Sc. Food Safety & Quality Management Systems
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Microbiology & Biotechnology*

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the changes in total viable counts and the survival of the pathogenic bacterium *Salmonella* Typhimurium B-62 in minced chicken meat, which before slaughter had received dietary intervention with a ration rich in plant bioactive compounds and was preserved under aerobic conditions at 4° C.

For this purpose, samples of minced chicken meat from boilers chickens subjected to a diet with addition of difference concentrations of phytobiotics (0, 1000, 2000 mg/Kg feed) were used. Microbiological analyses were performed to estimate the microbial load of the samples in terms of total viable counts (TVC) and detect the presence/absence of *Salmonella* spp. according to ISO 6579-1:2017. In addition, the pH of the minced chicken meat was recorded at 0, 24, 72, 120, 168, and 240 h. In parallel, FTIR spectra were obtained and further correlated with the presence or absence of the phytobiotic in minced chicken meat by machine learning algorithms including analysis methods such as Principal Component Analysis (PCA) and Ortho-PLS DA analysis which is multivariate supervised type of analysis. Further on, a second set of experiments was undertaken where the samples were inoculated with *Salmonella* Typhimurium B-62 and microbiological analyses were carried out to determine the population of total viable counts (TVC) and the population of *Salmonella* Typhimurium B-62. In addition, the pH values of the minced chicken meat were recorded during the experiment at the same time intervals as above.

The pH results showed a variation between 5.7-6.3 before contamination and 5.7-6.1 after contamination with the pathogenic bacterium during preservation at 4° C. However, no difference in pH value was observed with the presence or absence of a phytobiotic in the ration. At the same time, the Total Viable Counts results showed that at each time point of preservation, the population of TVC was lower compared to the corresponding population in minced chicken meat samples that were not contaminated with the pathogenic bacterium, which could be attributed to competition phenomenon between TVC and the pathogenic bacterium, which contributed to the maintenance of a lower population of TVC.

The results of the Principal Components Analysis (PCA) did not reveal any separation between the minced chicken meat samples without phytobiotic (control) and addition of phytobiotic to

the ration, as there was an overlap between the two groups at the level of visualization of the first two Principal Components. However, the ortho-PLSDA analysis showed a satisfactory separation of the two sample categories, indicating that the addition of the phytobiotic to the ration of boiler chickens could affect the meat and that this effect of the phytobiotic can be detected by FTIR spectroscopy.

Scientific area: vaccination using pathogenic bacterium

Keywords: pathogenic bacteria, plant-based bioactive compounds, Fourier transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

ΔΗΛΩΣΗ ΕΡΓΟΥ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη, Βασιλική Κουμπή δηλώνω ότι το κείμενο της μελέτης αποτελεί δικό μου, μη υποβοηθούμενο πόνημα. Υποβάλλεται σε μερική εκπλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στα Συστήματα Διαχείρισης Ασφάλειας και Ποιότητας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Δεν έχει υποβληθεί ποτέ πριν για οποιοδήποτε λόγο ή για εξέταση σε οποιοδήποτε άλλο πανεπιστήμιο ή εκπαιδευτικό ίδρυμα της χώρας ή του εξωτερικού.

Βασιλική Κουμπή (2024)

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Ορνίθια κρεοπαραγωγής – Παγκόσμια παραγωγή.....	1
1.2 Διατροφική αξία	3
1.3.1 Νομοθετικό πλαίσιο.....	7
1.3.2 Διάγραμμα ροής της διαδικασίας	8
1.4 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού <i>Salmonella</i> spp.....	- 15 -
1.4.1 Μορφολογία – Βακτηριακή καλλιέργεια και διαδικασίες απομόνωσης	- 15 -
1.4.2 Απαιτήσεις μικροβιακής αύξησης	- 16 -
1.4.3 Ταξινόμηση	- 17 -
1.5 Στρατηγικές ελέγχου μόλυνσης των παθογόνων στη βιομηχανία ορνιθίων.....	- 20 -
1.5.1 Φυτοβιοτικά.....	- 21 -
1.6 Ο ρόλος των φυτικών βιοενεργών συστατικών στη διατροφή της όρνιθας.....	- 24 -
Σκοπός.....	- 27 -
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 28 -
2.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....	- 28 -
2.2 Προετοιμασία μικροβιολογικών υποστρωμάτων - Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	- 28 -
2.2 Μέθοδος ανίχνευσης του βακτηρίου <i>Salmonella</i> spp. σε τρόφιμα (ISO 6579-1:2017)...	- 29 -
2.3 Ανανέωση μητρικών καλλιεργειών	- 29 -
2.4 Εμβολιασμός κιμά με το <i>Salmonella</i> Typhimurium B-62 – Μικροβιολογικές αναλύσεις	- 30 -
2.5 Μέτρηση pH	- 30 -
2.6 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	- 30 -
2.6.2 Εφαρμογή του FTIR	- 35 -
2.7 Στατιστική ανάλυση.....	- 36 -
3.Αποτελέσματα και συζήτηση	- 37 -
3.1 Μέτρηση pH	- 37 -
3.2 Μικροβιολογική Ανάλυση	- 38 -
3.3 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων μικροβιακής ανάπτυξης	- 41 -
3.4 Ανάλυση της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier	- 42 -
3.4.1 Διαχωρισμός των δειγμάτων του μάρτυρα από τα δείγματα που δέχθηκαν διατροφική επέμβαση	- 42 -
3.4.2 Διαχωρισμός των δειγμάτων του μάρτυρα από τα δείγματα που δέχθηκαν διατροφική επέμβαση	- 48 -
4. Συμπεράσματα.....	- 51 -
Βιβλιογραφία	- 52 -

Κατάλογος Πινάκων

A/A	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
1.2.1	Θρεπτική σύσταση σε στήθος κοτόπουλου χωρίς δέρμα και κόκκαλα	3
1.2.2	Διατροφική αξία για διαφορετικούς τύπους κρέατος (ανά 100g)	4
1.2.3	Περιεκτικότητα βιταμινών και ιχνοστοιχείων σε διαφορετικούς τύπους κρέατος (ανά 100g)	5
1.2.4	Περιεκτικότητα νωπού κρέατος κοτόπουλου σε αμινοξέα και λιπαρά οξέα	6
1.3.1	Κρίσιμα σημεία ελέγχου -Παράδειγμα Σχέδιου HACCP για τη σφαγή νεαρών κοτόπουλων	9
1.3.2	Ανάλυση κινδύνου που αφορά τη σφαγή πουλερικών	12
1.4.3	Αριθμός ορότυπων για κάθε είδος και υποείδος του βακτηρίου <i>Salmonella</i>	17
1.4.4	Εμφάνιση του βακτηρίου <i>Salmonella</i> σε κύριες κατηγορίες τροφίμων, Ευρωπαϊκή Ένωση, 2020	18
1.5.1	Μηχανισμός δράσης ορισμένων φυτικών εκχυλισμάτων	23
2.6.1	Οι δονήσεις που σχετίζονται οι ζώνες του FTIR	34
3.3.1	Κινητικές παράμετροι της OMX κατά τη συντήρηση κιμά κοτόπουλου σε θερμοκρασία 4° C με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων μίγματος φυτοβιοτικού πριν και μετά από την επιμόλυνση με το βακτήριο <i>Salmonella</i> Typhimurium B-62.	42

Κατάλογος Εικόνων

A/A	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
1.5	Πηγές βακτηριακής μόλυνσης πουλερικών: (a) ζωοτροφές πουλερικών, (b) αυγά πουλερικών, (c) απορρίμματα πουλερικών, (d) υπόστεγο -εγκαταστάσεις, (e): μύγες, (f) τρωκτικά, (g) εκκολαπτήριο, (h) πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ζωοτροφών, (i) χειριστές, (j) άγρια ζώα, (k) μολυσμένα δοχεία μεταφοράς, (l) μολυσμένο πόσιμο νερό, (m): μολυσμένα οχήματα μεταφοράς ορνιθίων	21
1.5.1	Υποθετικός μηχανισμός δράσης φυσικών ενώσεων σε παθογόνα βακτήρια	23
2.6.1	Τροποποιημένη απεικόνιση από τυπικό φάσμα υπέρυθρου με μετασχηματισμού Fourier ανά περιοχή	33
2.6.2	Όργανο FTIR-6200 JASCO	35

Κατάλογος Διαγραμμάτων

A/A	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
1.1	Παγκόσμια παραγωγή κρέατος κοτόπουλου από το 2012 έως το 2023 (σε 1000 μετρικούς τόνους)	1
1.2	Ποσοστιαία Παραγωγή κρέατος κοτόπουλου	2
1.3.2	Διάγραμμα ροής της διαδικασίας (Σφαγή πουλερικών / Ολόκληρα σφάγια, τμήματα και άλλα άθικτα προϊόντα πουλερικών)	8
1.6	Βακτήρια που βρέθηκαν στα σπλάχνα των ορνιθίων κρεοπαραγωγής σε διάφορες μελέτες που συγκρίνουν το μάρτυρα (CON: CONTROL), τα φυτοβιοτικά (PHY) και τα αντιβιοτικά (ANTI).	25
3.1.1	Μεταβολή της τιμής του pH κατά τη συντήρηση κιμά κοτόπουλου σε θερμοκρασία 4°C με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων μίγματος φυτοβιοτικού (c: μάρτυρας, vb: 1000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού, vd: 2000mg / kg μίγματος φυτοβιοτικού). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.	37
3.1.2	Μεταβολή της τιμής του pH κατά τη συντήρηση κιμά κοτόπουλου σε θερμοκρασία 4°C με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων μίγματος φυτοβιοτικού μετά την επιμόλυνση με το βακτήριο <i>Salmonella Typhimurium</i> B-62 (cs: μάρτυρας, vbs: 1000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού, vds: 2000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.	38
3.2.1	Μεταβολή του πληθυσμού της OMX κατά τη συντήρηση κιμά κοτόπουλου σε θερμοκρασία 4°C με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων μίγματος φυτοβιοτικού (c: μάρτυρας, vb: 1000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού, vd: 2000 mg / kg μίγματος φυτοβιοτικού). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.	39
3.2.2	Μεταβολή του πληθυσμού της OMX κατά τη συντήρηση κιμά κοτόπουλου σε θερμοκρασία 4°C με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων μίγματος φυτοβιοτικού μετά την επιμόλυνση με το βακτήριο <i>Salmonella Typhimurium</i> B62 (cs: μάρτυρας, vbs: 1000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού, vds: 2000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.	40
3.2.3	Μεταβολή του πληθυσμού του βακτηρίου <i>Salmonella Typhimurium</i> B-62 κατά τη συντήρηση κιμά κοτόπουλου σε θερμοκρασία 4o C με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων μίγματος φυτοβιοτικού μετά την επιμόλυνση με το βακτήριο <i>Salmonella Typhimurium</i> B-62(cs: μάρτυρας, vbs: 1000mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού, vds: 2000mg /kg μίγματος φυτοβιοτικού). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.	41
3.4.1.1	Μετασχηματισμός δεδομένων με τη μέθοδο Pareto	43
3.4.1.2	Γράφημα διασποράς των δύο κύριων συνιστωσών με βάση τις τιμές των δειγμάτων για τη διάκριση των δύο ομάδων (1): Μάρτυρας , (2): VB+VD	44
3.4.1.3	Απεικόνιση της ανάλυσης Ortho-PLSDA 2D scores plot για τη διάκριση των δύο ομάδων (1) μάρτυρας (2) δείγματα διατροφικής επέμβασης VB+VD.	45

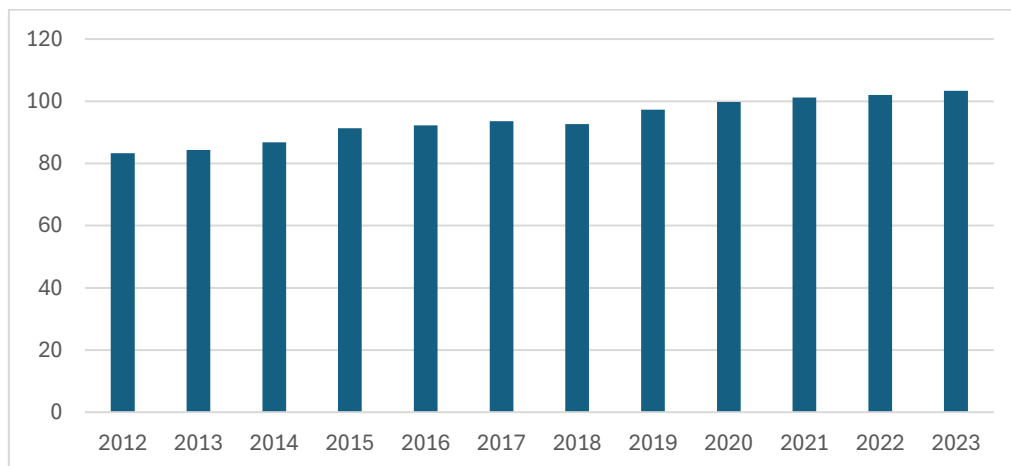
3.4.1.4	Απεικόνιση των σημαντικότερων κυματαριθμών σύμφωνα με τις τιμές των δεικτών VIP για τις ομάδες των δειγμάτων του μάρτυρα(1) και της διατροφικής επέμβασης(2)	47
3.4.2.1	Μετασχηματισμός δεδομένων με τη μέθοδο Pareto	48
3.4.2.2	Απεικόνιση της ανάλυσης PLS-DA 2D scores plot για τη διάκριση των τριών ομάδων (1) χωρίς φυτοβιοτικό (2) 1000mg/Kg φυτοβιοτικό (VB) (3) 2000mg/Kg φυτοβιοτικό VD	49
3.4.2.3	Απεικόνιση των σημαντικότερων κυματαριθμών σύμφωνα με τις τιμές των δεικτών VIP για τη διάκριση μεταξύ των τριών ομάδων (1) του μάρτυρα (2) 1000mg/Kg φυτοβιοτικό (VB) (3) 2000mg/Kg φυτοβιοτικό VD	50

1. Εισαγωγή

1.1 Ορνίθια κρεοπαραγωγής – Παγκόσμια παραγωγή

Σύμφωνα με το Food Agriculture Organization (FAO), ο τομέας των πουλερικών συνεχίζει να αναπτύσσεται και να εκβιομηχανίζεται σε πολλά μέρη του κόσμου. Ο αυξανόμενος πληθυσμός, η μεγαλύτερη αγοραστική δύναμη και η αστικοποίηση αποτέλεσαν ισχυρούς μοχλούς ανάπτυξης. Η ανάπτυξη και η μεταφορά ζωοτροφών, σφαγής και μεταποίησης έχουν αυξήσει την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα, αλλά εννοούν τις μονάδες μεγάλης κλίμακας παρά τους παραγωγούς μικρής κλίμακας. Αυτές οι εξελίξεις οδήγησαν τις βιομηχανίες πουλερικών και ζωοτροφών να κλιμακωθούν γρήγορα, να συγκεντρωθούν κοντά σε πηγές εισροών ή σε τελικές αγορές και να ενοποιηθούν κάθετα. Ένα στοιχείο της διαρθρωτικής αλλαγής ήταν η μετάβαση προς τη συμβατική εκτροφή στη φάση εκτροφής της παραγωγής ορνιθίων κρεοπαραγωγής, επιτρέποντας στους παραγωγούς με μεσαίο μέγεθος να αποκτήσουν πρόσβαση σε προηγμένη τεχνολογία με σχετικά χαμηλή αρχική επένδυση. Αναπτύσσεται ένας σαφής διαχωρισμός μεταξύ βιομηχανοποιημένων συστημάτων παραγωγής μεσαίου και μεγάλου μεγέθους που τροφοδοτούν ολοκληρωμένες αλυσίδες αξίας και εκτεταμένων συστημάτων παραγωγής που υποστηρίζουν τα προς το ζην και παρέχουν τοπικές ή εξειδικευμένες αγορές. Ο πρωταρχικός ρόλος των πρώτων είναι να προμηθεύουν οικονομικά και ασφαλή τρόφιμα σε πληθυσμούς που είναι απομακρυσμένοι από την πηγή προμήθειας, ενώ ο δεύτερος λειτουργεί ως δίκτυο ασφαλείας επιβίωσης, συχνά ως μέρος ενός ποικίλου χαρτοφυλακίου πηγών εισοδήματος. Στο Γράφημα 1.1 αναπαρίσταται η παγκόσμια παραγωγή κοτόπουλου μεταξύ των ετών 2012-2023.

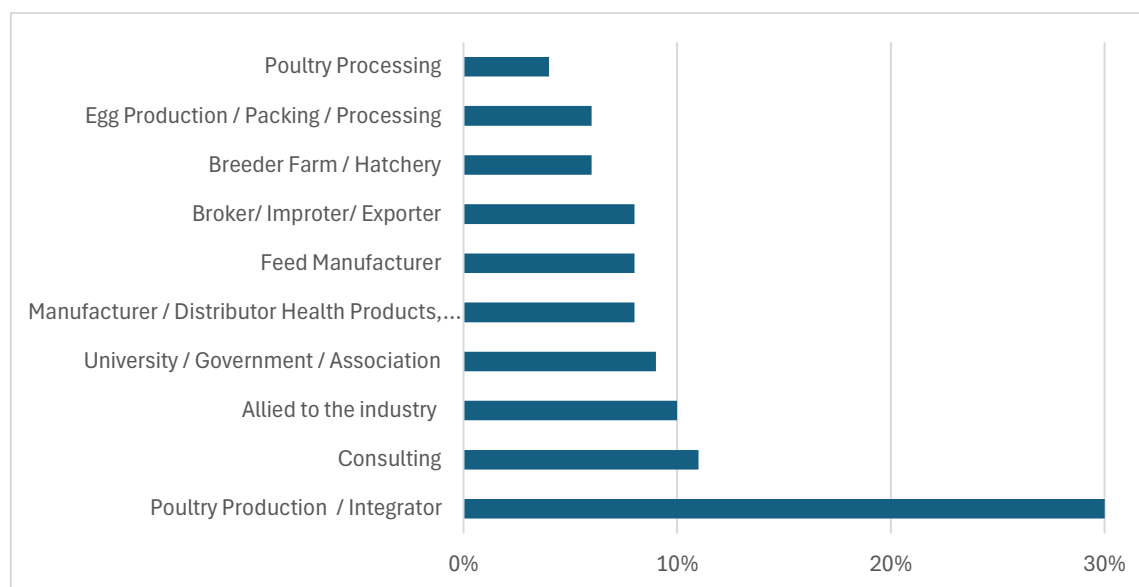
Γράφημα 1.1: Παγκόσμια παραγωγή κρέατος κοτόπουλου από το 2012 έως το 2023 (σε 1000 μετρικούς τόνους)



Πηγή: Statista.com

Το κοτόπουλο αποτελεί ένα από τα είδη κρέατος με τη μεγαλύτερη κατανάλωση τις τελευταίες δεκαετίες και ειδικότερα για το 2023 (Guide WATT Executive, 2023) (Γράφημα 1.2) Η βιομηχανία κρέατος πουλερικών αντιπροσωπεύει τα δύο τρίτα της αύξησης στην κατανάλωση κρέατος κατά την τελευταία δεκαετία. Σύμφωνα με το FAO (2021-2030), τα πουλερικά θα συνεχίσουν να ξεπερνούν τη ζήτηση για άλλα κρέατα στην παγκόσμια αγορά κρέατος (FAO, 2021). Ωστόσο, η μόλυνση από μικροοργανισμούς στη βιομηχανία πουλερικών μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση των τροφίμων, εστίες και ζημία στον εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων (Carrascosa et al., 2021). Έχει πραγματοποιηθεί ενδεδειγμένη έρευνα για τη μικροβιακή μόλυνση στον τομέα της μεταποίησης κοτόπουλου. Σύμφωνα με αναλύσεις, οι κύριες πηγές μόλυνσης από το βακτήριο *Salmonella* spp. περιλαμβάνουν σκόνη, επιφάνεια, περιττώματα, μουχλιασμένα απορρίμματα, εργάτες, νερό και τη μετακίνηση ζωντανών πουλερικών μεταξύ παραγωγής και επεξεργασίας (Chen et al., 2021, Nair & Kollanoor Johny, 2019, Rothrock Jr et al., 2019, Srey et al., 2013).

Γράφημα 1.2 : Ποσοστιαία Παραγωγή κρέατος κοτόπουλου



Πηγή: Guide WATT Executive 2023

1.2 Διατροφική αξία

Η θρεπτική αξία του κοτόπουλου σύμφωνα με την οδηγία του USDA αναγράφεται στον Πίνακα 1.2.1

Πίνακας 1.2.1: Θρεπτική σύσταση σε στήθος κοτόπουλου χωρίς δέρμα και κόκκαλα

Θρεπτικά	Μονάδες	Εκτίμηση στα 100 g
Ενέργεια	Kcal	165
Πρωτεΐνη	g	31
Συνολικά λιπίδια (λίπος)	g	3,57
Υδατάνθρακες		0.00
Ιχνοστοιχεία		
Σίδηρος (Fe)	mg	1,04
Νάτριο(Na)	mg	74
Ασβέστιο (Ca)	mg	15
Μαγνήσιο (Mg)	mg	29
Φώσφορος (P)	mg	228
Λιπίδια		
Λιπαρά οξέα κορεσμένα	g	0.00
Λιπαρά οξέα trans	g	0.00
Χοληστερόλη	mg	85

(USDA,databases,2018)

Το κύριο πλεονέκτημα του λευκού κρέατος κοτόπουλου είναι η χαμηλή θερμιδική αξία του , όπως και τα χαμηλά κορεσμένα λιπαρά, επομένως συνίσταται η κατανάλωση του σε άτομα που πάσχουν από τη στεφανιαία νόσους και καρδιακές παθήσεις, συγκριτικά με το κόκκινο κρέας.(Kralik et al., 2018). Θεωρείται επίσης καλή πηγή ορισμένων μετάλλων και βιταμινών. Σύμφωνα με τον Πίνακα 1.2.2, υποδηλώνεται πως συγκριτικά με άλλα είδη κρέατος, το κρέας κοτόπουλου περιέχει περισσότερες πρωτεΐνες και λιγότερα λιπαρά από το κόκκινο κρέας, καθιστώντας το έτσι διαιτητικό προϊόν. Όσον αφορά την περιεκτικότητα σε χοληστερόλη, το λευκό κρέας κοτόπουλου δε διαφέρει συγκριτικά με τα άλλα είδη κρέατος, ωστόσο αν ληφθούν υπόψη άλλα οφέλη όπως το γεγονός ότι περιέχει περισσότερες πρωτεΐνες, λιγότερα συνολικά λιπαρά, λιγότερες θερμίδες και λιγότερα κορεσμένες λιπαρά οξέα, θεωρείται βέλτιστη επιλογή για τη διατροφική ποιότητα και επομένως συνίσταται για όποιον προσέχει τη διατροφή και την υγεία του. Το κρέας του κοτόπουλου περιέχει χαμηλά επίπεδα κολλαγόνου, που θεωρείται ένα θετικό χαρακτηριστικό. Το κολλαγόνο είναι μία δομική πρωτεΐνη που μειώνει την πεπτικότητα του κρέατος, επομένως το κρέας θεωρείται εύκολο στην πέψη συγκριτικά με άλλα είδη κρέατος (Marangoni et al., 2015).

Σύμφωνα με τον Πίνακα 1.2.3, παρατηρείται πως το κρέας του κοτόπουλου αποτελείται επίσης καλή πηγή μετάλλων και βιταμινών συγκριτικά με το κόκκινο κρέας (εκτός από το χοιρινό). Περιέχει περισσότερο ασβέστιο, μαγνήσιο, νάτριο και φώσφορο. Περιέχει σχεδόν την ίδια

ποσότητα με το χοιρινό κρέας. Ο σίδηρος είναι απαραίτητος για τη δημιουργία της αιμοσφαιρίνης, για την πρόληψη της αναιμίας, καθώς και για τη φυσιολογική μυϊκή δραστηριότητα. Το ασβέστιο και ο φώσφορος είναι σημαντικά για τα υγιή δόντια και τα οστά. Το νάτριο θεωρείται ηλεκτρολύτης και το μαγνήσιο είναι σημαντικό για τη φυσιολογική σύνθεση της πρωτεΐνης και τη σωστή μυϊκή δραστηριότητα. Από τη συνολική περιεκτικότητα σε βιταμίνες στο κρέας κοτόπουλου, η νιασίνη (βιταμίνη B3) περιέχεται στη μεγαλύτερη ποσότητα και η περιεκτικότητα σε βιταμίνες A και B6 είναι επίσης υψηλότερη από ότι σε άλλους τύπους κρέατος. Η νιασίνη είναι πολύ σημαντική για τον σωστό μεταβολισμό των υδατανθράκων και για τη δημιουργία ενέργειας. Είναι επίσης σημαντικό για υγιές δέρμα, μαλλιά και μάτια, καθώς και για το νευρικό σύστημα. Δρα στη σύνθεση των ορμονών του φύλου και στη βελτίωση της κυκλοφορίας καθώς και στη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης. Η νιασίνη χρησιμοποιείται συχνά ως πρόσθετη θεραπεία σε ασθενείς που λαμβάνουν φάρμακα για τη μείωση των λιπιδίων του αίματος. Σε αυτή την περίπτωση, είναι επιστημονικά αποδεδειγμένο ότι η νιασίνη επηρεάζει την αύξηση των επιπέδων χοληστερόλης λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL), αλλά δεν επηρεάζει τη βελτίωση της κατάστασης της καρδιαγγειακής νόσου. (Keene et al., 2014, Garg et al., 2017). Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο Πίνακας 1.2.4 παρουσιάζεται το προφίλ των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων του νωπού κρέατος κοτόπουλου.

Πίνακας 1.2.2: Διατροφή αξία για διαφορετικούς τύπους κρέατος (ανά 100 g)

Θρεπτικά συστατικά	Κοτόπουλο	Χοιρινό	Μοσχάρι	Αρνί
Ενέργεια/kcal	165	165	185	180
Νερό/g	65.26	65.75	64.83	64.92
Πρωτεΐνη/g	31.02	28.86	27.23	28.17
Ολικό λίπος/g	3.57	4.62	7.63	6.67
Κορεσμένα λιπαρά οξέα	1.010	1.451	2.661	2.380
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα	1.240	1.878	3.214	2.920
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα	0.770	1.066	0.285	0.440
Χοληστερόλη (mg)	85	86	78	87

Πηγή: Kralik et al. (2018)

Πίνακας 1.2.3 Περιεκτικότητα βιταμινών και ιχνοστοιχείων σε διαφορετικούς τύπους κρέατος (ανά 100 g)

Μέταλλα	Κοτόπουλο	Χοιρινό	Μοσχάρι	Αρνί
Ασβέστιο (mg)	15	16	6	8
Σίδηρος (mg)	1.04	0.97	2.40	2.06
Μαγνήσιο (mg)	29	27	18	26
Φώσφορος (mg)	228	273	172	208
Κάλιο (mg)	256	425	222	342
Νάτριο (mg)	74	80	36	66
Ψευδάργυρος (mg)	1.00	2.48	4.74	5.02
Βιταμίνες				
Βιταμίνη C (mg)	0.0	0.0	0.0	0,0
Θειαμίνη (mg)	0.070	0.523	0.057	0.110
Ριβοφλαβίνη (mg)	0.114	0,408	0.170	0,280
Νιασίνη (mg)	13.712	7.940	5.232	6.390
Βιταμίνη B6 (mg)	0.600	0.538	0.380	0.170
Φυλλικό οξύ (μg)	4	0	9	24
Βιταμίνη B12 (μg)	0.34	0.67	1.61	2.71
Βιταμίνη A (μg)	6	1	0	0
Βιταμίνη E (mg)	0.27	0.26	0.37	0.18
Βιταμίνη D (D2 + D3) (μg)	0.1	0.3	—	—
Βιταμίνη K (μg)	0.3	0.0	1.3	—

Πηγή: Kralik et al. (2018)

Το κρέας του κοτόπουλου θεωρείται επιθυμητή τροφή για την πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, η χοληστερόλη και ο αιμικός σίδηρος που περιέχονται περισσότερο στο κόκκινο παρά στο λευκό κρέας, είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες για την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης, καρδιαγγειακών παθήσεων, υπέρτασης και αύξησης της χοληστερόλης του αίματος. Σύμφωνα με τα στοιχεία των Bernstein et al. (2010) αντικαθιστώντας τα γεύματα με κόκκινο κρέας με λευκό κρέας κοτόπουλου, ο κίνδυνος εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων μπορεί να μειωθεί κατά 19%.

Η μικροβιακή επιμόλυνση αποτελεί ένα σημαντικό εμπόδιο για τις οικονομικές επιδόσεις της βιομηχανίας πουλερικών (Marmion et al., 2021) όπως και για την ικανότητα κάλυψης στην αυξανόμενη ζήτηση των καταναλωτών για τα πουλερικών και τα προϊόντα πουλερικών. Οι τροφιμογενείς ασθένειες αποτελούν μία απροσδόκητη απειλή για την ανθρώπινη υγεία και

επιβάλλουν κοινωνικό και οικονομικό βάρος (Ashrafudoulla et al., 2019, Parra et al., 2018). Μεταξύ των πηγών τροφίμων, τα αυγά και το κρέας των πουλερικών θεωρούνται σημαντικές δεξαμενές παθογόνων μικροοργανισμών που μπορεί να προκαλέσουν τροφιμογενείς ασθένειες (Ashrafudoulla et al., 2021a, Silva et al., 2018). Οι ασθένειες που συσχετίζονται με τα προϊόντα των πουλερικών ευθύνονται για τεράστιες οικονομικές απώλειες (Parra et al., 2018) και η μικροβιακή μόλυνση του κρέατος των πουλερικών είναι δυνατή σε πολλαπλή στάδια σε όλη την εφοδιαστική αλυσίδα λόγω των υψηλού φορτίου των βακτηρίων.

Πίνακας 1.2.4: Περιεκτικότητα νωπού κρέατος κοτόπουλου σε αμινοξέα και λιπαρά οξέα.

Αμινοξέα	Εκτίμηση σε g ανά 100 g κοτόπουλου	Λιπαρά οξέα	Εκτίμηση σε g ανά 100 g κοτόπουλου
Αλανίνη	1,266	Μυριστικό οξύ	0,01
Αργινίνη	1,399	Παλμιτικό οξύ	0,28
Ασπαρτικό οξύ	2,068	Στεατικό οξύ	0,13
Γλουταμινικό οξύ	3,474	Παλμιτολεϊκό οξύ	0,04
Κυστεΐνη	0,297	Λινολεϊκό οξύ (LA)	0,22
Ιστιδίνη	0,72	α- Λινολεϊκό οξύ (ALA)	0,01
Ισολευκίνη	1,225	Γαδολεϊκό οξύ	0,01
Λευκίνη	1,741	Αριχιδονικό οξύ (AA)	0,06
Λυσίνη	1,971	Εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA)	0,01
Μεθιονίνη	0,642	Εικοσιπενταενοϊκό οξύ (DPA)	0,01
Φαινυλαλανίνη	0,921	Εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA)	0,02
Προλίνη	0,954		
Σερίνη	0,798		
Θρεονίνη	0,98		
Τρυπροφάνη	0,271		
Τυροσίνη	0,783		
Βαλίνη	1,151		
Γλυκίνη	1,14		

Πηγή: Ndob et al. (2015)

1.3.1 Νομοθετικό πλαίσιο

Εξαιτίας της αυξημένης ζήτησης και κατανάλωσης τροφίμων, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια Τροφίμων (EFSA) όπως και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχουν δώσει κατευθυντήριες οδηγίες με στόχο την προστασία των καταναλωτών από τροφιμογενείς νόσους (Nychas et al., 2016). Μέσω της εφαρμογής ενός συστήματος HACCP στα τρόφιμα (EC 852/2004), και ειδικότερα στα τρόφιμα ζωικής παραγωγής (EC 853/2004) οι συμμετέχοντες στον τομέα των τροφίμων απαιτείται να συμμορφώνονται με συγκεκριμένες απαιτήσεις με σκοπό να εξαλειφθούν οι φυσικοί, χημικοί και μικροβιολογικοί κίνδυνοι (EC 852/2004). Τα μικροβιολογικά κριτήρια μόνο για το βακτήριο *Salmonella Enterica* για το κρέας κοτόπουλου ορίζουν απουσία του βακτηρίου στα 25 g σύμφωνα με τον κανονισμό EC 2073/2005.

Κανονισμός 2160/2003

Σκοπός του κανονισμού: Στοχεύει στη διασφάλιση της ανίχνευσης και του ελέγχου του βακτηρίου *Salmonella Enterica* σε κάθε στάδιο και ιδιαίτερα κατά την πρωτογενή παραγωγή (στο πλαίσιο αυτό, την εκτροφή πουλερικών και άλλων ζώων) και στις ζωοτροφές, για να μειωθεί ο επιπολασμός και ο κίνδυνος για τη δημόσια υγεία.

Πεδίο εφαρμογής

Ο κανονισμός καλύπτει :

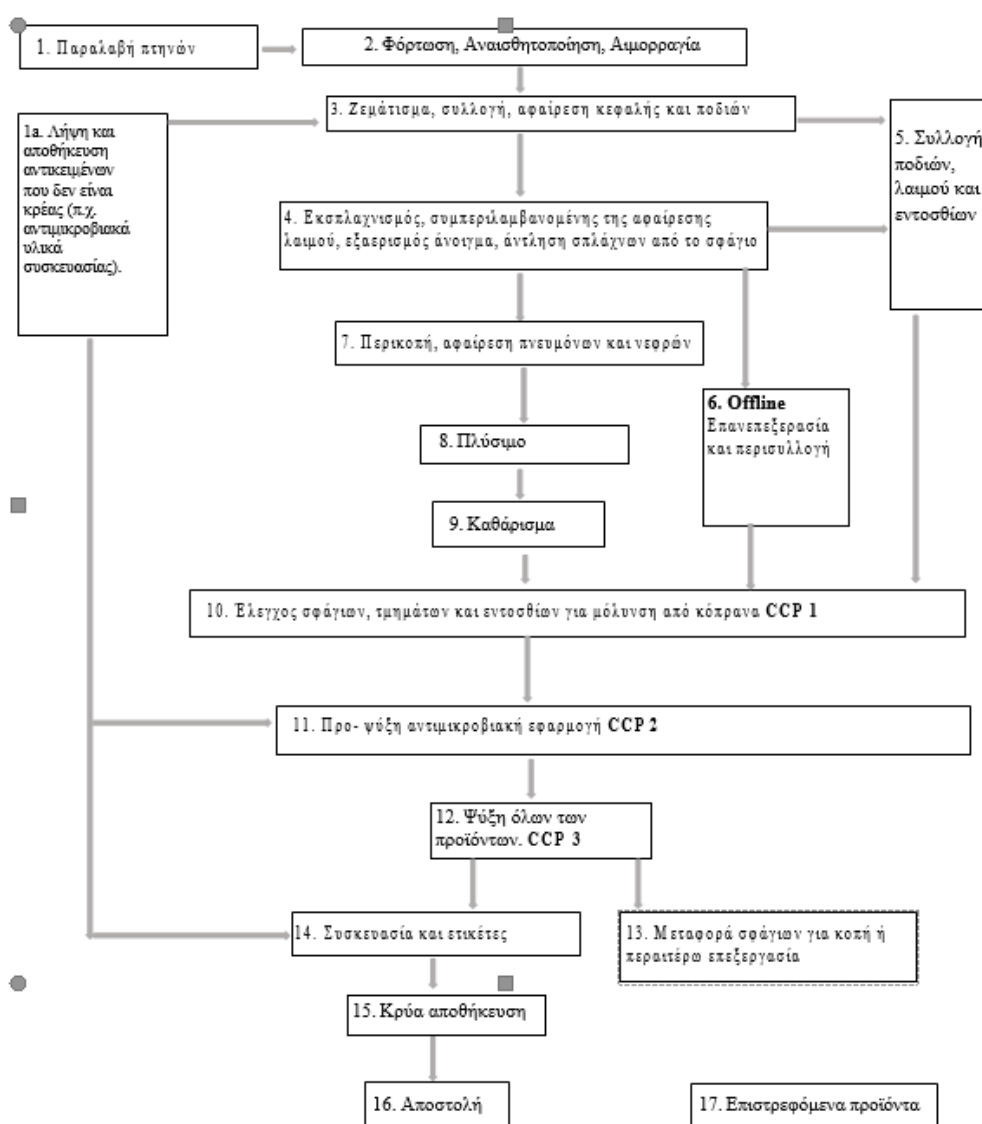
- Τους στόχους για τη μείωση του βακτηρίου (και άλλων ζωνοσογόνων παραγόντων¹)
- Την έγκριση προγραμμάτων ελέγχου που έχουν δημιουργηθεί από χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις επιχειρήσεις τροφίμων και ζωοτροφών
- Κανόνες για ορισμένες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τη μείωση του επιπολασμού
- Κανόνες για το εμπόριο εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης και τις εισαγωγές από τρίτες χώρες ορισμένων ζώων και των προϊόντων τους,

Κατά μήκος της εφοδιαστικής αλυσίδας των τροφίμων, τα μέτρα που απαιτούνται από τον (EC 2160/2003) καθορίζουν τα μικροβιολογικά κριτήρια για ορισμένους μικροοργανισμούς και κανόνες για τους υπεύθυνους επιχειρήσεων τροφίμων σε σχέση με τις απαιτήσεις του κανονισμού (EC 852/2004) για την υγιεινή των τροφίμων. Οι μικροβιολογικές δοκιμές από μόνες τους δεν μπορούν να εγγυηθούν την ασφάλεια των ελεγμένων τροφίμων, αλλά αυτά τα κριτήρια παρέχουν στόχους και τα σημεία αναφοράς για να βοηθήσουν τις επιχειρήσεις των τροφίμων να διαχειρίζονται και να παρακολουθούν την ασφάλεια των τροφίμων.

¹ Ζωνοσογόνος παράγοντας: ένα βακτήριο, όπως η *Salmonella*, που προκαλεί λοιμώξεις ή ασθένειες που μεταδίδονται άμεσα ή έμμεσα μεταξύ ζώων και ανθρώπων, μέσω επαφής ή με μολυσμένα τρόφιμα.

1.3.2 Διάγραμμα ροής της διαδικασίας

Το Γράφημα 1.3.2 αποτελεί ένα παράδειγμα διαγράμματος ροής (FSIS). Τα διαγράμματα ροής των εγκαταστάσεων για το ίδιο προϊόν μπορεί να είναι διαφορετικά. Οι εγκαταστάσεις καθορίζουν ποια βήματα περιλαμβάνονται στη διαδικασία τους. Τα βήματα πρέπει να αντιπροσωπεύουν όλους τους σχετικούς κινδύνους στην ανάλυση κινδύνου. Στον Πίνακα 1.3.1 αναγράφονται τα κρίσιμα σημεία ελέγχου (CCP) το διαγράμματος ροής.



Γράφημα 1.3.2: Διάγραμμα ροής της διαδικασίας (Σφαγή πουλερικών / Ολόκληρα σφάγια, τμήματα και άλλα άθικτα προϊόντα πουλερικών)

Πίνακας 1.3.1 :Κρίσιμα σημεία ελέγχου -Παράδειγμα Σχεδίου HACCP για τη σφαγή νεαρών κοτόπουλων (1)

CCP 1 Παρακολούθηση σφαγίων, εξαρτημάτων και εντοσθίων για μόλυνση με κόπρανα	Παθογόνα: <i>Salmonella</i>, <i>Campylobacter</i>	Δεν εισέρχονται περιττώματα στο σύστημα ψύξης.	Οπτική εξέταση για υλικό κοπράνων	Εξετάστε το εσωτερικό και το εξωτερικό επιφάνειας 10 σφαγίων και όλες τις επιφάνειες 10 μερών εντοσθίων για μολυσματικά κόπρανα .	Ελέγξτε 10 σφάγια και 10 μέρη από εντόσθια ανά ώρα παραγωγής. Επιλέξτε τυχαίους χρόνους για να εκτελέσετε τους ελέγχους. Εάν είναι διαθέσιμες λιγότερες από 10 μονάδες, εξετάστε όλες τις διαθέσιμες μονάδες.	Καθορισμένοι υπάλληλοι	Εάν παρουσιαστεί απόκλιση από το κρίσιμο όριο , ο διαχειριστής, σύμφωνα με τον 9 CFR 417.3(a): Δέσμευση όλων των προϊόντων που παράγονται μετά τον τελευταίο αποδεκτό έλεγχο έως ότου γίνει η κατάλληλη η διάθεση τους (κανένα προϊόν που βλάπτει την υγεία δε θα εισέλθει στο εμπόριο). Προσδιορίστε και εξαλείψτε την αιτία της απόκλισης, Θέστε τα CCP υπό έλεγχο. Λάβετε μέτρα για την αποτροπή επανεμφάνισης.	Ο μάνατζερ παρατηρεί και στη συνέχεια καταγράφει τα αποτελέσματα της επαλήθευσης της δραστηριότητας παρακολούθησης το κρίσιμου σημείου ελέγχου μία φορά κάθε ημέρα των επιχειρήσεων σφαγής. Ο μάνατζερ παρατηρεί και στη συνέχεια καταγράφει τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων του για τις διορθωτικές ενέργειες που έγιναν για κάθε απόκλιση από ένα κρίσιμο όριο . Τα αρχεία ελέγχονται μία φορά την εβδομάδα. 9 CFR417.4(a)(2)(iii).	Έντοπο έλεγχο μηδενικών κοπράνων Διορθωτική ενέργεια (Log) Έντοπο αξιολόγησης πριν από την αποστολή
---	--	---	--	--	--	-------------------------------	---	--	---

CCP 2 Προ-ψύξη Αντιμικροβιακή Εφαρμογή <u>3.</u>	Παθογόνα: <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i>	600-700 rpm Διάλυμα οργανικού οξέος <u>4.</u>	Παρακολούθηση της προετοιμασίας και την ανάμειξης του αντιμικροβιακού διαλύματος. Παρακολούθηση της εφαρμογής του διαλύματος.	Μετρήστε και καταγράψτε την ποσότητα του αντιμικροβιακού και την ποσότητα του νερού που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του διαλύματος. Παρακολουθήστε την εφαρμογή του διαλύματος από τον εργαζόμενο σε σφάγια, τμήματα και εντόσθια.	Ελέγξτε την ποσότητα του αντιμικροβιακ ού και του νερού που χρησιμοποιείτ αι για την Παρασκευή του διαλύματος μία φορά σε κάθε βάρδια. Η εφαρμογή του διαλύματος παρακολουθεί τε δύο φορές ανά βάρδια.	Καθορισμ ένοι υπάλληλοι	Εάν παρουσιαστεί απόκλιση από το κρίσιμο όριο , ο διαχειριστής, σύμφωνα με τον <u>9 CFR</u> <u>417.3(a):</u> Δέσμευση όλων των προϊόντων που παράγονται μετά τον τελευταίο αποδεκτό έλεγχο έως ότου γίνει η κατάλληλη η διάθεση τους (κανένα προϊόν που βλάπτει την υγεία δε θα εισέλθει στο εμπόριο). Προσδιορίστε και εξαλείψτε την αιτία της απόκλισης, Θέστε τα CCP υπό έλεγχο. Λάβετε μέτρα για την αποτροπή επανεμφάνισης.	Τυχαία, μία φορά ανά βάρδια ,ο μάντζερ παρατηρεί τη δραστηριότητα παρακολούθησης και καταγράφει τα ευρήματα. Τα αρχεία εξετάζονται μία φορά την εβδομάδα. <u>(9 CFR</u> <u>417.4(a)(2)(iii)</u>	Μορφή συμπυκνωμένου σπρέι οργανικού οξέος. Διορθωτική ενέργεια(Log) Έντυπο αξιολόγησης πριν την αποστολή.
---	--	---	--	--	---	-------------------------------	--	--	---

CCP 3 Ψύξη όλων των προϊόντων	Παθογόνα <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i>	Θερμοκρασίες σφάγιου 45 βαθμούς ή μικρότερες εντός 6 ωρών. (5) Μέρη, εντόσθια, πόδια και λαιμοί ψύχονται στους 44 βαθμούς ή λιγότερο εντός 4 ωρών από τη στιγμή που αφαιρέθηκαν από το σφάγιο.	Σφάγιο - Εσωτερικές θερμοκρασίες. Εσωτερικές θερμοκρασίες τμημάτων, εντοσθίων, ποδιών και λαιμού.	Βαθμονομημένο θερμόμετρο χειρός τοποθετημένο στο παχύτερο τμήμα του μυός του σφαγίου, ή το παχύτερο τμήμα του τμήματος, του εντόσθιου, λαιμού ή ποδιού.	Ελέγξτε το βαθμονομημένο θερμόμετρο που θα εισαχθεί στο παχύτερο τμήμα του μυός του σφαγίου, ή το παχύτερο τμήμα του τμήματος, του εντόσθιου, λαιμού ή ποδιού. Επιλέξτε τυχαίους χρόνους για να εκτελέσετε τους ελέγχους. Εάν δεν είναι διαθέσιμες 10 μονάδες, ελέγξτε όλες τις διαθέσιμες μονάδες.	Καθορισμένοι υπάλληλοι	Εάν παρουσιαστεί απόκλιση από το κρίσιμο όριο, ο διαχειριστής, σύμφωνα με τον 9 CFR 417.3(a) : Δέσμευση όλων των προϊόντων που παράγονται μετά τον τελευταίο αποδεκτό έλεγχο έως ότου γίνει η κατάλληλη η διάθεση τους (κανένα προϊόν που βλάπτει την υγεία δε θα εισέλθει στο εμπόριο). Προσδιορίστε και εξαλείψτε την αιτία της απόκλισης, Θέστε τα CCP υπό έλεγχο. Λάβετε μέτρα για την αποτροπή επανεμφάνισης.	Ο μάνατζερ τηρεί την παρακολούθηση του CCP μία φορά κάθε ημέρα εργασιών σφαγής. Μία φορά την εβδομάδα, ο μάνατζερ θα βαθμονομεί το θερμόμετρο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι εγγραφές εξετάζονται μία φορά την εβδομάδα. 9 CFR 417.4(a)(2)(iii)	Ψύξη σφάγιο, τμημάτων, εντοσθίων, ποδιών. Φόρμα βαθμονόμησης θερμομέτρου. Διορθωτικές ενέργειες (Log) Έντυπο αξιολόγησης πριν την αποστολή.
--	---	--	--	---	---	------------------------	---	---	---

Πίνακας 1.3.2: Ανάλυση κινδύνου που αφορά τη σφαγή πουλερικών

Στήλη 1	Στήλη 2	Στήλη 3	Στήλη 4	Στήλη 5	Στήλη 6
Συστατικό / Βήμα Διαδικασίας	Πιθανοί κίνδυνοι εισάγονται ή ελέγχονται σε αυτό το βήμα (6)	Είναι πιθανός ο κίνδυνος για την ασφάλεια των τροφίμων; (Ναι ή όχι) (7)	Δικαιολόγηση / Βάση της Απόφασης (8)	Εάν η απάντηση στην 3 ^η στήλη είναι ναι , ποια μέτρα ελέγχου μπορούν να εφαρμοστούν για την πρόληψη, την εξάλειψη, ή τη μείωση του κινδύνου σε αποδεκτά επίπεδα; (9)	Είναι αυτό το βήμα κρίσιμου σημείου ελέγχου (CCP); (10)

Για τον Πίνακα 1.3.2 ανατρέξτε στον Οδηγό **FSIS Meat and Poultry Hazards and Controls Guide** και στο **DRAFT FSIS Compliance Guideline** για τον έλεγχο του βακτηρίου Salmonella και Campylobacter σε ωμά πουλερικά για προτεινόμενες πρακτικές και ελέγχους. Τα ακόλουθα σχόλια αφορούν στους Πίνακες 1.3.1-1.3.2.

⁽¹⁾ Αυτό το παράδειγμα σχεδίου HACCP είναι καταλληλότερο για μικρές και πολύ μικρές εγκαταστάσεις που αναζητούν βοήθεια για την κατανόηση των απαιτήσεων του Title 9 Code of Federal Regulations (9 CFR) Part 417. Το μοντέλο HACCP είναι μόνο για σκοπούς επίδειξης. Το μοντέλο δεν αντιπροσωπεύει απαιτήσεις που πρέπει να πληρούνται. Απαιτούνται οι εγκαταστάσεις για την ανάπτυξη σχεδίων HACCP ειδικά για τις εγκαταστάσεις, τις πρακτικές παραγωγής και τα προϊόντα τους.

⁽²⁾ Κάθε εγκατάσταση πρέπει να αναπτύξει γραπτές διαδικασίες διορθωτικών ενεργειών ως απάντηση σε μία απόκλιση από το κρίσιμο όριο για να καθαριστεί τι πρέπει να κάνει με το επηρεαζόμενο προϊόν (από τον τελευταίο αποδεκτό έλεγχο), να εξαλείψει την αιτία της απόκλισης, να επαναφέρει το CCP πίσω στον έλεγχο, και για την πρόληψη μελλοντικών αποκλίσεων. (CFR 417.3).

⁽³⁾ Εάν μια εγκατάσταση εφαρμόζει μία διαδικασία σύμφωνη με τις προδιαγραφές διεργασίας που περιγράφονται στην επιστημονική υποστήριξη και η επιστημονική υποστήριξη περιέχει μικροβιολογικά δεδομένα που καθορίζουν το επίπεδο μείωσης του παθογόνου που επιτυγχάνεται με την στρατηγική παρέμβασης για το παθογόνο στόχο που προσδιορίστηκε στην ανάλυση κινδύνου, τα δεδομένα επικύρωσης εντός του εργοστασίου συλλέγονται κατά τη διάρκεια της αρχικής περιόδου επικύρωσης των 90 ημερών θα αποτελούνται από δεδομένα για μετρήσιμα χαρακτηριστικά των κρίσιμων λειτουργικών παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία, η πίεση και η συγκέντρωση. Ωστόσο, εάν μία εγκατάσταση εφαρμόζει διαφορετικές κρίσιμες λειτουργικές παραμέτρους στη διαδικασία από την επιστημονική υποστήριξη ή η επιστημονική υποστήριξη που προσδιορίστηκε δεν περιέχει μικροβιολογικά δεδομένα, τότε η εγκατάσταση θα πρέπει να συλλέγει δεδομένα εντός της μονάδας που να αποδεικνύουν τις κρίσιμες λειτουργικές παραμέτρους που έχει εφαρμόσει μπορούν όλες να πληρούνται και θα πρέπει να συλλέγει δεδομένα μικροβιολογικής επικύρωσης εντός του εργοστασίου ή να προσδιορίζει επιστημονική υποστήριξη με μικροβιολογικά δεδομένα που αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα αυτών των κρίσιμων λειτουργικών παραμέτρων (FSIS Compliance Guideline HACCP Systems Validation, page 27).

(4) Απαιτείται επιστημονική ή τεχνική υποστήριξη για την επικύρωση των κρίσιμων ορίων και των κρίσιμων παραμέτρων (π.χ. χρόνος έκθεσης) του ψεκασμού του οργανικού οξέος. Αποτελούν μέρος της ανάλυσης επικινδυνότητας και πρέπει να διατηρηθούν καθ' όλη τη διάρκεια του σχεδίου HACCP (βλέπε FSIS Compliance Guideline HACCP Systems Validation), FSIS Directive 7120.1 Safe and Suitable Ingredients Used in the Production of Meat, Poultry, and Egg Products που περιέχει εγκεκριμένες ουσίες για χρήση σε πουλερικά. Ωστόσο, κάθε εγκατάσταση πρέπει να επικυρώνει τη δική της διαδικασία.

(5) Το κρίσιμο όριο των 45 βαθμών-μοιρών (degrees) ή λιγότερο εντός 6 ωρών προέρχεται από μία εναλλακτική διαδικασία που εφαρμόζεται από το SIP (Salmonella Initiative Program). Βλέπε το FSIS Compliance Guide: Modernization of Poultry Slaughter Inspection: Chilling Requirements για πρόσθετη καθοδήγηση σχετικά με την εφαρμογή του additional “safe harbor”. Για γενικές οδηγίες σχετικές με τον καθορισμό κρίσιμων ορίων, βλέπε το Guidebook for the Preparation of HACCP Plans.

(6) Οι κίνδυνοι χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: βιολογικοί, φυσικοί, χημικοί. Οι βιολογικοί κίνδυνοι είναι οι ζωντανοί οργανισμοί. Οι χημικοί κίνδυνοι μπορεί να υπάρχουν φυσικά σε τρόφιμα που χρησιμοποιούνται ή προστίθενται κατά την επεξεργασία των τροφίμων ή χορηγούνται σε ζωντανά ζώα. Οι φυσικοί κίνδυνοι είναι ένα μη αναμενόμενο συστατικό ενός προϊόντος διατροφής, όπως πλαστικό, γυαλί, μέταλλο ή κόκαλο σε ένα προϊόν χωρίς κόκαλα.

(7) Τοποθετήστε την αιτιολόγηση της απόφασής σας στην στήλη 4. Συμπεριλάβετε μέτρα ελέγχου στην στήλη 4 για κινδύνους που δεν είναι πιθανό να συμβούν και τοποθετείστε στην στήλη 5 για κινδύνους που είναι εύλογα πιθανό να προκύψουν. Ένα υπάρχει πιθανότητα να προκύψει ένας κίνδυνος, τότε το κρίσιμο σημείο ελέγχου (CCP) πρέπει να αντιμετωπιστεί σε αυτό ή σε μεταγενέστερο βήμα. (Βλέπε **FSIS Meat and Poultry Hazards and Controls Guide** για μία λίστα με τα συχνά χρησιμοποιούμενα στοιχεία ελέγχου.)

(8) Οι επιστημονικές αναφορές είναι σημαντικές για τη λήψη αποφάσεων, την παροχή αιτιολογήσεων και την επικύρωση του συστήματος HACCP. Όταν χρησιμοποιούνται επιστημονικές αναφορές για αποφάσεις, το αναφερόμενο άρθρο πρέπει να αποτελεί μέρος των αρχείων HACCP. Εάν η αιτιολόγηση δεν προέρχεται από πρόγραμμα FSIS, τότε ο σχεδιασμός του συστήματος HACCP πρέπει να υποστηρίζεται από τεκμηριωμένα στοιχεία- δηλαδή θεωρητικές αρχές, συμβουλές ειδικών από τις αρχές επεξεργασίας, επιστημονικά ή τεχνικά δεδομένα, άρθρα σε περιοδικά με κριτές, προγράμματα μοντελοποίησης παθογόνων ή άλλες

πληροφορίες που αποδεικνύουν ότι συγκεκριμένα μέτρα ελέγχου διεργασιών μπορούν επαρκώς να αποτρέψουν, να μειώσουν ή να εξαλείψουν συγκεκριμένους κινδύνους. Αυτά τα δικαιολογητικά που δεν είναι FSIS πρέπει να φυλάσσονται για όλη τη διάρκεια του σχεδίου HACCP.

⁽⁹⁾ Επειδή τα αποτελέσματα που λαμβάνονται στο πλαίσιο προαπαιτούμενων προγραμμάτων θα μπορούσαν να επηρεάσουν τις αποφάσεις που λαμβάνονται για την ανάλυση κινδύνου (**9 CFR 417.5(a)**). Όταν μια εγκατάσταση προσδιορίζει ότι ένας πιθανός κίνδυνος δεν είναι εύλογα πιθανό να προκύψει, επειδή η εφαρμογή ενός προαπαιτούμενου προγράμματος (π.χ. Sanitation SOP, γραπτές διαδικασίες υγιεινής που ενσωματώνονται σε προαπαιτούμενα προγράμματα, προδιαγραφές αγοράς, αντιμικροβιακές παρεμβάσεις) αποτρέπει τις συνθήκες που καθιστούν τον πιθανό κίνδυνο. Πιθανότατα, αυτό το προαπαιτούμενο πρόγραμμα γίνεται συνέχεια μέρος του συστήματος HACCP και ως εκ τούτου πρέπει να επικυρωθεί. Αυτό σημαίνει ότι οι εγκαταστάσεις πρέπει να διατηρούν επιστημονική ή τεχνική υποστήριξη για το σχεδιασμό αυτών των προαπαιτούμενων προγραμμάτων που χρησιμοποιούνται για την υποστήριξη αποφάσεων στην ανάλυση κινδύνου και πρέπει να συλλέγουν δεδομένα επικύρωσης εντός της εγκατάστασης για να υποστηρίξουν ότι τα προγράμματα εφαρμόζονται όπως έχουν σχεδιαστεί. (βλ. **FSIS Compliance Guideline HACCP Systems Validation, σελίδα 5**).

⁽¹⁰⁾ Για να αναπτυχθεί ένα αποτελεσματικό CCP, βλ. **Οδηγό FSIS** για την ανάπτυξη Σχεδίων HACCP για ένα της αποφάσεις CCP και οδηγίες σχετικά με τον τρόπο ελέγχου, μείωσης ή εξάλειψης ενός κινδύνου.

1.4 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού *Salmonella* spp.

1.4.1 Μορφολογία – Βακτηριακή καλλιέργεια και διαδικασίες απομόνωσης

Το μέγεθος του βακτηρίου είναι $0,2-1,5 \times 2-5$ μm και είναι προαιρετικά αναερόβιο, ραβδοειδές και αρνητικός κατά Gram βάκιλος της οικογένειας των Enterobacteriaceae. Τα μέλη του γένους *Salmonella* παρουσιάζουν κινητικότητα μέσω μαστιγίων. Τα μέλη του γένους έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν θρεπτικά συστατικά τόσο κατά την αναπνευστική όσο και τη ζυμωτική οδό που αναφέρεται ως χημειοοργανοτροφική (Poroff et al., 2005). Η πλειονότητα των ορότυπων του βακτηρίου *Salmonella* παράγει υδρόθειο με εξαίρεση λίγους ορότυπους όπως *S. Paratyphi A* και *S. Choleraesuis*. Τα περισσότερα μέλη του γένους δε ζυμώνουν τη

λακτόζη. Αυτή η μοναδική ιδιότητα έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη μιας ποικιλίας επιλεκτικών και διαφορετικών μέσων για την καλλιέργεια, την απομόνωση και την πιθανή ταυτοποίηση του βακτηρίου *Salmonella* (Rambach et al., 1990). Αυτά τα μέσα περιλάμβαναν άγαρ *Salmonella*- *Shigella* agar (SS), brilliant green agar (BGA), xylose lysine deoxycholate (XLD), Hektoen enteric (HE) agar, MacConkey agar, lysine iron agar (LIA), triple sugar iron (TSI) agar (Andrews et al., 2001, Hui et al., 2001). Τυπικά, η απομόνωση του βακτηρίου *Salmonella* από επιχρίσματα, τρόφιμα και άλλα περιβαλλοντικά δείγματα χρησιμοποιώντας την παραδοσιακή ή συμβατική μέθοδο καλλιέργειας περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια προεμπλουτισμού, επιλεκτικού εμπλουτισμού και ανάπτυξης σε επιλεκτικά και διαφορετικά μέσα με σκοπό την ενίσχυση της ευαισθησίας των μεθόδων ανίχνευσης (Andrews et al., 2001). Περιλαμβάνει έναν αρχικό προ-εμπλουτισμό ενός καθορισμένου όγκου του δείγματος, που ακολουθείται από ένα στάδιο επιλεκτικού εμπλουτισμού, επιμετάλλωση σε επιλεκτικά άγαρ και στη συνέχεια βιοχημική και ορολογική επιβεβαίωση ύποπτων πιθανών αποικιών (Lee et al., 2015). Τα τελευταία χρόνια, αρκετοί ρυθμιστικοί φορείς, όπως η ένωση επίσημων αναλυτικών χημικών, η υπηρεσία διαχείρισης τροφίμων και φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA), η υπηρεσία ασφάλειας και επιθεώρησης τροφίμων του Υπουργείου Γεωργίας των ΗΠΑ (USDA) και ο Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (ISO) έχουν τυποποιήσει διαφορετικές προσεγγίσεις εμπλουτισμού *Salmonella* spp. χρησιμοποιώντας τις μοναδικές βιοχημικές φυσικές της ιδιότητες. Η τρέχουσα μέθοδος του προτύπου ISO, (ISO 6579:2002) έχει υιοθετηθεί από πολλά κέντρα αναφοράς *Salmonella* spp. και είναι ουσιαστικά παρόμοια με άλλες τυπικές μεθόδους ανίχνευσης για το συγκεκριμένο βακτήριο που έχουν τυποποιηθεί από άλλους ρυθμιστικούς φορείς (ISO 6579: 2002).

1.4.2 Απαιτήσεις μικροβιακής αύξησης

Είναι ανθεκτικά στην ξηρασία και στο ψύχος, ιδιαίτερα σε προϊόντα με περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λίπος και αναπτύσσονται σε θερμοκρασία μεταξύ 8°- 45° C και σε pH 4-8. Παρά το γεγονός ότι κατά κύριο λόγο είναι βακτήρια του εντέρου, μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο διάστημα στο περιβάλλον κυρίως σε συνθήκες αυξημένης υγρασίας και θερμοκρασίας και μπορεί να βρεθούν στα λύματα των γεωργικών εκμεταλλεύσεων, τα ανθρώπινα λύματα και σε κοπρανώδη μόλυνση. Η σαλμονέλλωση έχει αναγνωριστεί σε όλες τις χώρες αλλά φαίνεται ως πιο διαδεδομένη σε περιοχές εντατικές εκτροφής ζώων και κυρίως χοίρων και πουλερικών (Andino et al., 2015).

Το βακτήριο *Salmonella* έχει τρία βασικά αντιγόνα: τον λιποπολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος (O-αντιγόνο), την πρωτεΐνη των μαστιγίων (H-αντιγόνο) και τα καψικά (VI)

αντιγόνα, τα οποία δεν υπάρχουν σε όλους τους ορότυπους. Τα Ο-αντιγόνα φέρουν ανθεκτικότητα στο βρασμό, στην αιθυλική αλκοόλη και στα αραιά οξέα, ενώ τα πρωτεϊνικής φύσης Η-αντιγόνα είναι θερμοευαίσθητα. Επιπλέον τα Η-αντιγόνα μπορεί να εκφράζονται σε δύο φάσεις. Η φάση 1 είναι συγκεκριμένη και συνδέεται με την ανοσολογική ταυτότητα συγκεκριμένων ορότυπων, ενώ η φάση 2 θεωρείται μη ειδική και μπορεί να υπάρχει σε πολλούς ορότυπους. Τα στελέχη του βακτηρίου που βρίσκονται μόνο σε μια φάση ονομάζονται «μονοφασικές» ενώ αυτές που βρίσκονται και στις δύο φάσεις «διφασικές» (Grimont et al., 2007).

1.4.3 Ταξινόμηση

Τα εν λόγω βακτήρια ανήκουν στο γένος *Salmonella*, της οικογένειας Enterobacteriaceae. Το γένος *Salmonella* υποδιαιρείται σε δύο είδη, το είδος *S. enterica* και το είδος *S. bongori*. Το είδος *S. enterica* υποδιαιρείται σε έξι υποείδη: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *arizonae* και *S. enterica* subsp. *indica*.

Τα είδη του βακτηρίου *Salmonella* ταξινομούνται σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης Kaufman - White σε ορότυπους με βάση τον λιποπολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος (Ο-αντιγόνο), την πρωτεΐνη των μαστιγίων (Η-αντιγόνο) και τα καψικά (VI) αντιγόνα. Ο αριθμός ορότυπων για κάθε είδος και υποείδος του βακτηρίου *Salmonella* παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.4.3.

Πίνακας 1.4.3 Αριθμός ορότυπων για κάθε είδος και υποείδος του βακτηρίου *Salmonella*

S. enterica	N
subsp. <i>enterica</i>	1586
subsp. <i>salamae</i>	522
subsp. <i>arizonae</i>	10
subsp. <i>diarizonae</i>	338
subsp. <i>indica</i>	13
subsp. <i>houtenae</i>	76
<i>S. bongori</i>	22
Total	2659

Πηγή: Issenhuth-Jeanjean, S., et al., (2014) Research in Microbiology 165(7): p. 526-3

Σύμφωνα με την EFSA, το 2020 αναφέρθηκαν 69.898 μονάδες δειγματοληψίας τροφίμων έτοιμων προς κατανάλωση (RTE) και 207750 μονάδες δειγματοληψίας τροφίμων μη έτοιμων προς κατανάλωση (non RTE) από 22 και 25 κράτη μέλη, με 0,15% και 2,4% αντίστοιχα θετικών δειγμάτων εντός της κατηγορίας RTE. Τα υψηλότερα ποσοστά θετικών δειγμάτων προέρχονταν από κρέας και προϊόντα κρέατος από κοτόπουλα κρεοπαραγωγής (1,6%), μπαχαρικά και βότανα (0,83%), κρέας και προϊόντα κρέατος από χοίρους (0,57%), κρέας και προϊόντα κρέατος από γαλοπούλες (0,46%) και άλλο κρέας προϊόντα κρέατος (0,46%). Εντός της κατηγορίας των μη έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων τα υψηλότερα ποσοστά θετικών δειγμάτων αναφέρθηκαν για κρέας και προϊόντα κρέατος από γαλοπούλες (7,1%), κρέας και προϊόντα κρέατος από κοτόπουλα κρεοπαραγωγής (6,6%) και κρέας και προϊόντα κρέατος από χοίρους (1,6%). Ορισμένες απομονώσεις του βακτηρίου Salmonella αναφέρθηκαν επίσης από αυγά και προϊόντα αυγών (0,63%), βλαστοί (0,54%) και ψάρια και προϊόντα αλιείας (0,42%). (Πίνακας 1.4.4) Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα για το έτος 2020 και την τετραετή περίοδο 2016-2019, το συνολικό ποσοστό των θετικών δειγμάτων του βακτηρίου Salmonella μειώθηκε στα τρόφιμα RTE το 2020.

Πίνακας 1.4.4: Εμφάνιση του βακτηρίου Salmonella σε κύριες κατηγορίες τροφίμων, Ευρωπαϊκή Ένωση, 2020

Τρόφιμα	2020		
	N κράτη μέλη	N μονάδες δειγματοληψίας τροφίμων (RTE)	Θετικό N(%)
Όλα	22	69.898	107 (0,15)
Κρέας και προϊόντα κρέατος	19	11.962	57 (0,48)
Κρέας και προϊόντα κρέατος από κοτόπουλα κρεοπαραγωγής	12	489	8 (1,64)
Κρέας και προϊόντα κρέατος από γαλοπούλες	10	219	1 (0,46)
Κρέατα και προϊόντα κρέατος από χοίρους	16	4.056	23 (0,57)
Κρέατα και προϊόντα κρέατος από βοοειδή	14	620	1 (0,16)
Μικτά	12	1.376	0
Άλλα κρέατα και προϊόντα κρέατος	12	5.167	24 (0,46)
Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα	20	25.293	19 (0,08)
Γάλα	9	1.237	0
Ακατέργαστο γάλα	5	794	0
Τυρί	18	12.566	18 (0,14)
Γαλακτοκομικά προϊόντα εκτός των τυριών	19	11.475	1 (0,01)
Φρούτα και λαχανικά	18	6.183	5 (0,08)
Ψάρια και αλιευτικά προϊόντα	19	3.161	0
Μπαχαρικά και βότανα	17	1.561	13 (0,83)
Προϊόντα αρτοποιίας	16	4.813	0
Σαλάτες	12	3.519	2 (0,06)

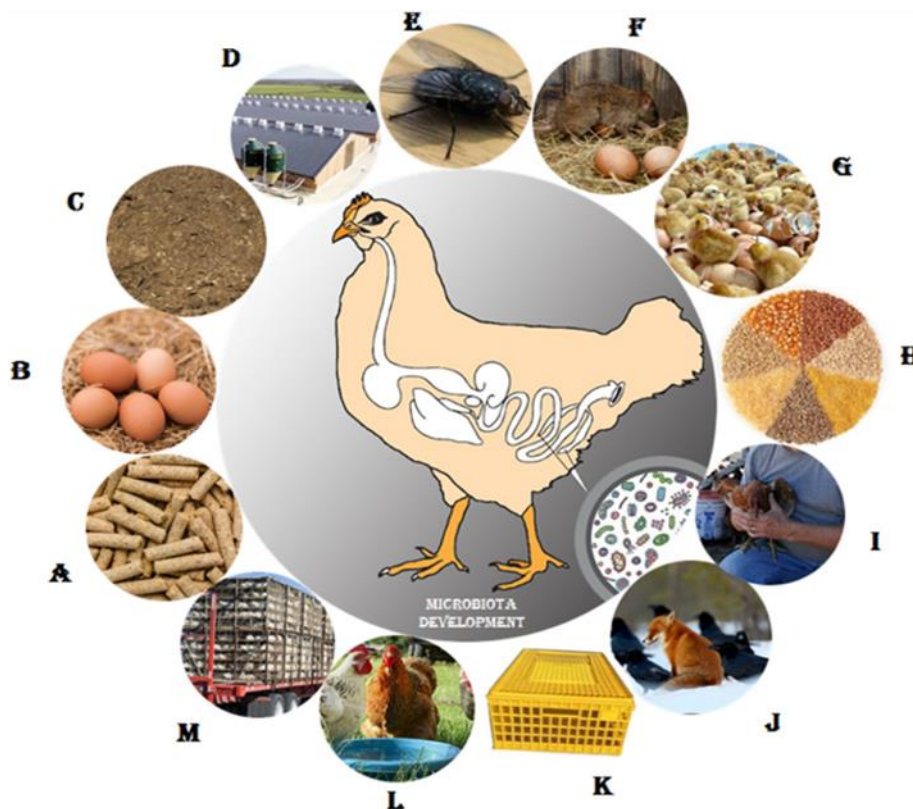
Άλλα μεταποιημένα τρόφιμα και παρασκευασμένα πιάτα	15	7.771	8 (0,10)
Αυγά και προϊόντα αυγών	6	44	0
Βλαστοί (σπόροι)	10	388	1 (0,26)
Δημητριακά και ξηροί καρποί	13	1.330	1 (0,08)
Ζαχαρώδη	4	218	0
Βρεφικά παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας-RTE	13	1.294	0
Τρόφιμα που προορίζονται για ειδικές διατροφικές χρήσεις	11	672	1 (0,15)
Μη έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα			
Όλα	25	207.750	4.931 (2,37)
Κρέας και προϊόντα κρέατος	24	186.577	4.856 (2,60)
Κρέας και προϊόντα κρέατος από κοτόπουλα κρεοπαραγωγής	24	41.750	2.751 (6,59)
Κρέας και προϊόντα κρέατος από γαλοπούλες	22	3.685	261 (7,08)
Κρέατα και προϊόντα κρέατος από χοίρους	24	72.779	1.181 (1,62)
Κρέατα και προϊόντα κρέατος από βοοειδή	23	40.637	186 (0,46)
Μικτά	14	4.503	57 (1,27)
Άλλα κρέατα και προϊόντα κρέατος	21	23.223	420 (1,81)
Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα	10	1.278	0
Φρούτα και λαχανικά	14	1.748	1 (0,06)
Ψάρια και αλιευτικά προϊόντα	19	7.352	31 (0,42)
Αυγά και προϊόντα αυγών	15	5.554	35 (0,63)
Βλαστοί (σπόροι)	4	371	2 (0,54)
Βρεφικά παρασκευάσματα	2	42	0
Τρόφιμα που προορίζονται για ειδικές διατροφικές χρήσεις	6	209	0
Δημητριακά και αποξηραμένοι σπόροι	10	461	1 (0,22)
Άλλα μεταποιημένα τρόφιμα και παρασκευασμένα πιάτα	12	3.221	5 (0,16)
Νωπό κρέας			
Όλα	24	149.636	4.043 (2,70)
Νωπό κρέας από κοτόπουλα κρεοπαραγωγής	24	31.436	2.519 (8,01)
Νωπό κρέας από γαλοπούλες	20	3.124	222 (7,11)
Νωπό κρέας από χοίρους	22	62.341	1.004 (1,61)
Νωπό κρέας από βοοειδή	21	37.866	153 (0,40)
Άλλο νωπό κρέας	19	14.869	145 (0,9)

Πηγή: EFSA, The European Union One Health 2020 Zoonoses Report

Οι ορότυποι που ευθύνονται σε μεγαλύτερο ποσοστό για την πρόκληση της τροφιμογενούς σαλμονέλλωσης παγκοσμίως είναι οι *Salmonella* Enteritidis και *Salmonella* Typhimurium. Πρόκειται για τους δύο πιο συχνούς ορότυπους που απομονώνονται από επιδημίες σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες (ΟΙΕ, 2010).

1.5 Στρατηγικές ελέγχου μόλυνσης των παθογόνων στη βιομηχανία ορνιθίων

Η διασφάλιση της μικροβιολογικής ασφάλειας των σφάγιων και των μερών πουλερικών αποκτά ολοένα και μεγαλύτερη σημασία λόγω της αυξανόμενης παγκόσμιας κατανάλωσης κρέατος κοτόπουλου (Rouger et al., 2017). Μεγάλο μέρος της έρευνας σχετικά με τη μικροβιακή μόλυνση του κρέατος πουλερικών επικεντρώνεται στον εντοπισμό παθογόνων μικροοργανισμών (συχνότερα *Salmonella* και *Campylobacter*) και στην ανάλυση της συμπεριφοράς τους υπό διάφορες διαδικασίες απολύμανσης, μετατροπής (περαιτέρω επεξεργασίας) και αποθήκευσης (Chaillou et al., 2015). Στα σύγχρονα εμπορικά εκκολαπτήρια κοτόπουλων, οι συνθήκες υγιεινής των γονιμοποιημένων αυγών διατηρούνται αυστηρά για την αποφυγή παθογόνων μολύνσεων στους νεοσσούς που μόλις εκκολάφθηκαν- ωστόσο, διασταυρούμενη μόλυνση μπορεί να συμβεί κατά την πρώτη σίτιση και τη μεταφορά των ζωντανών πτηνών στις εγκαταστάσεις μεταποίησης (Kim & Kim, 2010, Stanley et al., 2013, McMullin, 2009, Mead et al., 1994, Slader et al., 2002). Εκτός από τις πηγές βακτηριακής μόλυνσης των πουλερικών που αναφέρθηκαν παραπάνω, άλλες πηγές επιμόλυνσης περιλαμβάνουν τα μολυσμένα κιβώτια και τα μέσα μεταφοράς, τη σφαγή, το εργοστάσιο επεξεργασίας πουλερικών και τους χειριστές των σφαγίων (Εικόνα 1.5) (Buncic & Sofos, 2012, Haberecht et al., 2020, Melero et al., 2019, Ono & Yamamoto, 1999).

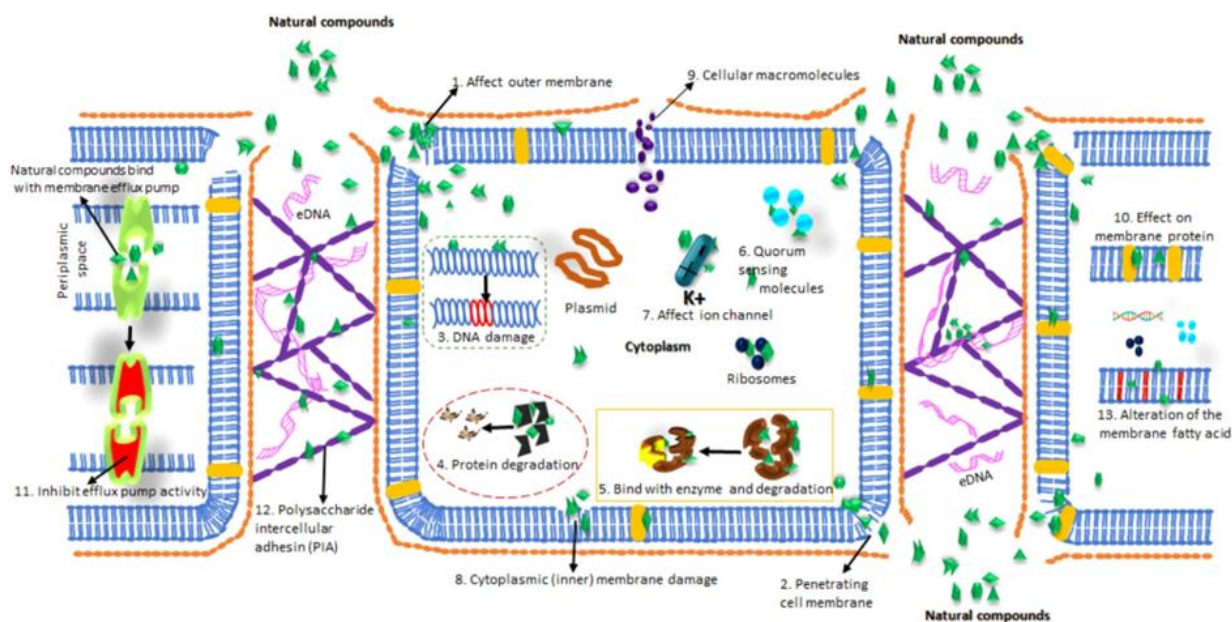


Εικόνα 1.5: Πηγές βακτηριακής μόλυνσης πουλερικών: (Α) Ζωοτροφές πουλερικών, (Β) Αυγά πουλερικών, (C) Απορρίμματα πουλερικών, (D) Υπόστεγο -εγκαταστάσεις, (E): Μύγες, (F) Τρωκτικά, (G) Εκκολαπτήριο, (H) Πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ζωοτροφών, (I) Χειριστές, (J) Άγρια ζώα, (K) Μολυσμένα δοχεία μεταφοράς, (L) Μολυσμένο πόσιμο νερό, (M): Μολυσμένα οχήματα μεταφοράς ορνιθίων. (Chowdhury et al., 2023)

1.5.1 Φυτοβιοτικά

Είναι εκχυλίσματα φυτικής προέλευσης και περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα ουσιών, όπως βότανα, μπαχαρικά, αιθέρια έλαια και ολεορεσίνες που φέρονται να παρουσιάζουν αυξητικές ή/και θεραπευτικές ιδιότητες (Pirgozliev et al., 2019). Τα φυτοβιοτικά προστίθενται στις ζωοτροφές με σκοπό την αύξηση των αποδόσεων των παραγωγικών ζώων και τη βελτίωση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων. Ο όρος φυτικά βιοενεργά συστατικά αφορά σε μία πληθώρα μικρού μοριακού βάρους δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών, που η παραγωγή τους, ανάλογα με το είδος των συστατικών και του φυτού που τα παράγει, εξυπηρετούν διάφορες λειτουργικές διεργασίες που σχετίζονται κυρίως με την αναπαραγωγή τους και με την άμυνά τους έναντι οποιουδήποτε δυσμενούς παράγοντα. Τα φυτικά βιοενεργά συστατικά όπως τα αιθέρια έλαια, εκχυλίσματα βοτάνων, ελαιορητίνες, τανίνες, σαπωνίνες, αλκαλοειδή, φλαβονοειδή, φαινολικές ενώσεις, γλυκοζίδια και πολυπεπίδια, παρουσιάζουν ορισμένες ευεργετικές ιδιότητες (Abdelli et al., 2021), όπως, αντιοξειδωτικές, αντικές, αντιμικροβιακές, αντιπαρασιτικές, αντιφλεγμονώδεις, σταθεροποίηση ή και τροποποίηση της μικροχλωρίδας του πεπτικού συστήματος των ζώων και επίδρασης του ανοσολογικού συστήματος (Hameed,

2021). Ένα ευρύ φάσμα προϊόντων φυτικής προέλευσης εμπίπτει στην κατηγορία των φυτοβιοτικών. Μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την προέλευσή τους σε βότανα (προϊόντα από ανθοφόρα, μη ξυλώδη και μη ανθεκτικά φυτά από τα οποία χρησιμοποιούνται φύλλα και άνθη), σε μπαχαρικά (μη φυλλώδη μέρη φυτών, συμπεριλαμβανομένων των σπόρων, των καρπών, του φλοιού ή της ρίζας με έντονη γεύση ή οσμή), αιθέρια έλαια (προϊόντα απόσταξης με υδρατμούς, τα οποία είναι πτητικά συστατικά των φυτών) και ολεορεσίνες (εκχυλίσματα με τη χρήση μη υδατικών διαλυτών). Η σύνθεση και η συγκέντρωση των βιοδραστικών ουσιών μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με διάφορους παράγοντες, όπως το φυτό, τα μέρη του φυτού, τη γεωγραφική προέλευση, την εποχή συγκομιδής, τις κλιματικές συνθήκες, τις τεχνικές επεξεργασίας όπως εκχύλιση, απόσταξη και σταθεροποίηση καθώς και τις συνθήκες αποθήκευσης (Abdelli et al., 2021). Στην Εικόνα 1.5.1 παρουσιάζεται ένας υποθετικός μηχανισμός δράσης των φυτοβιοτικών παθογόνα βακτήρια. Οι φυσικές ενώσεις επηρεάζουν την εξωτερική κυτταρική του κυττάρου των βακτηρίων και διεισδύουν στην κυτταρική μεμβράνη για να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα. Η φυσική ένωση μπορεί να επηρεάσει τη μεταβολική δραστηριότητα των βακτηρίων, επηρεάζοντας τη φυσιολογική λειτουργία των ενδοκυτταρικών συστατικών, όπως η καταστροφή του DNA, την αποικοδόμηση της δομής της πρωτεΐνης και των ενζύμων και την παρεμβολή της κανονικής τους λειτουργίας επηρεάζοντας τα μόρια ανίχνευσης και το κανάλι δραστηριότητας ιόντων. Μπορεί να αυξήσει την απελευθέρωση ενδοκυτταρικών μακρομορίων επηρεάζοντας τη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Μπορεί επίσης να επηρεάσει τη δραστικότητα της αντλίας εκροής και των μεμβρανικών πρωτεϊνών και να υποβαθμίσει την ενδοκυτταρική προσκόλληση μεταξύ των κυττάρων. Η αλλοίωση της μεμβράνης του λιπαρού οξέος λόγω της παρεμβολής των φυσικών ενώσεων, όπως ενσωματώνονται σε κυτταρικές μεμβράνες, οδηγεί τελικά σε βακτηριακό κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 1.5.1 Υποθετικός μηχανισμός δράσης φυτικών ενώσεων σε παθογόνα βακτήρια (Chowdhury et al., 2023)

Πίνακας 1.5.1: Μηχανισμός δράσης ορισμένων φυτικών εκχυλισμάτων

Ονομασία φυτού	Λατινική ονομασία	Κύρια χημική ένωση	Μηχανισμός δράσης
Θυμάρι	<i>Tymus vulgaris</i>	Thymol	Διέγερση της πέψης, αντισηπτικό, αντιοξειδωτικό
Φασκόμηλο	<i>Salvia apiana</i>	Cineole	Διέγερση της πέψης, αντισηπτικό,
Δάφνη	<i>Laurus nobilis</i>	Cineole	Διέγερση της πέψης
Δενδρολίβανο	<i>Aniba rosaeodora</i>	Cineole	Διέγερση της πέψης, αντισηπτικό, αντιοξειδωτικό
Γαρύφαλλο	<i>Syzgium aromaticum</i>	Eugonol	Διέγερση της όρεξης, της πέψης, αντιοξειδωτικό
Γλυκάνισος	<i>Illicum verum</i>	Anethole	Διέγερση της πέψης, τόνωση της απόδοσης γάλακτος
Τζίντζερ	<i>Zingiber officinale</i>	Zingerole	Διέγερση γαστρικής έκκρισης
Κορίανδρος	<i>Coriandum sativum L.</i>	Unalol	Διέγερση της πέψης
Μέντα	<i>Mentha piperita</i>	Menthol	Ενισχυτικό της όρεξης, πεπτικό

Σκόρδο	<i>Allium sativum</i>	Allicin	διεγερτικό, αντισηπτικό Διέγερση της πέψης, αντισηπτικό
--------	-----------------------	---------	--

(Chrubasik et al., 2005).

1.6 Ο ρόλος των φυτικών βιοενεργών συστατικών στη διατροφή της όρνιθας

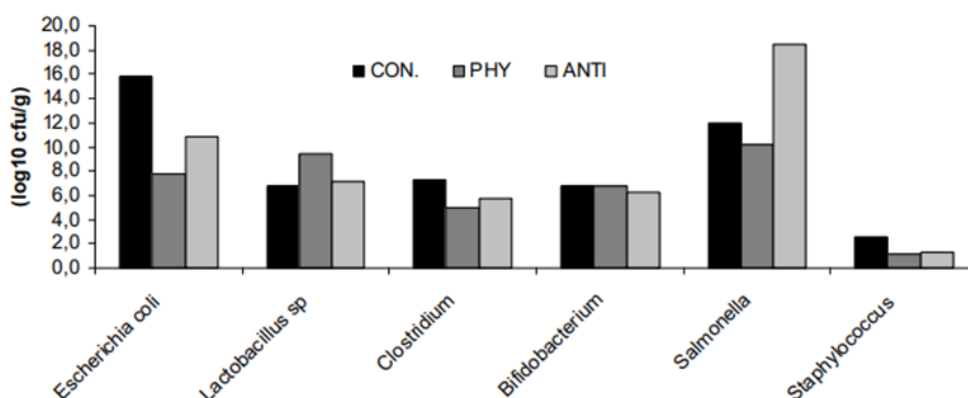
Στη διατροφή των ορνίθων ,ως πρόσθετες ύλες, για χρόνια χρησιμοποιούνταν τα αντιβιοτικά με σκοπό την τόνωση της ανάπτυξης, τη βελτίωση της παραγωγής και την πρόληψη των λοιμώξεων από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η υπερβολική χρήση των αντιβιοτικών όμως, οδήγησε στη δημιουργία ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, στη συσσώρευση υπολειμμάτων φαρμάκων σε ζωικά προϊόντα και στην ανάγκη των καταναλωτών για μια τροφική αλυσίδα απαλλαγμένη από φάρμακα (Hameed, 2021). Έτσι, η Ευρωπαϊκή Ένωση με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1831/2003 σύμφωνα με το Άρθρο 11 απαγόρευσε σε όλα τα κράτη– μέλη από το 2006 τη χρήση αντιβιοτικών στη διατροφή των ζώων. Ως εκ τούτου, η αναζήτηση φυσικών συστατικών όπως τα φυτικά εκχυλίσματα με φαρμακευτικές ιδιότητες αποτέλεσε κίνητρο μελέτης για την ένταξη τους στη διατροφή των πτηνών (Pirgozliev et al., 2019).

Τα φυτοβιοτικά μελετήθηκαν εκτενέστερα λόγω των ιδιοτήτων τους για τη βελτίωση της απόδοσης και της υγείας των ζώων μέσω την ακόλουθων επιδράσεων: 1) αντιμικροβιακές ιδιότητες, 2) βελτίωση της πεπτικότητας, 3)αντιοξειδωτικά και αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα, 4) σταθεροποίηση της εντερικής μικροχλωρίδας, 5) βελτίωση των αποδόσεων των ζώων και 6) μείωση των περιβαλλοντικών εκπομπών (Shehata et al., 2022). Ταυτόχρονα, η χορήγηση φυτοβιοτικών εφαρμόζεται σε υγιή ζώα κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων για τους σκοπούς της διατροφής και της βελτίωσης της παραγωγής, σε αντίθεση με τα κτηνιατρικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε παθολογικές περιπτώσεις υπό κτηνιατρική επιτήρηση για περιορισμένη περίοδο και ακολουθούνται από περιορισμένο χρόνο αναμονής μέχρι την επόμενη χρήση (Hameed, 2021). Είναι σημαντικό ωστόσο να αναφερθούν κάποιοι περιορισμοί ως προς τη χρήση τους όπως: 1) η εξασφάλιση της ελάχιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης, 2) η αποφυγή πολύ υψηλών συγκεντρώσεων των φυσικών συστατικών που έχουν δυνητικά αντιδιαιτητικούς παράγοντες και 3) η εξασφάλιση συνέργειας διότι οι συνδυασμοί φυτικών εκχυλισμάτων μπορούν να έχουν ανταγωνιστικές επιδράσεις (Shehata et al., 2022).

Στο σημείο αυτό θα ήταν σημαντικό να τεκμηριωθούν μέσω βιβλιογραφικής ανασκόπησης τα οφέλη των φυτοβιοτικών στη διατροφή των ορνίθων κρεοπαραγωγής (Gomes et al., 2021).

Τα φυτογενή πρόσθετα ζωοτροφών χρησιμοποιούνται για την υποκατάσταση των αντιβιοτικών ως ενισχυτές απόδοσης στη διατροφή των κοτόπουλων κρεοπαραγωγής. Σύμφωνα με τη

βιβλιογραφία έχουν εξεταστεί διαφορετικά είδη φυτοβιοτικών ως πρόσθετα ζωοτροφών σε διατροφή ορνιθίων κρεοπαραγωγής, όπως: *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Allium sativum*, *Mentha arvensis*, *Cinnamomum* spp. και *Citrus limonun*. Η πλειοψηφία άνηκε σε ένα αρωματικό είδος που ήταν πλούσιο σε αιθέρια έλαια. Στις περισσότερες μελέτες για την επίδραση των φυτοβιοτικών δε χρησιμοποιήθηκε αντιβιοτικό ως συγκριτική παράμετρος. Όσον αφορά τα αντιβιοτικά που εφαρμόζονται σε μελέτες, ορισμένα εξ αυτών είναι τα ακόλουθα: οξυτετρακυκλίνη, δισαλικυλική βακιτρακίνη, αβιλαμυκίνη και αλλά όπως δοξυκυκλίνη, νατριούχο μονενσίνη, σαλινομυκίνη, Tylosin και Toltrazuril. Όσον αφορά στον αποικισμό των βακτηρίων στο έντερο των πτηνών, το Γράφημα 1.6 δείχνει ότι η χρήση φυτογενών πρόσθετων ζωοτροφών και των αντιβιοτικών μείωσαν τα συνολικά βακτήρια *E. coli* κατά 50,9% και 32,1% αντίστοιχα, σε σύγκριση με τη μη χρήση (διατροφή ελέγχου-control). Το γένος *Lactobacillus* spp. αυξήθηκε με τη χορήγηση φυτοβιοτικών (40,3%) και αντιβιοτικών (6,0%) σε σύγκριση με το μάρτυρα. Οι αριθμοί που αντιστοιχούν στα βακτήρια του γένους *Clostridium* μειώθηκαν κατά 31,5% και 20,5% με φυτογενείς πρόσθετες ζωοτροφές και αντιβιοτικά, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το μάρτυρα. Η χρήση φυτοβιοτικών μείωσε την ποσότητα του βακτηρίου *Salmonella* spp. κατά 15% και κατά 54,2% με αντιβιοτικά σε σύγκριση με το μάρτυρα. Οι Mohiti- Asli & Rashti (2018) παρατήρησαν μία σαφή μείωση στον αριθμό του *E. coli*, ως παθογόνου μικροοργανισμού στο έντερο του κοτόπουλου, με την εφαρμογή 300ppm και 500ppm ελαίου ρίγανης σε σχέση με τη διατροφή του μάρτυρα που περιλαμβάνει το εμπορικό προϊόν. Οι Turcu et al. (2018), χορήγησαν σε κοτόπουλα κρεοπαραγωγής *Origanum vulgare* με τη μορφή λαδιού και σκόνης και κατά την αξιολόγηση της εντερικής μικροχλωρίδας, οι συγγραφείς σημείωσαν ότι ο συνολικός αριθμός των βακτηρίων *E. coli* και *Staphylococcus* spp. μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Ο αριθμός των γαλακτοβακίλλων αυξήθηκε σημαντικά σε πειραματικές διατροφές συγκριτικά με το μάρτυρα.



Γράφημα 1.6: Βακτήρια που βρέθηκαν στο έντερο των ορνιθίων κρεοπαραγωγής σε διάφορες μελέτες που συγκρίνουν το μάρτυρα (CON: CONTROL), τα φυτοβιοτικά (PHY) και τα αντιβιοτικά (ANTI). (Gomes et al., 2021)

Οι Hamed et al. (2022) μελέτησαν σε ορνίθια κρεοπαραγωγής, το έλαιο θυμόλης και τα μικρογαλακτώματα θυμόλης για την αποτελεσματικότητα και τον έλεγχο της μόλυνσης από το βακτήριο *Salmonella* Enteritidis, είτε μόνο του είτε συνδυαστικά με αντιβιοτικά σουλφατριμεθοπρίμης. Σε αυτή τη μελέτη ελήφθησαν 210 κοτόπουλα φυλής Cobb και διαχωρίστηκαν σε 14 ομάδες. Οι μολυσμένες ομάδες προσβλήθηκαν με τη χρήση δύο στελεχών *Salmonella* Enteritidis πολυανθεκτικών στα φάρμακα (MDR) και *Salmonella* Enteritidis ευαίσθητων στο αντιβιοτικό σουλφα-τριμεθοπρίμη. Το ενοφθαλμισμένο εμβόλιο ήταν 1×10^9 CFU *Salmonella* Enteritidis και χορηγήθηκε διά στόματος. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) των δόσεων θεραπείας ήταν 33,34 mg/Kg κ.β. για τη σουλφαδιαζίνη και 0,1% νερό για το θυμαρέλαιο και το γαλάκτωμα θυμαριού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο το έλαιο θυμαριού (0,1%) όσο και το μικρογαλάκτωμα (0,01%) ήταν σε θέση να μειώσουν τον αριθμό των *Salmonella* Enteritidis στο περιεχόμενο του τυφλού και στα κόπρανα και τα ποσοστά θνησιμότητας μετά από πέντε ημέρες θεραπείας. Σύμφωνα με τους Hamed et al. (2022) το έλαιο θυμόλης και το μικρογαλάκτωμα θυμόλης έχουν αντιβακτηριακή δράση, η οποία προκαλεί μείωση του αριθμού του βακτηρίου *Salmonella* στο τυφλό έντερο ορνίθων κρεοπαραγωγής μετά τη χορήγηση θυμόλης και του μικρογαλακτώματός της ως θεραπεία στο μολυσμένο κοτόπουλο με *Salmonella* Enteritidis ακόμη και με το πολυανθεκτικό στέλεχος. Η θεραπεία με έλαιο θυμόλης επιφέρει καλύτερη βελτίωση της ιστοπαθολογικής εικόνας του μολυσμένου κοτόπουλου από ό,τι το μικρογαλάκτωμα θυμόλης.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της μεταβολής της μικροχλωρίδας και της επιβίωσης του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella* Typhimurium B-62 σε κιμά κοτόπουλου που συντηρήθηκε σε αερόβιες συνθήκες υπό ψύξη (4 °C) και προήλθε από ορνίθια κρεοπαραγωγής, τα οποία πριν τη σφαγή είχαν δεχθεί διατροφική παρέμβαση με σιτηρέσιο πλούσιο σε φυτικά βιοενεργά συστατικά. Παράλληλα, στα δείγματα εφαρμόστηκε η τεχνική της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier για την ταχεία και μη επεμβατική εκτίμηση της ποιότητας του κιμά.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε κρέας από στήθος κοτόπουλου από ορνίθια κρεοπαραγωγής που εκτράφηκαν στο Εργαστήριο Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα ζώα προήλθαν από διατροφικό πείραμα 35 ημερών, στο οποίο 294 ορνίθια κρεοπαραγωγής Ross 308, είχαν κατανεμηθεί σε τρεις πειραματικές επεμβάσεις με βάση το επίπεδο της προσθήκης του μίγματος φυτικών βιοενεργών συστατικών (ΦΒΣ). Το βασικό σιτηρέσιο καταρτίστηκε με βάση τον αραβόσιτο και το σογιάλευρο. Το μίγμα φυτικών βιοενεργών συστατικών περιείχε ελιά, θυμάρι και ρίγανη. Ανάλογα με το επίπεδο της προσθήκης του μίγματος (ΦΒΣ) οι επεμβάσεις ήταν (0, 1000, 2000 mg/kg μίγμα ΦΒΣ). Ο κιμάς κοτόπουλου παρασκευάστηκε με τη χρήση μηχανής άλεσης κιμά σε ασηπτικές συνθήκες.

Ο κιμάς κοτόπουλου των τριών ομάδων [μάρτυρας (0 mg/kg), ομάδα χαμηλής ενσωμάτωσης μίγματος φυτοβιοτικού (1000 mg/kg), ομάδα υψηλής ενσωμάτωσης μίγματος φυτοβιοτικού (2000 mg/kg)] είχε συσκευαστεί σε ασηπτικές συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής σε πλαστικές σακούλες υπό κενό και είχε αποθηκευτεί σε θερμοκρασία 4° C σε μερίδες των 25 g πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

2.2 Προετοιμασία μικροβιολογικών υποστρωμάτων - Μικροβιολογικές αναλύσεις

Ο προσδιορισμός της μικροβιολογικής ποιότητας του κιμά κοτόπουλου πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας (EMBT) του ΓΠΑ με τη χρήση της κλασσικής Μικροβιολογίας. Πιο συγκεκριμένα, αντιπροσωπευτικά δείγματα των 25 g των τριών ομάδων δειγμάτων προστέθηκαν σε 225 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer σε σακούλα Stomacher και ακολούθησε ομογενοποίηση σε συσκευή Stomacher για 60 s σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις από κάθε ομάδα δειγμάτων. Για την παρασκευή των διαδοχικών αραιώσεων, ποσότητα 1 mL από τη σακούλα Stomacher μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer. Ο εμβολιασμός των τρυβλίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μη επιλεκτικού υποστρώματος PCA (Plate Count Agar), με στόχο την απαρίθμηση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (OMX). Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης και τα τρυβλία επώαστηκαν σε θερμοκρασία 25°C για 72 h. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις

πραγματοποιήθηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα (0, 24, 72, 120, 168, 240 h). Ακολούθησε η καταμέτρηση των αποικιών στα τρυβλία που περιείχαν 30-300 αποικίες.

Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την παρουσία του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella* spp. στον κιμά σύμφωνα με το πρότυπο ISO 6579-1:2017.

2.2 Μέθοδος ανίχνευσης του βακτηρίου *Salmonella* spp. σε τρόφιμα (ISO 6579-1:2017)

Η οδηγία αναφέρεται σε τρόφιμα ζωικής και φυτικής προέλευσης. Πραγματοποιήθηκε προ-εμπλουτισμός σε μη εκλεκτικό υγρό μέσο. Πιο συγκεκριμένα, 25 g δείγμα του κιμά, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, εμβολιάστηκαν σε 225 mL Buffered Peptone Water (BPW) και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 18±2 h. Την επομένη ημέρα, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός σε 10 mL Rappaport-Vassiliadis medium (RVS broth) και 10mL Muller-Kauffmann tetrathionate/novobiocin broth (MKTTn broth) με 100 µL από την καλλιέργεια που παραλήφθηκε. Ακολούθησε επώαση του RVS broth σε θερμοκρασία 41,5 °C για 24 h και του MKTTn broth σε θερμοκρασία 37 °C για 24 h. Έπειτα πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός σε τρυβλία και αναγνώριση των αποικιών. Πιο συγκεκριμένα, 10 µL από την καλλιέργεια που παραλείφθηκε, τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο Xylose- Lysine Deoxycholate (XLD agar) και 0,1 µL σε Phenol red/ brilliant green lactose sucrose agar modified. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 37 °C και εξέταση μετά από 24 h κατά την οποία επιβεβαιώθηκε απουσία *Salmonella* spp. σε 25 g κιμά κοτόπουλου στις τρεις ομάδες δειγμάτων (0, 1000, 2000 mg/kg μίγματος ΦΒΣ).

2.3 Ανανέωση μητρικών καλλιεργειών

Το βακτήριο *Salmonella* Typhimurium B-62 από τη συλλογή μικροοργανισμών του EMBT ανανεώθηκε δύο φορές σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο Total Soy Broth (TSB, 10.000, Biolife, Milan, Italy). Για το σκοπό αυτό, 100 µL από την καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε 10 mL TSB και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 24 h. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλη μια φορά και μετά τη δεύτερη ανανέωση του στελέχους, ακολούθησε έλεγχος καθαρότητας της μητρικής καλλιέργειας από επιμολύνσεις με τη μέθοδο της γραμμικής ράβδωσης (streaking) σε θρεπτικό μέσο TSA.

2.4 Εμβολιασμός κιμά με το *Salmonella Typhimurium* B-62 – Μικροβιολογικές αναλύσεις

Ο κιμάς κοτόπουλου των τριών ομάδων μίγματος φυτοβιοτικού (0, 1000, 2000 mg/kg) αφού παρέμεινε για 1 ώρα περίπου σε θερμοκρασία δωματίου μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής προκειμένου να αποψυχθεί, ενοφθαλμίστηκε με ποσότητα 100 μ L από το εναιώρημα του παθογόνου βακτηρίου και ακολούθησε ανάδευση του κιμά για την ομοιόμορφη διασπορά του εμβολίου. Στη συνέχεια, χωρίστηκε σε μερίδες των 25 g, οι οποίες συσκευάστηκαν σε πλαστικές αποστειρωμένες σακούλες υπό κενό και επωάστηκαν σε θερμοκρασία 4°C. Επαναλήφθηκε η διαδικασία για τον προσδιορισμό της μικροβιολογικής ποιότητας του κιμά κοτόπουλου με τη χρήση της κλασσικής Μικροβιολογίας, με εμβολιασμό τρυβλίων Plate Count Agar (PCA) για την καταμέτρηση της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX). Οι μικροβιολογικές αναλύσεις διεξήχθησαν τα ίδια χρονικά διαστήματα (0,24,72,120,168,240h). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε απαρίθμηση των αποικιών του βακτηρίου *Salmonella Typhimurium* B-62 με τη χρήση του επιλεκτικού υποστρώματος XLD (Xylose Deoxycholate Agar) με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης. Τα τρυβλία επωάστηκαν σε θερμοκρασία 37 °C για 24 h.

2.5 Μέτρηση pH

Η μέτρηση της τιμής του pH πραγματοποιήθηκε μετά το πέρας της μικροβιολογικής ανάλυσης με τη χρήση ψηφιακού pH-μέτρου HI2211 (HANNA instruments, RI, USA), με εμβάπτιση του ηλεκτροδίου στη σακούλα Stomacher που περιείχε την πρώτη αραιώση του ομογενοποιημένου δείγματος. Καθημερινά, πριν από τη χρήση του pH-μέτρου πραγματοποιούνταν βαθμονόμηση του οργάνου με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων με τιμή pH 4,0, 7,0 και 10,0. Η ακρίβεια του οργάνου ήταν $\pm 0,2$ μονάδες.

2.6 Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Η υπέρυθη περιοχή IR του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εκτείνεται από το τέλος του ορατού φάσματος έως την περιοχή των μικροκυμάτων, δηλαδή μεταξύ 0,7 μ m έως 300 μ m και διακρίνεται σε τρεις περιοχές: 1) το εγγύς υπέρυθρο (NIR) μεταξύ 0,8-2,5 μ m, 2) το μέσο υπέρυθρο (MIR) μεταξύ 2,5-25 μ m, 3) το άπω υπέρυθρο (FIR) φάσμα μεταξύ 25-300 μ m (Κουή και συν., 2015).

Η φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR) είναι μια τεχνική που βασίζεται στις δονήσεις των ατόμων ενός μορίου. Πιο αναλυτικά, το φάσμα υπέρυθρων που λαμβάνεται, προκύπτει από το κλάσμα

της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που απορροφάται από το δείγμα κατά την διέλευση της υπέρυθρης ακτινοβολίας από μέσα του σε μια συγκεκριμένη ενέργεια. Η υπέρυθρη ακτινοβολία καθώς προσπίπτει πάνω στο δείγμα προσφέρει ενέργεια στα μόρια του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση των δονήσεων των δεσμών του αυξάνοντας την ενέργεια σε υψηλότερες στάθμες. Η ενέργεια αυτή απεικονίζεται στο φάσμα απορρόφησης, ως κορυφή. Η κορυφή αντιστοιχεί στη συχνότητα μιας δόνησης ενός τμήματος ενός μορίου του δείγματος. Υπάρχουν ωστόσο δύο προϋποθέσεις για να συμβαίνει αυτό: 1) η ενέργεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας πρέπει να «ταιριάζει» ακριβώς στη διαφορά ενέργειας μεταξύ της θεμελιώδους και μιας διεγερμένης κατάστασης, 2) οι ενώσεις πρέπει να έχουν μεταβαλλόμενη διπολική ροπή ούτως ώστε να υπάρχει απορρόφηση στο υπέρυθρο (Κουή και συν., 2015).

Υπάρχουν διάφορα είδη δονήσεων και η φασματοσκοπία IR παρέχει πληροφορίες για τον κανονικό τρόπο δόνησης του μορίου δίνοντας πληροφορίες για την δομή. Ως κανονικός τρόπος δόνησης ορίζεται ο τρόπος με τον οποίο κάθε άτομο εκτελεί μία απλή αρμονική ταλάντωση γύρω από τη θέση ισορροπίας του. Όλα τα άτομα κινούνται σε φάση με την ίδια συχνότητα, ενώ το κέντρο βάρους του μορίου δεν κινείται (Nawrocka & Lamorsk, 2013).

Οι κύριες απορροφήσεις στο υπέρυθρο φάσμα οφείλονται σε δύο βασικές μορφές δονήσεων:

1) Δονήσεις τάσεως ή εκτατικές (stretching vibrations): πραγματοποιούνται όταν δύο συνδεδεμένα άτομα πάλλονται μεταξύ τους, μεταβάλλοντας συνεχώς την απόσταση μεταξύ τους, κατά μήκος του άξονα του δεσμού τους. Οι δονήσεις αυτές μπορεί να είναι είτε μεμονωμένες είτε συζευγμένες. Οι συζευγμένες δονήσεις διακρίνονται σε συμμετρικές και ασύμμετρες. Συμβολίζονται με το γράμμα ν.

2) Δονήσεις κάμψης (bending vibrations): χαρακτηρίζονται από συνεχή μεταβολή της γωνίας μεταξύ δύο δεσμών και συμβολίζονται με το γράμμα δ. Οι μοριακές αυτές δονήσεις κατηγοριοποιούνται σε τέσσερεις τύπους (Κουή και συν, 2015):

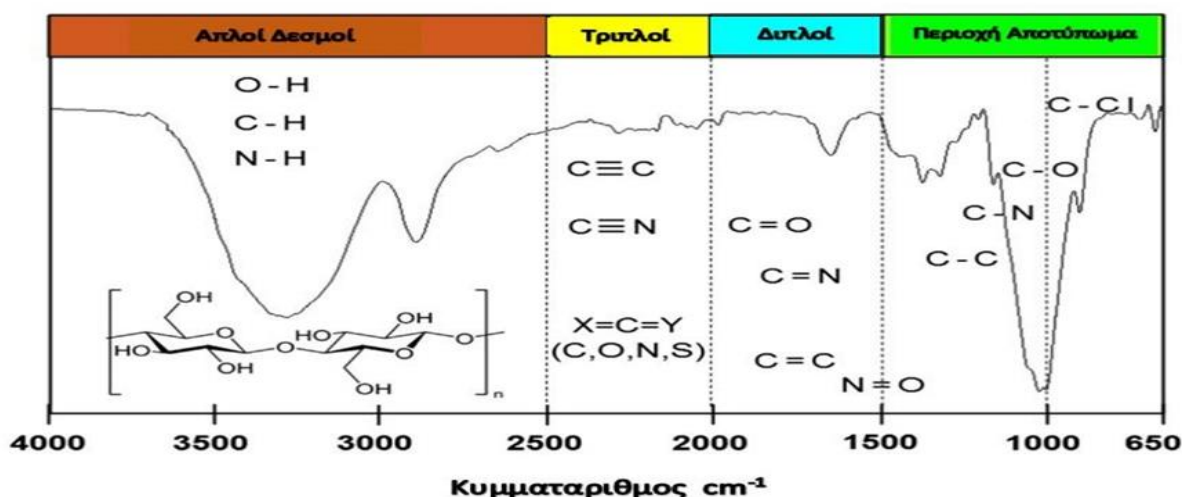
- Δονήσεις Παραμόρφωσης (scissoring or deformation): παράγονται όταν δύο άτομα που είναι συνδεδεμένα με ένα κεντρικό άτομο κινούνται εμπρός πίσω εντός του επιπέδου ισορροπίας και προς τη μεταξύ τους διεύθυνση.
- Δονήσεις Αιώρησης (rocking): συμβαίνουν όταν μία μη γραμμική δομική μονάδα τριών ατόμων δονείται εμπρός και πίσω εντός του επιπέδου ισορροπίας που σχηματίζεται από τα άτομα και τους δύο δεσμούς.
- Δονήσεις Σείσης (wagging): παράγονται όταν μία μη γραμμική δομική μονάδα τριών ατόμων δονείται εκτός του επιπέδου ισορροπίας που σχηματίζεται από τα άτομα και τους δύο δεσμούς.

- Δονήσεις Συστροφής (twisting): λαμβάνουν χώρα όταν μία δομική μονάδα τριών ατόμων συστρέφεται γύρω από τον δεσμό σύνδεσης με το υπόλοιπο τμήμα του μορίου εκτός του επιπέδου ισορροπίας.

Στη φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου (Mid-infrared spectroscopy, MIR) ειδικότερα, μέσω των δονήσεων των μορίων μπορεί να παρέχονται πληροφορίες σχετικά με τη χημική δομή και την λειτουργικότητα ενώ χρησιμεύσει και ως εργαλείο ποσοτικής ανάλυσης. Για το λόγο αυτό, θεωρείται ιδιαίτερα πολύτιμη τεχνική τόσο για την έρευνα που σχετίζεται με τα τρόφιμα όσο και για σκοπούς ποιοτικού ελέγχου στην βιομηχανία τροφίμων. Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) χρησιμοποιείται συχνότερα για την ανάλυση του μέσου υπερύθρου (Nawrocka & Lamorsk, 2013). Το FTIR έχει ευέλικτα πεδία εφαρμογών διότι είναι μια γρήγορη, εύκολη στη χρήση και οικονομικά αποδοτική τεχνική ενώ ταυτόχρονα δεν απαιτεί χημικά αντιδραστήρια (Bruyne et al., 2017). Μερικοί από τους γνωστούς τομείς είναι οι ακόλουθοι (Dutta, 2017):

- Ανάλυση νανοϋλικών
- Στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών για τον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο (που μπορεί να περιλαμβάνουν πρόσθετα, συντηρητικά και χρωστικές ουσίες)
- Στον τομέα της περιβαλλοντικής έρευνας
- Στον επιστημονικό χώρο της αρχαιολογική έρευνας
- Εγκληματολογική επιστήμη: χρώματα, υφάσματα και καλλυντικά
- Ανάλυση ημιαγωγών
- Φαρμακευτικά προϊόντα
- Στις ιατρικές επιστήμες
- Στον τομέα της επιστήμης και τεχνολογίας των πολυμερών: πολυμερή, πίνιακες και φιλμ
- Γεωλογικά δείγματα (ανάλυση πολύτιμων λίθων)

Την τελευταία δεκαετία αναπτύχθηκε σημαντικά το πεδίο της φασματοσκοπίας υπέρυθρων μετασχηματισμού Fourier (FTIR) αφού εξασφαλίζει εύκολες, γρήγορες και αντικειμενικές διαγνώσεις. Η φασματοσκοπία FTIR μελετά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ύλης και ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τη μορφή φάσματος. Το FTIR ανιχνεύει μεμονωμένες ζώνες ή ομάδες για να προσδιορίσει με ακρίβεια τις μοριακές διαμορφώσεις, τους τύπους δεσμών, τις λειτουργικές ομάδες και τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που συνθέτουν το δείγμα, προσδιορίζοντας την «ταυτότητα» του. Κάθε μόριο έχει ένα δακτυλικό αποτύπωμα φάσματος που το καθιστά μοναδικό και του επιτρέπει να διακρίνεται από άλλα μόρια (Fadlelmoula et al., 2022). Το φάσμα του μέσου υπερύθρου καλύπτει το εύρος των 2.500-25.000 nm ή 400-4.000 cm^{-1} .



Εικόνα 2.6.1: Τροποποιημένη απεικόνιση από τυπικό φάσμα υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier ανά περιοχή (Mohamed *et al.*, 2017).

Ο κυματαριθμός ($\tilde{\nu}$) ορίζεται ως το μέγεθος που χρησιμοποιείται για λόγους ευκολίας έναντι της συχνότητας (f) ή του μήκους κύματος (λ) κατά την περιγραφή ενός φάσματος. Το μήκος κύματος του συγκεκριμένου τμήματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας βρίσκεται μεταξύ 2,5 – 50 μm ή συχνότητες από $1,2 \cdot 10^{14}$ έως $6,0 \cdot 10^{11} \text{ Hz}$ και αντιστοιχεί σε κυματαριθμούς από 4,000 έως 200 cm^{-1} . Η σχέση που συνδέει αυτά τα μεγέθη είναι η εξής:

$$\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\mu\text{m})} \cdot 10^4 = \frac{f(\text{Hz})}{c(\text{cm/s})} \quad (2.6)$$

όπου c είναι η ταχύτητα του φωτός σε cm/s .

Στην πρώτη ζώνη στα ($4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$), εντοπίζονται οι απλοί δεσμοί (O-H, C-H, N-H). Στην δεύτερη ζώνη στα ($2500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$) εντοπίζονται οι τριπλοί δεσμοί ($\text{C}\equiv\text{C}$ και $\text{C}\equiv\text{N}$) και στην τρίτη ζώνη στα ($2000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) εντοπίζονται οι διπλοί δεσμοί ($\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{O}$ και $\text{C}=\text{N}$).

Σύμφωνα με τους Σινάνογλου και συν. (2017) οι απορροφήσεις στην περιοχή 4000 έως 2000 cm^{-1} αφορούν τις χαρακτηριστικές ομάδες. Τέλος η τέταρτη ζώνη στα ($1500 - 600 \text{ cm}^{-1}$) αποτελεί τη ζώνη του «δακτυλικού αποτυπώματος» και συνδέεται κυρίως με τις δονήσεις κάμψης και σκελετού (Mohamed *et al.*, 2017).

Οι ζώνες του FTIR με τους τυπικούς χημικούς δεσμούς αντιστοιχούν σε δονήσεις που σχετίζονται με τα κύρια συστατικά των τροφίμων όπως το νερό, οι πρωτεΐνες, τα λιπαρά οξέα και οι υδατάνθρακες (Nawrocka & Lamorska, 2013). Πιο αναλυτικά περιγράφονται στον Πίνακα 2.6.1.

Πίνακας 2.6.1 Οι δονήσεις που σχετίζονται οι ζώνες του FTIR

Κυματαριθμός (cm ⁻¹)	Δονήσεις	Βιβλιογραφία
3610-3670	Χαμηλές δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ του OH και συνδέεται με αλκοόλες και φαινόλες	(Beć et al., 2020)
3600-3200	έντονες δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ του OH και συνδέεται με το νερό	(Stuart, 2004)
3500-3560	χαμηλές δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ του O-H και συνδέεται με λιπαρά οξέα	(Beć et al., 2020)
3190-3170	έντονες δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ N-H από πρωτογενές αμίδιο των πρωτεϊνών	(Stuart, 2004)
3100-2800	έντονες δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ C-H που συνδέονται με λιπαρά οξέα	(Stuart, 2004)
2780	έντονες δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ N-CH ₂ που συνδέονται με τριτοταγείς αμίνες πρωτεϊνών	(Stuart, 2004)
2800-2500	έντονες δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ O-H που συνδέονται με λιπαρά οξέα και δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ N-H που συνδέονται με πρωτοταγείς αμίνες πρωτεϊνών	(Stuart, 2004)
2400-2250	έντονες δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ O-H που συνδέονται με το διοξείδιο του άνθρακα CO ₂ .	
2200-2300	ανιχνεύονται έντονες δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ C≡N που συνδέεται με νιτρίλια και λιπαρά οξέα	(Dutta, 2017)
2140-1990	έντονες δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ R-N=C=S που συνδέεται με οποιαδήποτε ένωση έχει στο μόριο της N και S.	(Beć et al., 2020)
1800-1400	δονήσεις κάμψης (δ) N-H, και δονήσεις έκτασης (ν) C-N που οφείλονται σε πεπτίδια και πρωτεΐνες.	(Stuart, 2004)
1700-1600	εκτεταμένης δόνησης έκτασης (ν) C=O της αμιδικής ομάδας του αμίδιου I	(Stuart, 2004)
1550-1450	εκτείνεται η ζώνη του αμίδιου II	(Stuart, 2004)
1742	δονήσεις έκτασης (ν) δεσμών C=O που εντοπίζονται σε ομάδες εστέρων των λιπαρών οξέων.	(Stuart, 2004)
1800-2000	δεσμοί δονήσεις έκτασης (ν) C=O, C=C, C=N που εντοπίζονται στις αζωτούχες βάσεις των νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA)	(Stuart, 2004)
2000-1200	δονήσεις κάμψης (δ) των λειτουργικών ομάδων CH ₂ και CH ₃ που ανήκουν σε ομάδες πρωτεϊνών και λιπαρών οξέων που έχουν φώσφορο στο μόριο τους	(Stuart, 2004)
1300-1230	δονήσεις έκτασης (ν) C-N και δονήσεις κάμψης (δ) N-H που βρίσκονται στη ζώνη του αμίδιου III.	(Nawrocka & Lamorska, 2013)
1250-1000	δονήσεις τάσης που οφείλονται στην παρουσία PO ₂ -στον σκελετού των νουκλεϊκών οξέων καθώς και των δονήσεων έκτασης (ν) C-O	(Stuart, 2004)
1000-400	δονήσεις από αμινοξέα των νουκλεϊκών οξέων που φέρουν δακτύλιο στο μόριο τους	(Stuart, 2004)

2.6.2 Εφαρμογή του FTIR

Για τη φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectrometry, ATR-FTIR), χρησιμοποιήθηκε κρύσταλλος ZnSe 45° HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance) (PIKE technologies, Madison, WI, USA) με δείκτη διάθλασης 2,4 και βάθος διείσδυσης 2,0 μm στα 1000 cm^{-1} , καθώς και φασματόμετρο τύπου FTIR-6200 JASCO (Jasco Corp., Tokyo, Japan), εξοπλισμένο με ανιχνευτή TGS (θειϊκή τριγλυκίνη) και με διαχωριστή δέσμης Ge/KBr. Το φασματοφωτόμετρο λειτουργούσε με το λογισμικό Manager™ Code of Federal Regulations (CFR) version 2 (Jasco Corp.), μεταξύ των κυματαριθμών 4000-400 cm^{-1} και η κάθε μέτρηση διαρκούσε 2 λεπτά. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο FTIR για την καταγραφή του φάσματός τους. Συγκεκριμένα, το κάθε δείγμα κιμά κοτόπουλου τοποθετήθηκε ομοιόμορφα και με ήπιες κινήσεις με τη χρήση σπάτουλας στην επιφάνεια του κρυστάλλου. Εν συνεχεία, ο κρύσταλλος με το δείγμα τοποθετήθηκε στην κατάλληλη υποδοχή του οργάνου για να ληφθεί το φάσμα. Πριν από τη μέτρηση των δειγμάτων και μεταξύ των μετρήσεων λαμβάνονταν το φάσμα αναφοράς (background) χρησιμοποιώντας τον καθαρό κρύσταλλο χωρίς δείγμα. Μετά από κάθε μέτρηση, η επιφάνεια του κρυστάλλου καθαριζόταν με σαπούνι, ξεπλένονταν με απιονισμένο νερό και ακετόνη και αφήνονταν να στεγνώσει πριν επαναχρησιμοποιηθεί. Συνολικά λήφθηκαν 36 φάσματα για κάθε δείγμα με την πραγματοποίηση τριών επαναλήψεων (108 φάσματα συνολικά).



Εικόνα 2.6.2: Όργανο FTIR-6200 JASCO

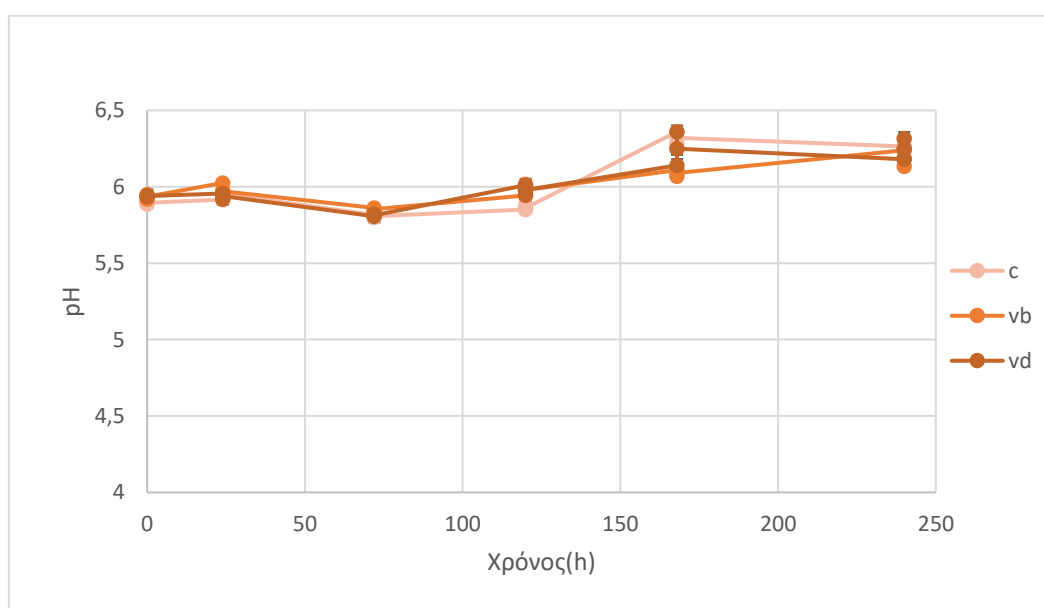
2.7 Στατιστική ανάλυση

Η γραφική απεικόνιση των πειραματικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Microsoft Excel ver. 2010 (Microsoft Corporation, Washington, USA). Επίσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση της διακύμανσης (One-Way Analysis of Variance) για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών παραμέτρων που μετρήθηκαν (OMX, τιμή pH, πληθυσμός *Salmonella* spp.) μεταξύ των τριών ομάδων συγκέντρωσης του μίγματος φυτοβιοτικού. Η σύγκριση των μέσων όρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Ο έλεγχος ανάλυσης της διακύμανσης πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Statgraphics Centurion XVII, ver. 17.2.00 (Statpoint Technologies, Inc., The Plains, Virginia, USA).

3. Αποτελέσματα και συζήτηση

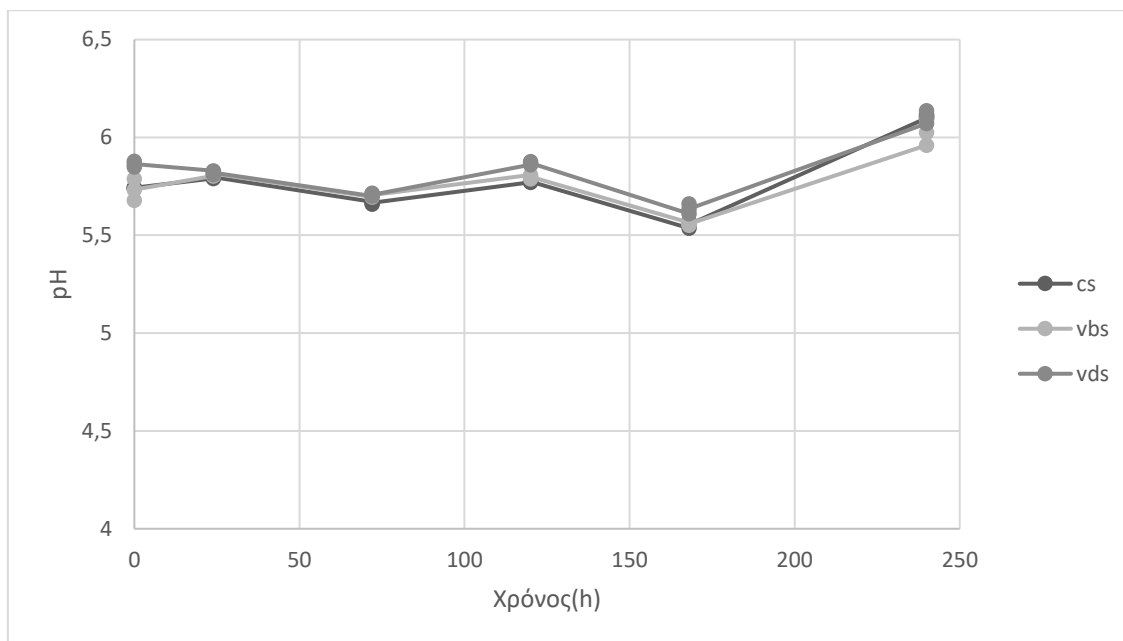
3.1 Μέτρηση pH

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του pH παρουσιάζονται στα Γραφήματα 3.1.1-3.1.2. Σε κάθε χρονική στιγμή, η κάθε ομάδα δειγμάτων αναλύθηκε πριν και μετά τον εμβολιασμό με τη *Salmonella Typhimurium* B-62 προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση του σιτηρεσίου στην επιβίωση του παθογόνου βακτηρίου. Σε κάθε χρονική στιγμή συγκρίθηκαν οι μέσοι όροι του μάρτυρα (απουσία μίγματος φυτοβιοτικού), της ομάδας με τη χαμηλή συγκέντρωση (1000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού) και της ομάδας με την υψηλή συγκέντρωση (2000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού).



Γράφημα 3.1.1: Μεταβολή της τιμής του pH κατά τη συντήρηση κιμά κοτόπουλου σε θερμοκρασία 4° C με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων μίγματος φυτοβιοτικού (c: μάρτυρας, vb: 1000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού , vd: 2000mg / kg μίγματος φυτοβιοτικού). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων $\pm$ τυπική απόκλιση.

Στο Γράφημα 3.1.1 παρουσιάζεται η μεταβολή της τιμής του pH πριν τον εμβολιασμό των δειγμάτων. Οι τιμές του pH κατά την έναρξη της συντήρησης του κιμά κοτόπουλου κυμαίνονται μεταξύ 5,8-6,3. Πιο συγκεκριμένα, για το χρονικό διάστημα 0-72 h δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στο pH μεταξύ των τριών ομάδων επεμβάσεων. Από το χρονικό αυτό σημείο (72 h) και μέχρι το τέλος της συντήρησης (240 h) παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της τιμής του pH, που κυμάνθηκε μεταξύ 6,18 και 6,31 χωρίς να παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων.



Γράφημα 3.1.2 Μεταβολή της τιμής του pH κατά τη συντήρηση κιμά κοτόπουλου σε θερμοκρασία 4° C με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων μίγματος φυτοβιοτικού μετά την επιμόλυνση με το βακτήριο *Salmonella Typhimurium* B62 (cs: μάρτυρας, vbs: 1000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού, vds: 2000 mg / kg μίγματος φυτοβιοτικού). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων $\pm$ τυπική απόκλιση.

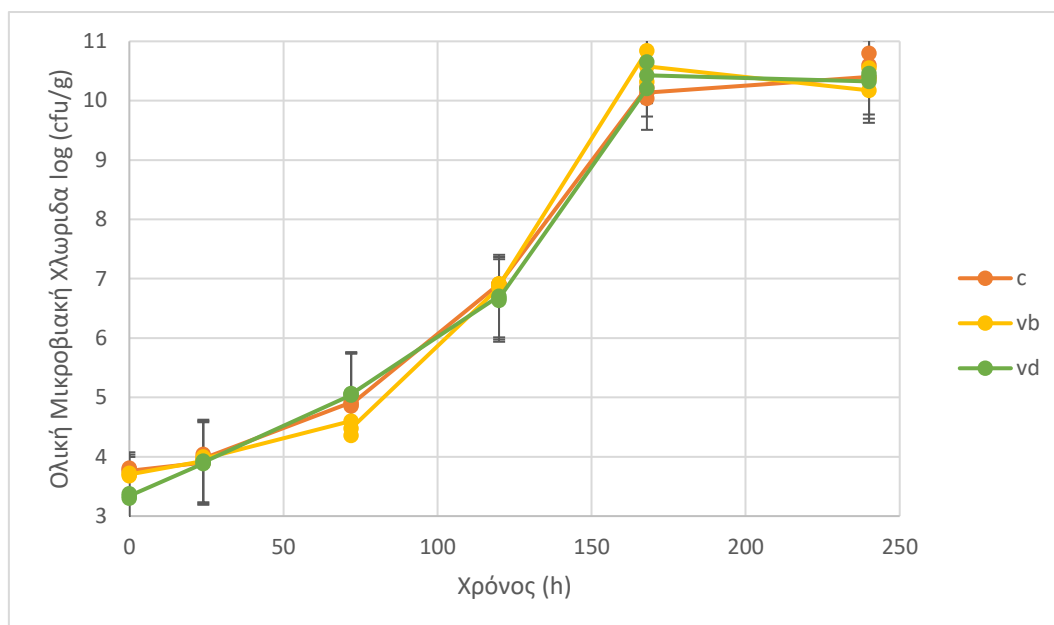
Στο Γράφημα 3.1.2 παρουσιάζεται η μεταβολή της τιμής του pH μετά τον εμβολιασμό των δειγμάτων. Οι τιμές του pH κατά την έναρξη της συντήρησης του κιμά κοτόπουλου κυμαίνονται μεταξύ 5,7-5,85. Κατά το χρονικό διάστημα 0-120 h δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μεταβολή του pH μεταξύ των τριών ομάδων διαφορετικών επεμβάσεων. Μάλιστα κατά τις χρονικές στιγμές 24, 72 h δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στο pH μεταξύ των τριών ομάδων των επεμβάσεων. Από το χρονικό διάστημα (168 h) μέχρι το τέλος της συντήρησης (240 h) παρατηρήθηκε μία μεταβολή που κυμάνθηκε μεταξύ του 5,5-6,1 χωρίς να παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών διατροφικών επεμβάσεων.

Σύμφωνα με τα Γραφήματα 3.1.1- 3.1.2 μπορούμε να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι η προσθήκη των φυτικών βιοενεργών συστατικών δεν επιδρά σημαντικά στη μεταβολή της τιμής του pH του κιμά κοτόπουλου.

3.2 Μικροβιολογική Ανάλυση

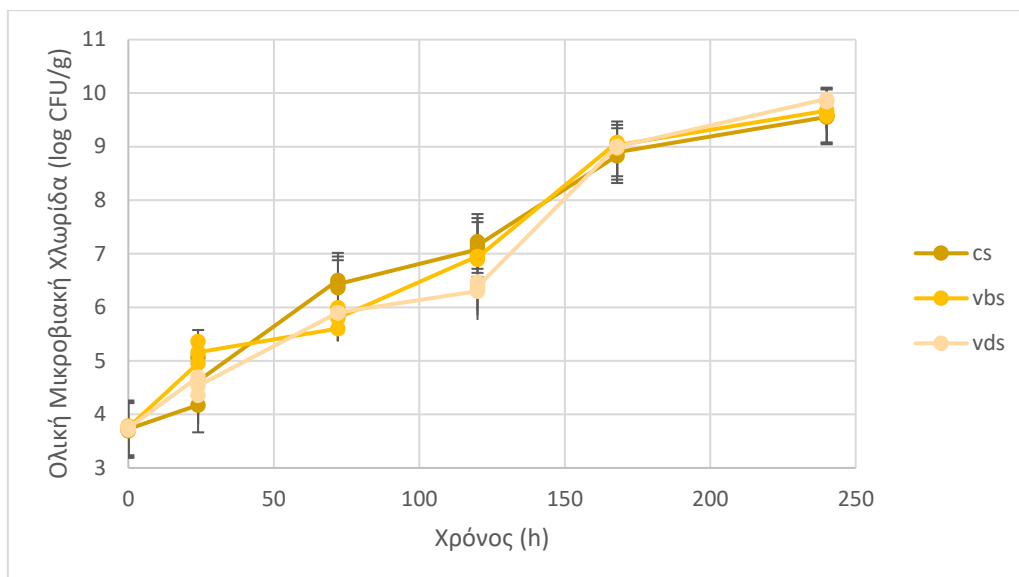
Τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας όπως και της *Salmonella Typhimurium* B-62 παρουσιάζονται στα Γραφήματα 3.2.1-3.2.3. Σε κάθε χρονική στιγμή η κάθε ομάδα δειγμάτων αναλύθηκε πριν και μετά τον εμβολιασμό με το παθογόνο βακτήριο *Salmonella Typhimurium* B-62 εξετάζοντας τη διαφοροποίηση των δειγμάτων. Σε κάθε χρονική στιγμή συγκρίθηκαν οι μέσοι όροι του μάρτυρα (c), της ομάδας

με τη χαμηλή συγκέντρωση (1000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού) και της ομάδας με την υψηλή συγκέντρωση (2000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού).



Γράφημα 3.2.1 Μεταβολή του πληθυσμού της OMX κατά τη συντήρηση κιμά κοτόπουλου σε θερμοκρασία 4°C με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων μίγματος φυτοβιοτικού (c: μάρτυρας, vb: 1000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού, vd: 2000 mg / kg μίγματος φυτοβιοτικού). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

Στο Γράφημα 3.2.1 παρουσιάζεται η μεταβολή της OMX στα δείγμα κιμά κοτόπουλου κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη σε αερόβιες συνθήκες. Παρατηρούμε ότι κατά την έναρξη της συντήρησης, ο πληθυσμός της OMX κυμάνθηκε από 3,3-3,7 log CFU/g και παρουσίασε ταχεία αύξηση μέχρι την 168^η ώρα συντήρησης, φτάνοντας το μέγιστο πληθυσμό (10,2-10,8 log CFU/g). Από το χρονικό αυτό σημείο και μέχρι το τέλος της συντήρησης (240 h) ο πληθυσμός της OMX παρέμεινε αμετάβλητος και κυμάνθηκε στα ίδια περίπου επίπεδα (10,3-10,8 log CFU/g). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις μίγματος φυτοβιοτικού στον κιμά δε φαίνεται να επηρέασαν το προφίλ αύξησης της OMX που ήταν παρόμοιο για όλους τους χειρισμούς, παρά το γεγονός ότι η στατιστική ανάλυση έδειξε σημαντικές διαφορές στο χρόνο 0, 71 και 120 h. Οι διαφορές στους πληθυσμούς της OMX στα συγκεκριμένα χρονικά σημεία είναι της τάξης 0,4-0,5 log CFU/g και ενώ μπορεί από τη ανάλυση της διακύμανσης να σηματοδοτούν στατιστικά σημαντικές διαφορές, εντούτοις από τη μικροβιολογική σκοπιά δεν δείχνουν σημαντική (με τη βιολογική έννοια) επίδραση των φυτοβιοτικών στη μεταβολή του πληθυσμού της OMX σε σχέση με το μάρτυρα.

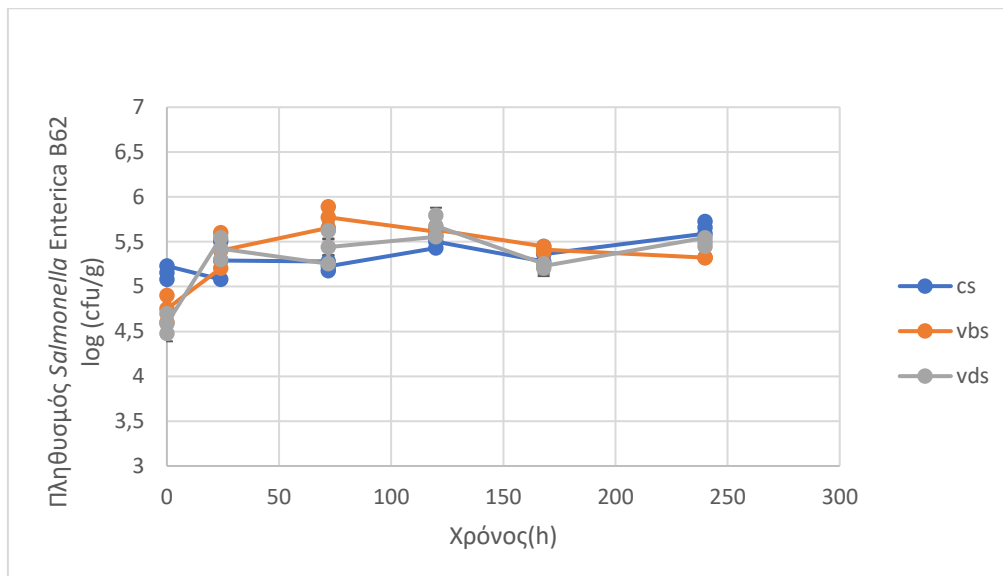


Γράφημα 3.2.2 Μεταβολή του πληθυσμού της OMX κατά τη συντήρηση κιμά κοτόπουλου σε θερμοκρασία 4° C με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων μίγματος φυτοβιοτικού μετά την επιμόλυνση με το βακτήριο *Salmonella Typhimurium* B62 (cs: μάρτυρας, vbs: 1000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού, vds: 2000 mg / kg μίγματος φυτοβιοτικού). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων $\pm$ τυπική απόκλιση.

Στο Γράφημα 3.2.2 παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού της OMX σε δείγματα κιμά κοτόπουλου μετά από επιμόλυνση με το βακτήριο *Salmonella Typhimurium* B-62. Ο πληθυσμός της OMX στην έναρξη της συντήρησης ήταν 3,7 log CFU/g, χωρίς να παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων μίγματος φυτοβιοτικού και στη συνέχεια παρουσίασε σταδιακή αύξηση μέχρι το τέλος της συντήρησης (240 h) που κυμάνθηκε μεταξύ 9,6-9,8 log CFU/g. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε κάθε χρονικό σημείο της συντήρησης, ο πληθυσμός της OMX ήταν μικρότερος συγκριτικά με τον αντίστοιχο πληθυσμό στα δείγματα κιμά κοτόπουλου που δεν είχαν επιμολυνθεί με το παθογόνο βακτήριο, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί σε φαινόμενα ανταγωνισμού μεταξύ της OMX και του παθογόνου βακτηρίου, που συνέβαλαν στη διατήρηση χαμηλότερου πληθυσμού της OMX. Ακολούθως, στο Γράφημα 3.2.3 παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella Typhimurium* B-62 σε δείγματα κιμά κοτόπουλου. Ο πληθυσμός του βακτηρίου στην έναρξη της συντήρησης κυμάνθηκε από 4,5-5,2 log CFU/g, παρουσιάζοντας διαφοροποίηση της τάξεως 0,3-0,5 log CFU/g μεταξύ των δειγμάτων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις μίγματος φυτοβιοτικού. Ακολούθησε αύξηση του πληθυσμού κατά την 24^η ώρα μέχρι και την 120^η ώρα φτάνοντας στο μέγιστο πληθυσμό (5,6-5,8 log CFU/g) και ακολούθησε μία σταθεροποίηση του πληθυσμού μέχρι το τέλος της συντήρησης με πληθυσμό 5,5 log CFU/g. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις μίγματος φυτοβιοτικού στον κιμά δε φαίνεται να επηρέασαν του πληθυσμού του παθογόνου βακτηρίου

που ήταν παρόμοιοι για όλους τους χειρισμούς, παρά το γεγονός ότι η στατιστική ανάλυση έδειξε σημαντικές διαφορές στο χρόνο 0, 72 h.

Οι διαφορές στους πληθυσμούς του βακτηρίου *Salmonella* Typhimurium B-62 στα συγκεκριμένα χρονικά σημεία είναι της τάξης 0,3-0,5 log CFU/g ωστόσο οι συγκεκριμένες μεταβολές δεν επηρεάζουν από μικροβιολογικής απόψεως τον κιμά κοτόπουλου.



Γράφημα 3.2.3 Μεταβολή του πληθυσμού του βακτηρίου *Salmonella* Typhimurium κατά τη συντήρηση κιμά κοτόπουλου σε θερμοκρασία 4° C με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων μίγματος φυτοβιοτικού μετά την επιμόλυνση με το βακτήριο *Salmonella* Typhimurium B-62 (cs: μάρτυρας, vbs: 1000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού, vds: 2000 mg/kg μίγματος φυτοβιοτικού). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων $\pm$ τυπική απόκλιση.

3.3 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων μικροβιακής ανάπτυξης

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι κινητικές παράμετροι της OMX στα δείγματα με/χωρίς επιμόλυνση με το παθογόνο βακτήριο *Salmonella* Typhimurium B-62, το πρωτογενές μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994) προσαρμόστηκε στα πειραματικά δεδομένα προκειμένου να προσδιοριστεί η διάρκεια της φάσης προσαρμογής (lag phase), ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ($\mu_{\max}$), ο αρχικός (N_0) και τελικός πληθυσμός ($N_{\max}$) στη στατική φάση. Τα αποτελέσματα της προσαρμογής παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.1, από τον οποίο προκύπτει ότι το μοντέλο προσαρμόστηκε ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα, με βάση τις μικρές τιμές του τυπικού σφάλματος προσαρμογής ($SE\text{-fit} < 0,5$) και τις υψηλές τιμές του συντελεστή προσδιορισμού ($R^2 > 0,96$). Αναφορικά με τη σύγκριση των τιμών των κινητικών παραμέτρων μεταξύ των διάφορων χειρισμών προκύπτει ότι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης της OMX είναι μεγαλύτερος στα δείγματα κιμά κοτόπουλου που δεν είχαν εμβολιστεί με το παθογόνο βακτήριο, γεγονός που δείχνει την παρουσία ανταγωνισμού μεταξύ της αυτόχθονης μικροχλωρίδας του κιμά κοτόπουλου και του παθογόνου βακτηρίου, που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού αύξησης της OMX.

Πίνακας 3.3.1 Κινητικές παράμετροι της OMX κατά τη συντήρηση κιμά κοτόπουλου σε θερμοκρασία 4° C με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων μίγματος φυτοβιοτικού πριν και μετά από την επιμόλυνση με το βακτήριο *Salmonella Typhimurium* B-62.

Δείγμα	lag (h)	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	No (log CFU/g)	Nend (log CFU/g)	SE(fit)	R ²
C	27,4	0,036	4,0	10,6	0,251	0,992
Cs	-	0,030	3,8	9,63	0,295	0,982
Vb	31,9	0,029	4,1	10,4	0,285	0,990
Vbs	-	0,024	3,9	9,7	0,387	0,967
Vd	8,8	0,034	3,8	10,5	0,504	0,970
Vds	-	0,026	3,8	9,8	0,447	0,961

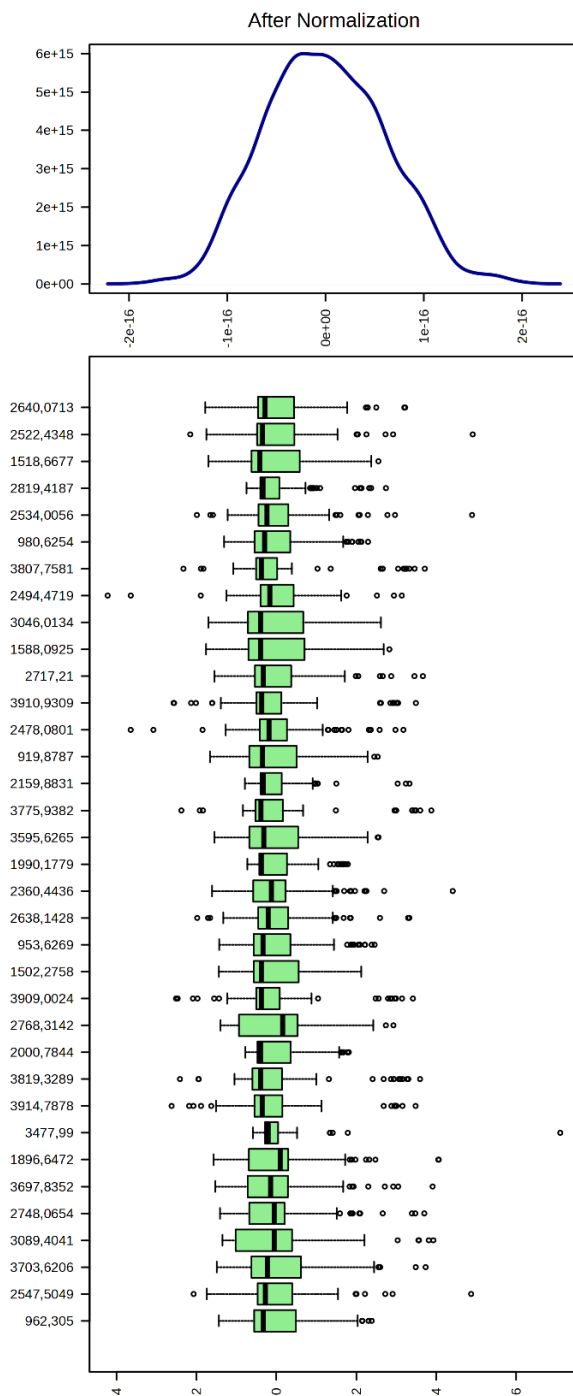
Πριν την επιμόλυνση με το βακτήριο *Salmonella Typhimurium* C: απουσία μίγματος φυτοβιοτικού , VB: 1000 mg/ Kg μίγμα φυτοβιοτικό, VD: 2000 mg/ Kg μίγμα φυτοβιοτικό. Μετά την επιμόλυνση με το βακτήριο *Salmonella Typhimurium*: Cs: απουσία μίγματος φυτοβιοτικού , VBs: 1000 mg/ Kg μίγμα φυτοβιοτικό, VDs: 2000 mg/ Kg μίγμα φυτοβιοτικό

3.4 Ανάλυση της φασματοσκοπίας υπεράυθρου με μετασχηματισμό Fourier

3.4.1 Διαχωρισμός των δειγμάτων του μάρτυρα από τα δείγματα που δέχθηκαν διατροφική επέμβαση

Τα δείγματα από το FTIR επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Metaboanalyst version 6.0, το οποίο αποτελεί μία διαδικτυακή πλατφόρμα που χρησιμοποιείται για ολοκληρωμένη ανάλυση και ερμηνεία δεδομένων και επιτρέπει την ανάλυση χημειομετρικών δεδομένων με μεγάλο πλήθος ανεξάρτητων μεταβλητών (Pang et al., 2021).

Τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες (μάρτυρας και διατροφική επέμβαση περιλαμβάνοντας τις δύο συγκεντρώσεις του μίγματος φυτοβιοτικού) με κριτήριο τη διατροφή των ορνίθων. Σκοπός της ανάλυσης ήταν η διερεύνηση της ικανότητας της φασματοσκοπίας FTIR στο διαχωρισμό των δειγμάτων που είχαν δεχθεί διατροφική επέμβαση ανεξαρτήτως της ποσότητας των φυτικών βιοενεργών συστατικών, συγκριτικά με τον μάρτυρα που δεν είχε δεχθεί αντίστοιχη επέμβαση. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε όλη η περιοχή φάσματος από τους κυματαριθμούς 900 έως 4000 cm⁻¹. Τα δεδομένα αποθηκεύτηκαν υπό μορφή πίνακα, όπου κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα δείγμα και κάθε στήλη σε έναν κυματαριθμό του φάσματος.

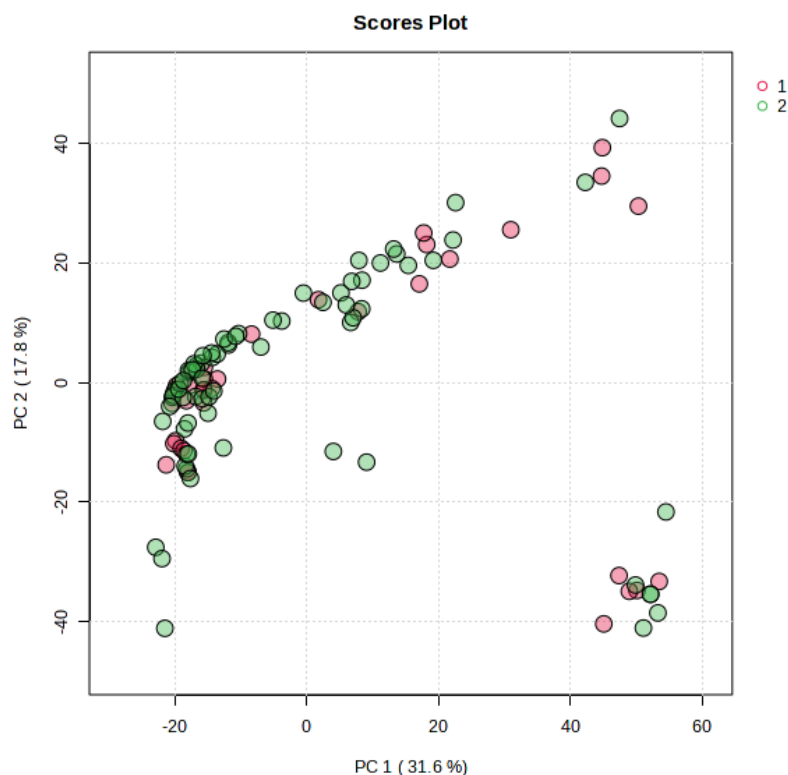


Αρχικά πραγματοποιήθηκε προεπεξεργασία των φασμάτων για την κανονικοποίηση των δειγμάτων. Το βήμα αυτό θεωρείται απαραίτητο προκειμένου να διερευνηθεί εάν τα δείγματα ακολουθούν κανονική κατανομή. Η προεπεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο κλιμάκωσης Pareto, όπου από κάθε μέτρηση αφαιρείται ο μέσος όρος (mean centering) και το αποτέλεσμα διαιρείται με την τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης (s). Έτσι, τα δεδομένα παραμένουν πιο κοντά στις τιμές των αρχικών μετρήσεων (Βαλάση, 2022). Στο Διάγραμμα 3.4.1.1 παρουσιάζονται οι κανονικοποιημένες τιμές μετά την εφαρμογή του μετασχηματισμού Pareto.

Διάγραμμα 3.4.1.1 : Μετασχηματισμός δεδομένων με τη μέθοδο Pareto

Στη συνέχεια ακολούθησε Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (PCA) για το διαχωρισμό των δειγμάτων των δύο ομάδων. Η ανάλυση αυτή αποτελεί έναν πολυπαραγοντικό τύπο ανάλυσης (Multivariate analysis) χωρίς

επίβλεψη (Unsupervised). Αυτό σημαίνει πως ο αλγόριθμος προσπαθεί να ομαδοποιήσει τα δείγματα χωρίς να υπάρχει προηγούμενη γνώση για την κατηγορία στην οποία ανήκουν.



Διάγραμμα 3.4.1.2 : Γράφημα διασποράς των δύο κύριων συνιστωσών με βάση τις τιμές των δειγμάτων για τη διάκριση των δύο ομάδων (1): Μάρτυρας , (2): VB+VD

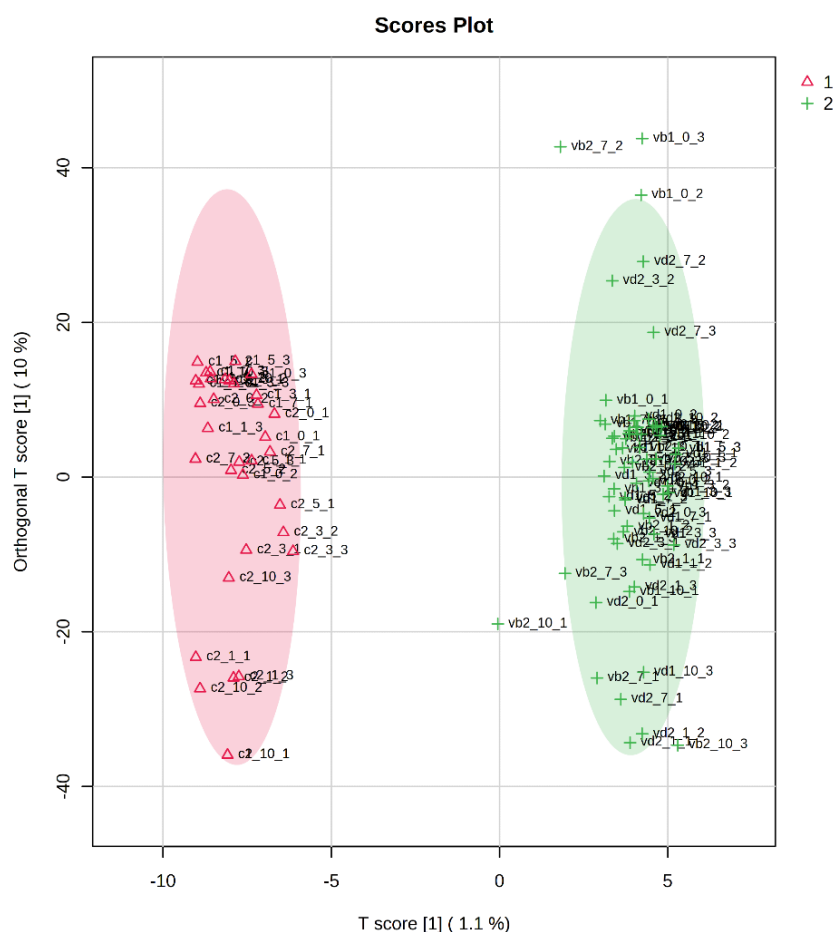
Το Διάγραμμα 3.4.1.2 παρουσιάζει τη διασπορά των δειγμάτων χωρίς διατροφική επέμβαση (μάρτυρας) και με τη διατροφική επέμβαση ανεξάρτητα της συγκέντρωσης των φυτικών βιοενεργών συστατικών, στο επίπεδο των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών(PC1 και PC2). Παρατηρούμε ότι οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες εξηγούν αθροιστικά ποσοστό 49,4% της παραλλακτικότητας των δεδομένων, χωρίς όμως να υπάρχει εμφανής διαχωρισμός μεταξύ των δύο κατηγοριών.

Προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των δειγμάτων επιλέχθηκε η ανάλυση Ortho-PLSDA που είναι ένας πολυπαραγοντικός τύπος ανάλυσης με επίβλεψη, στον οποίο είναι γνωστή εκ των προτέρων η κλάση στην οποία ανήκει κάθε δείγμα.

Στο Διάγραμμα 3.4.1.3 εμφανίζεται ο διαχωρισμός των δύο ομάδων μαζί με το διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Το Ortho-PLSDA εισήχθη για τη βελτίωση της μεθόδου PLS-DA για τη διάκριση δύο ή περισσότερων ομάδων χρησιμοποιώντας δεδομένα πολλαπλών μεταβλητών (Bylesjo et al. 2006, Trygg & Wold 2002). Στο Ortho-PLSDA υπολογίζεται ένα μοντέλο παλινδρόμησης μεταξύ των πολυμεταβλητών δεδομένων απόκρισης που περιέχει μόνο πληροφορίες κλάσης. Το πλεονέκτημα του OPLS-DA σε σύγκριση με το PLS-DA είναι ότι ένα μεμονωμένο στοιχείο

Scores Plot



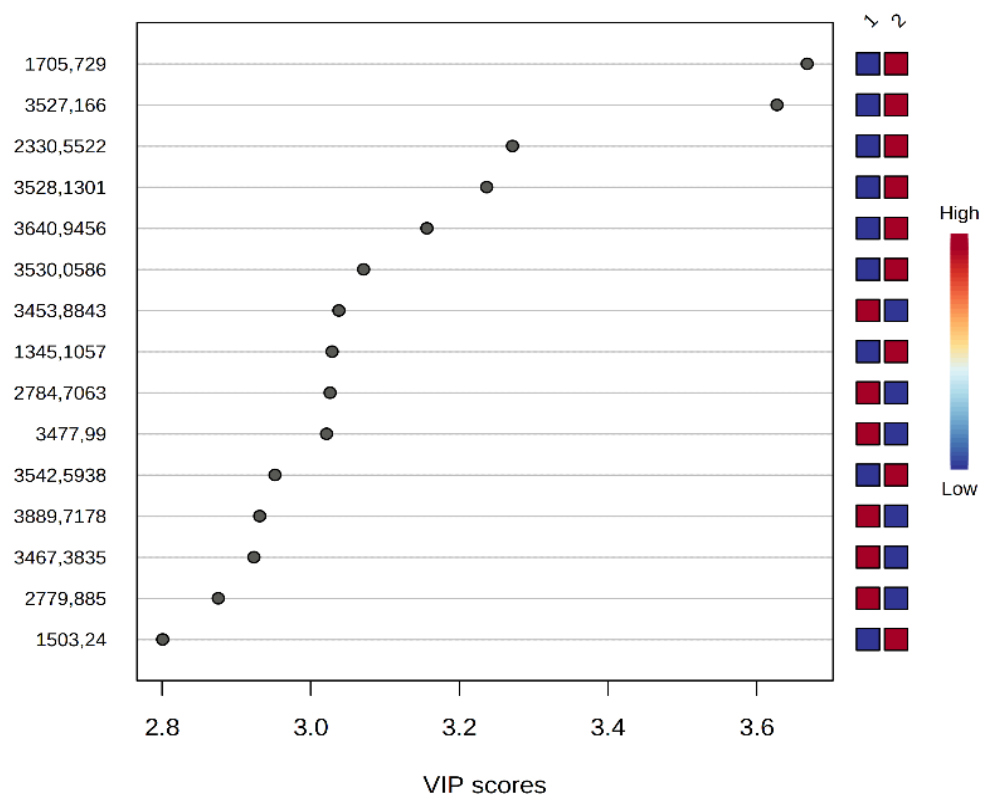
Διάγραμμα 3.4.1.3:Απεικόνιση της ανάλυσης Ortho-PLSDA 2D scores plot για τη διάκριση των δύο ομάδων (1) μάρτυρας (2) δείγματα διατροφικής επέμβασης VB+VD.

Στο Διάγραμμα 3.4.1.3 παρουσιάζεται η γραφική παράσταση της ανάλυσης Ortho-PLSDA των δειγμάτων χωρίς διατροφική επέμβαση (μάρτυρας) και με διατροφική επέμβαση ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης των φυτικών βιοενεργών συστατικών. Παρατηρούμε ότι η γραφική παράσταση εξηγεί το 11,1% της παραλλακτικότητας των δεδομένων, επιτυγχάνοντας σαφή διαχωρισμό των δειγμάτων στις δύο κατηγορίες. Ωστόσο, ορισμένα σημεία (vb2-7-2, vb1-0-3, vb1-0-2, vb2-10-1, vb2-10-3) από την ομάδα της διατροφικής επέμβασης βρίσκονται εκτός του 95% διαστήματος εμπιστοσύνης. Πιο συγκεκριμένα, αυτές οι τιμές αφορούν στα δείγματα με τη χαμηλότερη ενσωμάτωση του μίγματος φυτικών βιοενεργών συστατικών (1000 mg/kg φυτοβιοτικό).

Παραμένοντας στον ίδιο τρόπο ανάλυσης της OPLS-DA, λαμβάνεται ένα ακόμα διάγραμμα το VIP score (Variable of Importance in Projection), στο οποίο απεικονίζεται η συσχέτιση των 15 σημαντικών κυματαριθμών με τις δύο ομάδες δειγμάτων (Διάγραμμα 3.4.1.4). Η υψηλή

συσχέτιση παρουσιάζεται με κόκκινο χρώμα ενώ η χαμηλή αντιστοίχως με μπλε. Οι εννέα κυματαριθμοί εμφανίζουν υψηλότερη συσχέτιση με τον αισθητήρα των δειγμάτων με τη διατροφική επέμβαση ενώ οι έξι με τον αισθητήρα του μάρτυρα.

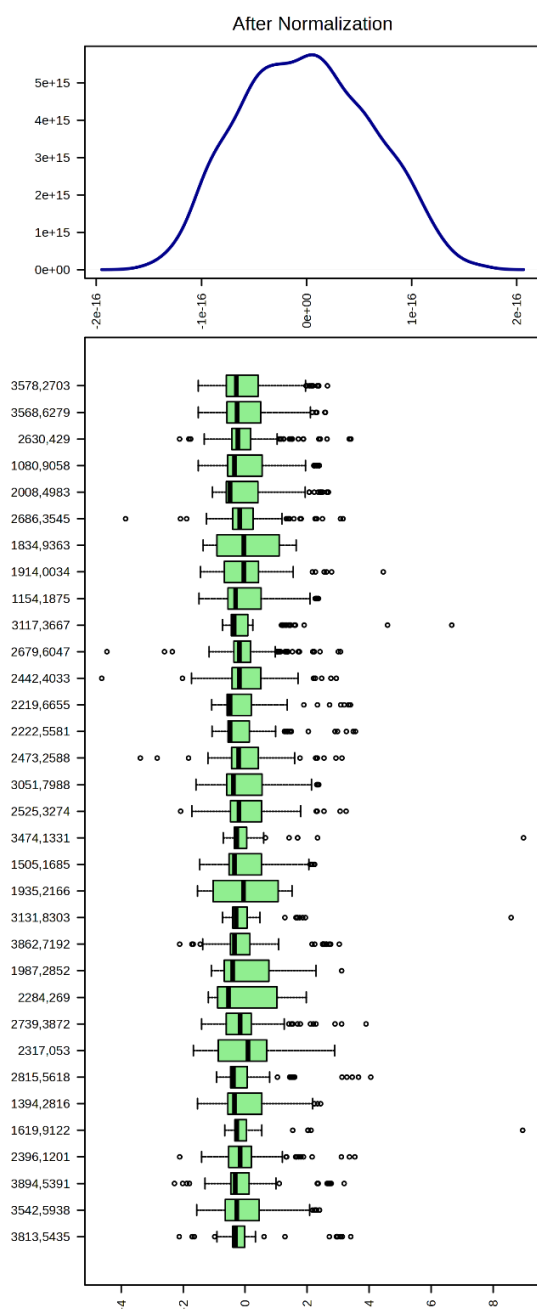
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι τιμές του δείκτη VIP δείχνουν τη συσχέτιση των ανεξάρτητων μεταβλητών (κυματαριθμοί του φάσματος FTIR) με τα δείγματα. Επιπλέον, οι ζώνες του FTIR με τους τυπικούς χημικούς δεσμούς αντιστοιχούν σε δονήσεις που σχετίζονται με τα κύρια συστατικά των τροφίμων όπως το νερό, οι πρωτεΐνες, τα λιπαρά οξέα και οι υδατάνθρακες (Nawrocka & Lamorska, 2013). Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές ($3527, 3528, 3453, 3478, 3467 \text{ cm}^{-1}$) αντιστοιχούν σε έντονες δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ του OH και συνδέεται με το νερό. Οι τιμές ($3630, 3890 \text{ cm}^{-1}$) αντιστοιχούν σε χαμηλές δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ του OH και συνδέεται με αλκοόλες και φαινόλες. Η τιμή 1706 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δονήσεις κάμψης (δ) N-H, και δονήσεις έκτασης (ν) C-N που οφείλονται σε πεπτίδια και πρωτεΐνες. Η τιμή 2330 cm^{-1} αντιστοιχεί σε έντονες δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ O-H που συνδέονται με το διοξείδιο του άνθρακα CO_2 . Τέλος, η τιμή 2780 cm^{-1} αντιστοιχεί σε έντονες δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ N- CH_2 που συνδέονται με τριτοταγείς αμίνες πρωτεϊνών.. Η τιμή 1345 cm^{-1} , αντιστοιχεί σε δονήσεις κάμψης (δ) των λειτουργικών ομάδων CH_2 και CH_3 που ανήκουν σε ομάδες πρωτεϊνών και λιπαρών οξέων που έχουν φώσφορο στο μόριο τους. Η τιμή 3542 cm^{-1} αντιστοιχεί σε έντονες δονήσεις έκτασης (ν) μεταξύ του OH και συνδέεται με το νερό. Η τιμή 1503 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δονήσεις κάμψης (δ) N-H, και δονήσεις έκτασης (ν) C-N που οφείλονται σε πεπτίδια και πρωτεΐνες. Αυτό σημαίνει πως η προσθήκη των φυτικών βιοενεργών συστατικών τροποποίησε το προφίλ των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών συγκριτικά με το μάρτυρα.



Διάγραμμα 3.4.1.4 : Απεικόνιση των σημαντικότερων κυματαριθμών σύμφωνα με τις τιμές των δεικτών VIP για τις ομάδες των δειγμάτων του μάρτυρα(1) και της διατροφικής επέμβασης(2)

3.4.2 Διαχωρισμός των δειγμάτων του μάρτυρα από τα δείγματα που δέχθηκαν διατροφική επέμβαση

Οι αναλύσεις των φασμάτων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Metaboanalyst version 6.0 . Τα δείγματα της παρούσας μελέτης διαχωρίστηκαν σε τρεις ομάδες σύμφωνα με το σιτηρέσιο που χορηγήθηκε στις όρνιθες. Πιο συγκεκριμένα, η ομάδα του μάρτυρα (c), η ομάδα με το χαμηλότερο ποσοστό ενσωμάτωσης (1000 mg/kg φυτοβιοτικό), η ομάδα με το υψηλότερο ποσοστό ενσωμάτωσης (2000 mg/kg φυτοβιοτικό) του μίγματος των φυτικών

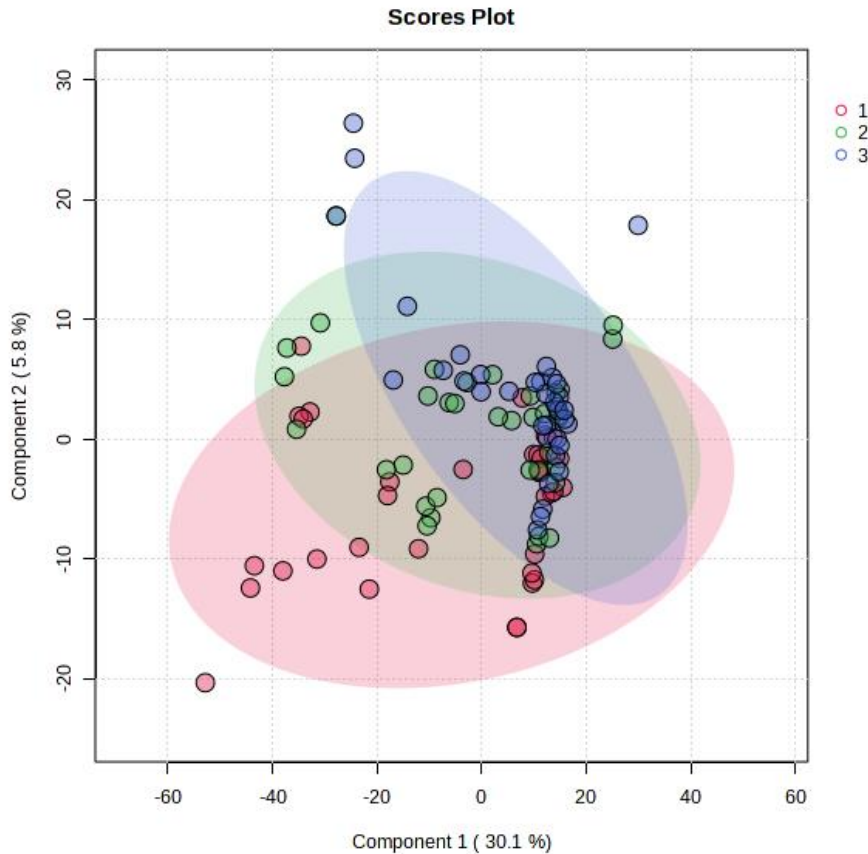


βιοενεργών συστατικών. Στόχος της συγκεκριμένης ανάλυσης ήταν η διερεύνηση της ικανότητας της φασματοσκοπίας FTIR στο διαχωρισμό των δειγμάτων σύμφωνα με το σιτηρέσιο που είχαν διατραφεί. Για την ανάλυση επιλέχθηκε η περιοχή φάσματος 900 - 4000 cm^{-1} .

Αρχικά πραγματοποιήθηκε προεπεξεργασία των φασμάτων για την κανονικοποίηση των δειγμάτων. Το βήμα αυτό θεωρείται απαραίτητο προκειμένου να διερευνηθεί εάν τα δείγματα ακολουθούν κανονική κατανομή. Η προεπεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο κλιμάκωσης Pareto, όπου από κάθε μέτρηση αφαιρείται ο μέσος όρος (mean centering) και το αποτέλεσμα διαιρείται με την τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης (s). Στόχος ήταν τα δεδομένα παραμένουν πιο κοντά στις τιμές των αρχικών μετρήσεων (Βαλάση, 2022). Στο Διάγραμμα 3.4.2.1 παρουσιάζονται οι κανονικοποιημένες τιμές μετά την εφαρμογή του μετασχηματισμού Pareto.

Διάγραμμα 3.4.2.1: Μετασχηματισμός δεδομένων με τη μέθοδο Pareto

Έπειτα ακολούθησε η ανάλυση PLS-DA , μία διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares- Discriminant Analysis), το οποίο αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό τύπο ανάλυσης (Multivariate) με επίβλεψη (Supervised). Αυτό σημαίνει πως έχουν οριστεί ήδη οι ομάδες και ελέγχεται η ομαδοποίηση.

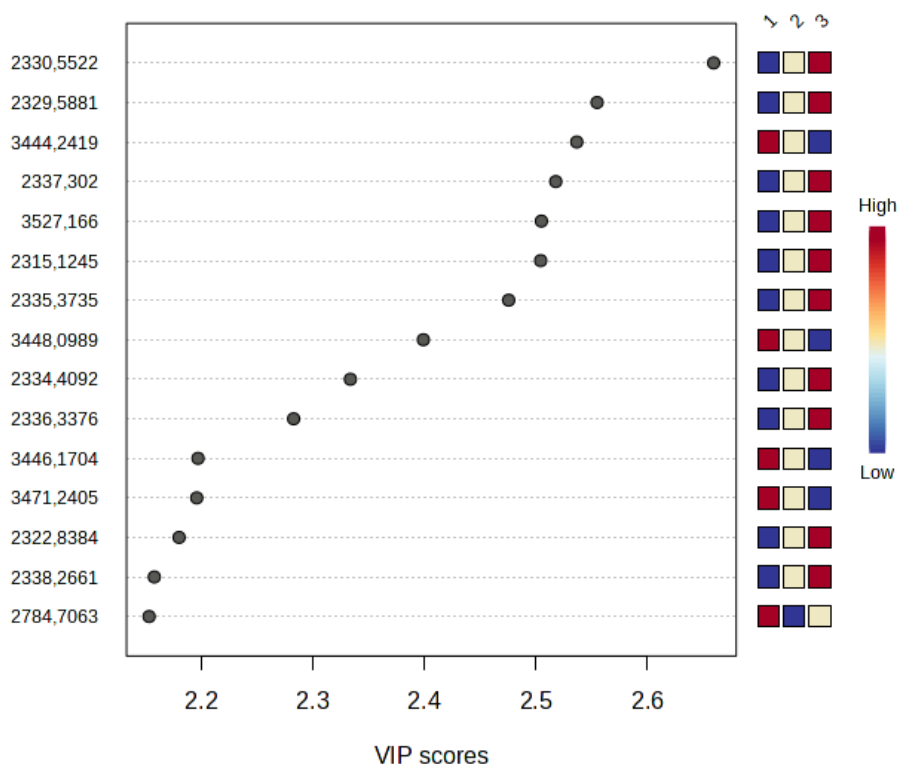


Διάγραμμα 3.4.2.2: Απεικόνιση της ανάλυσης PLS-DA 2D scores plot για τη διάκριση των τριών ομάδων (1) χωρίς φυτοβιοτικό (2) 1000mg/Kg φυτοβιοτικό (VB) (3) 2000mg/Kg φυτοβιοτικό VD

Το Διάγραμμα 3.4.2.2 παρουσιάζει τη διασπορά των δειγμάτων χωρίς διατροφική επέμβαση(μάρτυρας) και με διατροφική επέμβαση (1000 και 2000 mg/Kg φυτοβιοτικό). Παρατηρούμε ότι το γράφημα εξηγεί αθροιστικά ποσοστό 35,9% της παραλλακτικότητας των δεδομένων , χωρίς να υπάρχει εμφανής διαχωρισμός μεταξύ των τριών κατηγοριών.

Επίσης, ορισμένα δείγματα με το υψηλότερο ποσοστό ενσωμάτωσης μίγματος φυτοβιοτικού ,είναι εκτός του 95% διαστήματος εμπιστοσύνης

Παραμένοντας στον ίδιο τρόπο ανάλυσης της PLS-DA λαμβάνεται ένα ακόμα διάγραμμα το VIP score (Variable of Importance in Projection), στο οποίο απεικονίζεται η συσχέτιση των 15 σημαντικών κυματαριθμών με τις τρεις ομάδες δειγμάτων(Διάγραμμα 3.4.2.3). Η υψηλή συσχέτιση παρουσιάζεται με κόκκινο χρώμα, η μεσαία συσχέτιση με μπλε, ενώ η χαμηλή αντιστοίχως με μπλε.



Διάγραμμα 3.4.2.3: Απεικόνιση των σημαντικότερων κυματαριθμών σύμφωνα με τις τιμές των δεικτών VIP για τη διάκριση μεταξύ των τριών ομάδων (1) του μάρτυρα (2) 1000mg/Kg φυτοβιοτικό (VB) (3) 2000mg/Kg φυτοβιοτικό VD

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι τιμές του δείκτη VIP δείχνουν τη συσχέτιση των ανεξάρτητων μεταβλητών (κυματαριθμοί του φάσματος FTIR) με τα δείγματα. Στην παρούσα ανάλυση, παρατηρείται πως υψηλότερη συσχέτιση έχουν τα δείγματα με το υψηλότερο ποσοστό ενσωμάτωσης μίγματος φυτοβιοτικού (2000 mg/Kg). Μεσαία συσχέτιση με τον αισθητήρα παρατηρείται στα δείγματα με το χαμηλότερο ποσοστό ενσωμάτωσης μίγματος φυτοβιοτικού (1000 mg/Kg) και χαμηλότερη συσχέτιση τα δείγματα του μάρτυρα (χωρίς φυτοβιοτικό). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι ζώνες του FTIR με τους τυπικούς χημικούς δεσμούς αντιστοιχούν σε δονήσεις που σχετίζονται με τα κύρια συστατικά των τροφίμων όπως το νερό, οι πρωτεΐνες, τα λιπαρά οξέα και οι υδατάνθρακες.

Πιο συγκεκριμένα, δέκα κυματαριθμοί έχουν υψηλότερη συσχέτιση με την ομάδα δειγμάτων που φέρει το υψηλότερο ποσοστό ενσωμάτωσης μίγματος φυτοβιοτικού. Οι κυματαριθμοί (2330, 2337, 2315, 2335, 2334, 2336, 2323, 2338 cm⁻¹) συσχετίζονται με έντονες δονήσεις (ν) του υδροξυλίου που συνδέεται με CO₂. Στην περιοχή (3500-3560 cm⁻¹) παρατηρούνται χαμηλής έντασης δονήσεις μεταξύ υδροξυλίου που συνδέεται με λιπαρό οξύ (3527 cm⁻¹). Έπειτα, οι κυματαριθμοί (3444, 3448, 3446, 3471 cm⁻¹) συσχετίζονται με χαμηλές δονήσεις (ν) του υδροξυλίου που συνδέεται με νερό. Τέλος, ο κυματαριθμός (2785 cm⁻¹) συνδέεται με έντονες δονήσεις (ν) μεταξύ N- CH₂ που συνδέεται με τριτοταγείς αμίνες πρωτεϊνών.

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αξιολογήθηκε η επίδρασης της προσθήκης μίγματος φυτικών βιοενεργών συστατικών διαφορετικής συγκέντρωσης (1000 και 2000 mg/ kg) στη μεταβολή της μικροχλωρίδας και στην επιβίωση του βακτηρίου *Salmonella* Typhimurium B-62 σε κιμά κοτόπουλου συγκριτικά με κιμά που προερχόταν από όρνιθες που είχαν λάβει μόνο το βασικό σιτηρέσιο και συντηρήθηκε σε θερμοκρασία 4°C με τη χρήση της Κλασικής Μικροβιολογίας και των ταχείων Μεθόδων μικροβιολογικής ανάλυσης (FTIR).

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του pH έδειξαν πως δεν επηρεάζεται η τιμή του από τη διατροφική επέμβαση.

Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων έδειξαν πως σε κάθε χρονική στιγμή ο πληθυσμός της OMX ήταν μικρότερος μετά τον εμβολιασμό με το παθογόνο βακτήριο *Salmonella* Typhimurium σε σύγκριση με τον πληθυσμό πριν την επιμόλυνση. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε φαινόμενο ανταγωνισμού μεταξύ της OMX και του παθογόνου βακτηρίου. Μεταξύ των ομάδων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις μίγματος φυτοβιοτικού (0, 1000 και 2000 mg/ kg) δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση του πληθυσμού της OMX κατά τη διάρκεια της συντήρησης του κιμά κοτόπουλου.

Τα αποτελέσματα μέσω της φασματοσκοπίας FTIR έδειξαν ότι η Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών δεν είχε ικανοποιητική επίδοση στο διαχωρισμό των δειγμάτων μεταξύ μάρτυρα (απουσία φυτικών βιοενεργών συστατικών) και προσθήκης φυτικών βιοενεργών συστατικών στο σιτηρέσιο. Παρόλα αυτά, η ανάλυση με τη μέθοδο OrthoPLS-DA έδειξε ικανοποιητικό διαχωρισμό των δύο κατηγοριών δειγμάτων, δείχνοντας ότι η προσθήκη του μίγματος φυτοβιοτικού στο σιτηρέσιο ορνίθων κρεοπαραγωγής, θα μπορούσε να επηρεάσει τα χαρακτηριστικά.

Χρήζει περαιτέρω έρευνα για την κατανόηση της δράσης των φυτικών βιοενεργών συστατικών και την έρευνα του βέλτιστου σχήματος χορήγησής τους στα σιτηρέσια των ζώων, κυρίως όσον αφορά την αποτελεσματικότητα αυτών των πρόσθετων, την ασφάλεια τους, την υγεία των ζώων, την ποιότητα των ζωικών προϊόντων, τον αντίκτυπο στο περιβάλλον καθώς και το χρόνο που μπορεί να διαρκέσει η χρήση τους.

Βιβλιογραφία

Ελληνική

1. Κουή Μ., Χειλάκου, Ε., Θεοδωρακέας Π., Δρίτσα, Β. και Αβδελίδης Ν., (2015). Μη καταστρεπτικές και φασματοσκοπικές μέθοδοι εξέτασης των υλικών. Αθήνα: SEAB. ISBN:978-960-603-498-5.
2. Σινάνογλου Β., Ζουμπουλάκης, Π. και Σωτήρης Μπρατάκος, (2016-2017). Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR, FTIR). Εργαστήριο Ανάλυσης του ΤΕΙ Αθήνας
3. Βαλάση Λ., (2020). Διαφοροποίηση κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera*) ποικιλίας Αιγίνης και ελαίων τους με φασματοσκοπικές και χημειομετρικές μεθόδους. Διδακτορική διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ξενόγλωσση

1. Abdelli N., Oriol D.S., Perez F.J., (2021). Phytogetic Feed Additives in Poultry: Achievements, Prospective and Challenges. Department of Animal and Food Science. Spain.11(12):3471
2. Andrews W.H, Hammack T.S., (2001) Salmonella. Bacteriological Analytical Manual. U.S. Food and Drug Administration. Chapter 5.
3. Ashrafudoulla M., Mizan M. F. R., Park H., Byun K.-H., Lee N., Park S. H., Ha, S.-D. (2019). Genetic relationship, virulence factors, drug resistance profile and biofilm formation ability of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from mussel. Frontiers in Microbiology, 10: 513
4. Ashrafudoulla M., Na K. W., Byun K.H., Kim D. H., Yoon J. W., Mizan M. F. R., Kang, I., Ha, S.D. (2021). Isolation and characterization of Salmonella spp. from food and food contact surfaces in a chicken processing factory. Poultry Science, 100(8):101234.
5. Barbes L., Radulescu C., Stihl, C., (2014). ATR-FTIR Spectrometry Characterization of polymeric materials. Romanian Reports in Physics. 66(3): 765–777.
6. Bec K. B., Grabska J., Huck C.W., (2020). Physical principles of infrared spectroscopy. Comprehensive Analytical Chemistry. Austria.
7. Bernstein A., Sun Q., Hu F., Stampfer M., Manson J., Willett W. (2010) Major dietary protein sources and risk of coronary heart disease in women. Circulation. 122(9):876-883.
8. Bruyne S., Speeckaert M., Delanghe J. (2017). Applications of mid-infrared spectroscopy in the clinical laboratory setting. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 55(1): 1–20.
9. Buncic S., Sofos J. (2012). Interventions to control Salmonella contamination during poultry, cattle and pig slaughter. Food Research International, 45(2): 641–655.
10. Bylesjo M., Rantalainen M., Cloarec O., Nicholson J., Holmes E., Trygg J (2006). OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. 20 (8-10):341-351
11. Chaillou S., Talmon A.C, Caekebeke H., Cardinal M., Christieans S., Denis C., Desmonts M. H., Dousset X., Feurer C., Hamon E., Joffraud J.J., La Carbona S., Leroi F., Leroy S., Lorre S., Macé S., Pilet M.-F., Prévost H., Rivollier M., Champomier-Vergès M.-C. (2015). Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. ISME J, (9): 1105–1118.

12. Chowdhury A.H., Ashrafudoulla Md., Mevo S., Mizan R., Park H., Ha S., (2023). Current and future interventions for improving poultry health and poultry food safety and security: A comprehensive review in Food science and Food safety, 22(3):1555-1596
13. Dutta A. (2017). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization Micro and Nano Technologies (4): 73-93.
14. Endersen L., Coffey, A. (2020). The use of bacteriophages for food safety. Current Opinion in Food Science, 36: 1–8
15. Fadlelmoula A., Pinho D., Carvalho V.H., Catarino S.O., Minas G. (2022). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20 Years: A Review towards Lab-on-a-Chip Devices 13(2):187
16. Food Safety and Inspection Service, U.S Department of Agriculture (2020) HACCP Model for Poultry Slaughter, Guideline FSIS-GD-2020-0013
17. Garg A, Sharma A, Krishnamoorthy P, Garg J, Virmani D, Sharma T, Stefanini G, Kostis JB, Mukherjee D, Sikorskaya E. (2017) Role of niacin in current clinical practice: A systematic review. The American Journal of Medicine. 130(2):173-187.
18. Haberecht S., Bajagai Y. S., Moore R. J., Van T. H. H., Stanley, D. (2020). Poultry feeds carry diverse microbial communities that influence chicken intestinal microbiota colonisation and maturation. AMB Express, 10: 143.
19. Hamed E. A., Abdelaty M. F., Sorour H. K., Elmasry D., Abdelmagid M. A., Saleh M., AbdelRahman A. (2022). A pilot study on the effect of thyme microemulsion compared with antibiotic as treatment of *Salmonella* Enteritidis in broiler. Veterinary Medicine International,1: 3647523.
20. Hameed H., (2020). Feed additives in poultry. Department of Physiology Biochemistry and Pharmacology, College of Veterinary Medicine. 67(168): 87-100.
21. Hui Y.H, Pierson M.D, Gorham J.R. (2001) Bacteriology of Salmonella. Foodborne Disease Handbook, Bacterial Pathogens. New York: Marcel Dekker, 247–263
22. ISO. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Geneva, Switzerland: Horizontal Method for the Detection of Salmonella spp. ISO No. 6579; 2002.
23. Issenhuth-Jeanjean S., Roggestin P., Mikoleit M., Guibourdenche M., Pinna E., Nair S., Fields P., Weill F. (2014) Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Research in Microbiology 165(7):526-30.
24. Karoui R., Downey G., Blecker C., (2010). Mid-Infrared Spectroscopy Coupled with Chemometrics: A Tool for the Analysis of Intact Food Systems and the Exploration of Their Molecular Structure-Quality Relationships - A Review. Chemical Reviews 110(10): 6144–6168
25. Keene D, Price C, Shun-Shin M.J, Francis D.P. (2014) Effect on cardiovascular risk of high-density lipoprotein targeted drug treatments niacin, fibrates, and CETP inhibitors: Meta-analysis of randomised controlled trials including 117411 patients. British Medical Journal.18, 349: 4379.
26. Kim J.H., Kim K.S. (2010). Hatchery hygiene evaluation by microbiological examination of hatchery samples. Poultry Science, 89(7): 1389–1398.
27. Kralik G., Kralik,Z. , Grcevic ,M., Hanzek D.,(2017) Animal Husbandry and Nutrition . Intech Open 4:63-82
28. Lee K.M, Runyon M, Herrmanm T.J, Phillips R, Hsieh J. (2015) Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. Food Control. 47, 264–276.

29. Ly-Chatain, M. H. (2014). The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology*. 18(5) :51.
30. Marangoni F., Corsello G., Cricelli C., Ferrara N., Ghiselli A., Lucchin L., Poli A. (2015) Role of poultry meat in a balanced diet aimed at maintaining health and wellbeing: An Italian consensus document. *Food and Nutrition Research*., 59(1):1-11.
31. Marmion M., Ferone M. T., Whyte P., Scannell, A. G. M. (2021). The changing microbiome of poultry meat; from farm to fridge. *Food Microbiology*. 99, 103823
32. McMullin P. F. (2009). Hygiene and microbiological control in hatcheries. *Avian Biology Research*. 2(1-2): 93–97.
33. Mead G. C., Hudson W. R., Hinton M. H. (1994). Use of a marker organism in poultry processing to identify sites of cross-contamination and evaluate possible control measures. *British Poultry Science*. 35(3): 345–354.
34. Melero B., Manso B., Stessl, B., Hernández M., Wagner M., Rovira J., Rodriguez-Lazaro D. (2019). Distribution and persistence of *Listeria monocytogenes* in a heavily contaminated poultry processing facility. *Journal of Food Protection*, 82(9):1524–1531
35. Mohamed M. A., Jaafar J., Ismail A. F., Othman M. H. D., Rahman M. A., (2017). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Membrane Characterization*. 1:3–29.
36. Mohiti -Asli M, Rashti M.G. (2018). Comparing the effects of a combined phytogenic feed additive with an individual essential oil of oregano on intestinal morphology and microflora in broilers. *Journal of Applied Animal Research* 46: 184-189
37. Montgomery D.C., Runger G.C. *Applied Statistics and Probability for Engineers*, John Wiley & Sons, (2003)
38. Nawrocka A., Lamorsk J., (2013). Determination of Food Quality by Using Spectroscopic Methods. *Advances in Agrophysical Research*. 14: 347-366
39. Nychas G., Panagou E., Mohareb, F. (2016). Novel approaches for food safety management and communication. *Current Opinion in Food Science*. 12: 13-20
40. Ono K., Yamamoto K. (1999). Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 47(3): 211–219.
41. Pang Z., Chong J., Zhou G., Morais D.A., Chang L., Barrette M., Gauthier C., Jacques P.E., Li S., Xia J., (2021). MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights *Nucleic Acids Research*. 49(1): 388–396,
42. Parra A., Toro M., Jacob R., Navarrete P., Troncoso M., Figueroa G., Reyes-Jara, A. (2018). Antimicrobial effect of copper surfaces on bacteria isolated from poultry meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1): 113–118.
43. Pirgozliev V., Rose S.P., Ivanova S., (2019). Feed additives in poultry nutrition. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 25(1): 8–11.
44. Popoff M.Y, Minor L. In: *Salmonella*. (2005) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Brenner D.J, Kreig N.R, Staley J.T, editors. New York, USA: Springer, 764–799
45. Rambach A. (1990) New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. From *Proteus* spp, other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(1):301–303.
46. Ross A., Willson V.L. (2017). One-Sample T-Test. In: *Basic and Advanced Statistical Tests*. SensePublishers, Rotterdam.

47. Rouger A., Tresse O., Zagorec, M. (2017). Bacterial contaminants of poultry meat: Sources, species, and dynamics. *Microorganisms*, 5(3): 50
48. Shehata A., Yalcın S., Latorre J., Basiouni, S., Attia Y., El-Wahab, A.A., Visscher C., El-Seedi H., Huber C., Hafez H., Eisenreich W., Tellez-Isaias G., (2022). Probiotics, Prebiotics, and Phytogenic Substances for Optimizing Gut Health in Poultry. *Faculty of Veterinary Medicine. Turkey*. 10(2):395
49. Silva F., Domingues F., Nerin, C. (2018). Trends in microbial control techniques for poultry products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 58(4): 591–609
50. Slader J., Domingue G., Jorgensen F., McAlpine K., Owen R. J., Bolton F. J., Humphrey T. J. (2002). Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(2):713-719
51. Stanley D., Geier M., Hughes, R., Denman S., Moore R.(2013). Highly variable microbiota development in the chicken gastrointestinal tract. *PLoS ONE*, 8(12):84290
52. Stuart B. H., (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Analytical Techniques in the Sciences.
53. Thain S., (2022). *IR Spectroscopy and FTIR Spectroscopy: How an FTIR Spectrometer Works and FTIR Analysis*. Technology Networks Analysis & Separations.
54. Trygg J, Wold S. (2002) Orthogonal projections to latent structures (O-PLS) *Journal of Chemometrics*.,16(3):119–128
55. Turcu R.P, Tabuc C., Vlaicu P.A., Panaite T., (2018). Effect of the dietary oregano (*Origanum vulgare* L.) powder and oil on the balance of the intestinal microflora of broilers reared under heat stress (32°C). *Animal Science* 51: 77-86.