



**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της επιβίωσης του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε μαρούλια .

ΓΑΒΡΙΗΛΟΓΛΟΥ ΠΟΛΥΞΕΝΗ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2011

Μελέτη της επιβίωσης **παθογόνου βακτηρίου** *Listeria monocytogenes* σε μαρούλια .

ΓΑΒΡΙΗΛΟΓΛΟΥ ΠΟΛΥΞΕΝΗ

Υποβολή πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή του πτυχίου του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Α.Τ.Ε.Ι. Θεσσαλονίκης

Εισηγητής: ΛΥΚΟΤΡΑΦΙΤΗ ΕΛΕΝΗ
ΠΕΤΡΙΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην καθηγήτρια του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων κ. Λυκοτραφιτη Ελένη καθώς και στις βοηθούς του εργαστηρίου μικροβιολογίας τροφίμων κ. Ακριτίδου Αφροδίτη και κ. Τουλιά Μαρία.

Περιεχόμενα

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1	Τα φρέσκα λαχανικά	5
1.2	Μαρούλι.....	5
1.2.1	Καλλιεργούμενοι τύποι.....	5
1.3	Συγκομιδή.....	6
1.3.1	Θρεπτική αξία	7
1.4	Πως μολύνονται τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης.....	8
1.5	Μικροχλωρίδα των λαχανικών	9
1.6	Παθογόνα βακτήρια στα λαχανικά	11
1.7	Μικροοργανισμοί ως δείκτες ποιότητας των τροφίμων.....	13
1.7.1	Εντεροβακτήρια (<i>Enterobacteriaceae</i>).....	13
1.7.2	Κολοβακτηρίδια (coliforms).....	13
1.7.3	<i>Escherichia coli</i>	14
1.8	Ολική μεσόφιλη χλωρίδα	17
1.9	<i>Listeria monocytogenes</i>	17
1.9.1	Γενικά.....	17
1.9.2	Μορφολογικά χαρακτηριστικά	18
1.9.3	Ταξινόμηση της <i>Listeria</i>	19
1.9.4	Συνθήκες ανάπτυξης της <i>Listeria</i>	19
1.9.5	Τρόφιμα που σχετίζονται με <i>L. monocytogenes</i>	20
1.10	Λιστερίωση (<i>Listeriosis</i>)	20
1.11	Νομοθεσία σχετικά με την <i>L. monocytogenes</i> και <i>E. coli</i> στα τρόφιμα....	22
2	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	23
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
3.1	Πλατύφυλλο μαρούλι	23
3.1.1	Προετοιμασία δειγμάτων μαρουλιού για καταμέτρηση μικροβιακής χλωρίδας – Παρασκευή αραιώσεων.	24
3.1.2	Ενοφθαλμισμός των τρυβλίων Petri.	24
3.1.3	Επώαση και καταμέτρηση αποικιών.....	25
3.1.4	Δοκιμές επιβίωσης της <i>L. monocytogenes</i> σε διαφορετικές θερμοκρασίες στα μαρούλια.	26
3.1.5	Στατιστική ανάλυση.....	28
4	Αποτελέσματα και συζήτηση.....	29
4.1	Μικροβιακή χλωρίδα στα μαρούλια	29
4.2	Μελέτη της επιβίωσης της <i>Listeria monocytogenes</i> σε μαρούλια διατηρημένα σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους συντήρησης.....	32
5	Συμπεράσματα	33
6	Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	35
7	Βιβλιογραφία	36

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη των μικροοργανισμών που βρίσκονται στο μαρούλι και η μελέτη της επιβίωσης της *Listeria monocytogenes* σε διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης.

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 24 δείγματα πλατύφυλλου μαρουλιού τύπου Ρωμάνα. Όλα τα δείγματα αγοράστηκαν την ημέρα του πειράματος από τοπικό κατάστημα της Θεσσαλονίκης και μεταφέρθηκαν αμέσως στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΤΕΙΘ για τις μικροβιολογικές αναλύσεις. Τα πρώτα 15 δείγματα υποβλήθηκαν στις παρακάτω αναλύσεις: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα. (Ο.Μ.Χ.), αρίθμηση κολοβακτηριδίων (*coliforms*), αρίθμηση *E. coli*, αρίθμηση της *Listeria*. Τα υπόλοιπα 9 δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της επιβίωσης του βακτηρίου *L. monocytogenes* στο μαρούλι. Τα δείγματα επώαστηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 4, 25 και 30°C. Χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα για κάθε θερμοκρασία επώασης στη πειραματική διαδικασία. Τα μαρούλια εμβολιάστηκαν με 150μl καθαρής καλλιέργειας *L. monocytogenes*.

Στο πρώτο μέρος της μελέτης, τα δείγματα μαρουλιού που αναλύθηκαν όσον αφορά την μικροβιακή χλωρίδα δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Ενώ στα δείγματα που εξετάστηκε η επιβίωση της *L. monocytogenes* σε καμία περίπτωση, δεν παρατηρήθηκε η εξάλειψη της *L. monocytogenes* στις θερμοκρασίες συντήρησης 4, 25 και 30°C.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τα φρέσκα λαχανικά

Η ζήτηση για φρέσκα λαχανικά, σαλάτες και φρούτα έχει αυξηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια σε όλο τον κόσμο (Mead *et al.*, 1999).

Τα ελάχιστα επεξεργασμένα φρούτα και λαχανικά αποτελούνται από νωπά, φρεσκοκομμένα προϊόντα, τα οποία έχουν υποστεί ελάχιστη επεξεργασία, όπως αποφλοιώση και τεμαχισμό για να καταστούν έτοιμα για χρήση. Τα φρεσκοκομμένα λαχανικά συνήθως συσκευάζονται σφραγισμένα σε σάκους ή δισκάκια από μεμβράνες πολυμερών (Γερασόπουλος, 2005).

1.2 Μαρούλι

Το μαρούλι είναι μέλος της οικογένειας Compositae (Asteraceae). Το καλλιεργούμενο είδος (*Lactuca Sativa* L.) ανήκει στο γένος *Lactuca*, και οι καλλιεργούμενες ποικιλίες και τα υβρίδια κατατάσσονται σε πέντε τύπους (Σιώμος, 2004).

1.2.1 Καλλιεργούμενοι τύποι:

1. Συμπαγής κεφαλωτός (crisphead ή iceberg)
2. Χαλαρός κεφαλωτός ή βουτύρου ή ημικεφαλωτός (butterhead)
3. Ρωμάνα (romaine ή cos)
4. Σαλάτα (looseleaf ή bunching ή leaf)
5. Σπαραγγιού ή κινέζικο μαρούλι (Stem lettuce ή celtuce)



Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο τύπος Ρωμάνα. Αναγνωρίζεται εύκολα από τα μακριά και στενά φύλλα και την όρθια (κάθετη) εμφάνιση. Είναι περισσότερο ευαίσθητος στις αντίξοες καιρικές συνθήκες σε σχέση με τους άλλους τύπους. Έχει μικρή αντοχή στο ψύχος. Καλλιεργείται στην ύπαιθρο και στο θερμοκήπιο. Είναι πιο διαδεδομένος στις

χώρες της νότιας Ευρώπης και στις χώρες της λεκάνης της Μεσογείου. Είναι ο δημοφιλέστερος καλλιεργούμενος τύπος στην χώρα μας (Σιώμος Σ. Αναστάσιος, 2003)

1.3 Συγκομιδή

Το κυριότερο κριτήριο συγκομιδής είναι το μέγεθος του φυτού. Η ποικιλία τύπου ρωμάνα μπορεί να συγκομίζεται και πριν ακόμα σχηματιστεί πλήρως η κεφαλή. Αν το μαρούλι κατά την συγκομιδή είναι καλής ποιότητας και οι συνθήκες συντηρήσεις άριστες (θερμοκρασία κοντά στους 0 °C και σχετική υγρασία >95%), μπορεί να συντηρηθεί από 1 έως 3 εβδομάδες, ανάλογα με τον τύπο. Το μαρούλι είναι ένα από τα λαχανοκομικά προϊόντα με την υψηλότερη διαπνοή (Σιώμος, 2004).

Στη διάρκεια της περιόδου διατήρησης ή και της μεταφοράς μπορεί να εμφανίζονται διάφορες ασθένειες ή ανωμαλίες. Το πλέον συνηθισμένο μετασυλλεκτικό πρόβλημα είναι η μαλακή βακτηριακή σήψη, η οποία μπορεί να περιοριστεί εάν η θερμοκρασία συντήρησης είναι κοντά στους 0 °C. Η κοκκινόμαυρη κηλίδωση των φύλλων (russet spotting) είναι επίσης συνηθισμένη μετασυλλεκτική ανωμαλία. Κηλίδες σκουριάς εμφανίζονται στο κατώτερο τμήμα του κεντρικού νεύρου των εξωτερικών φύλλων και μπορεί να επεκτείνονται και στο έλασμα του φύλλου. Η ανωμαλία αυτή προκαλείται από την παρουσία του αιθυλενίου στο περιβάλλον διατήρησης σε συγκεντρώσεις >0,1 ppm σε συνδυασμό με υψηλή θερμοκρασία (>5°C). Το αιθυλένιο μπορεί να παράγεται από τις ίδιες τις κεφαλές του μαρουλιού ή ακόμα και από άλλα είδη που βρίσκονται στον ίδιο αποθηκευτικό χώρο και παράγουν σημαντικές ποσότητες αιθυλενίου (π.χ μήλα, αχλάδια). Η καστανή κηλίδωση των φύλλων είναι επίσης συνηθισμένη μετασυλλεκτική ανωμαλία. Καστανόχρωμες κηλίδες εμφανίζονται κοντά στη βάση των φύλλων στο κεντρικό νεύρο και στο έλασμα. Προκαλείται από υψηλή συγκέντρωση CO₂ στο περιβάλλον συντήρησης και τα συμπτώματα είναι εντονότερα σε χαμηλές συγκεντρώσεις O₂ (περίπου 3%) (Σιώμος, 2004).

1.3.1 Θρεπτική αξία

Το μαρούλι χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (94-96%). Σε σύγκριση με τα άλλα λαχανικά είναι καλή πηγή ασβεστίου, σιδήρου και βιταμίνης Α, ενώ έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, ασκορβικό οξύ, θειαμίνη, ριβοφλαβίνη και νιασίνη. Με βάση την περιεκτικότητα σε βιταμίνες και ανόργανα άλατα, το μαρούλι κατατάσσεται στην 26^η θέση μεταξύ όλων των φρούτων και λαχανικών. Όμως, η συνεισφορά του στη διατροφή είναι συνάρτηση της ποσότητας που καταναλώνεται και με βάση αυτό, στις ΗΠΑ κατατάσσεται στην 4^η θέση, μετά από την ντομάτα, τα εσπεριδοειδή, και την πατάτα.

Μεταξύ των τεσσάρων τύπων υπάρχουν σημαντικές διαφορές ως προς την περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά όπως φαίνεται στον πίνακα 1. Οι τύποι ρωμάνα και σαλάτα είναι πλουσιότεροι σε βιταμίνη C, βιταμίνη Α και ασβέστιο.

Πίνακας 1.1. Περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά των τεσσάρων τύπων μαρουλιού (ανά 100 g).

	Κεφαλωτός	Ημικεφαλωτός	Ρωμάνα	Σαλάτα
Νερό (%)	95,5	95,1	94	94
Ενέργεια (cal)	13	14	18	18
Πρωτεΐνη (%)	0,9	1,2	1,3	1,3
Λίπος (%)	0,1	0,2	0,3	0,3
Υδατάνθρακες (%)	2,9	2,5	3,5	3,5
Φυτικές Ίνες (%)	0,5	0,5	0,7	0,7
Ανόργανα (%)	0,6	1	0,9	0,9
Ασβέστιο (mg)	20	35	68	68
Φώσφορος (mg)	22	26	25	2,5
Σίδηρος (mg)	0,5	2	1,4	1,4
Νάτριο (mg)	9	9	9	9
Κάλιο (mg)	175	264	264	264
Βιταμίνη Α (Διεθ. Μον.)	330	970	1900	1900
Βιταμίνη C (mg)	6	8	18	18
Θειαμίνη (mg)	0,06	0,06	0,05	0,05
Ριβοφλαβίνη (mg)	0,06	0,06	0,08	0,08
Νιασίνη (mg)	0,3	0,3	0,4	0,4

Πηγή: Σιώμος 2004

1.4 Πως μολύνονται τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης

Τα λαχανικά καλλιεργούνται πλέον όλο το χρόνο, και το χώμα συνήθως λιπαίνεται με περιττώματα ζώων (κοπρία). Ρίζες, φυτά με φύλλωμα βρίσκονται σε συνεχή επαφή με το έδαφος και επιμολύνονται υπερβολικά από την έκθεση τους σε ακάθαρτους ποταμούς ή από επιμολυσμένα αρδευτικά κανάλια. Η επακόλουθη αποτελεσματικότητα της πλύσης με χλωριωμένο νερό είναι αναγκαία (Lynch *et al.*, 2009).

Το χλωριωμένο νερό χρησιμοποιείται συνήθως για την καταστροφή των παθογόνων βακτηρίων στα λαχανικά. Ωστόσο, έρευνες έχουν δείξει ότι το

πλύσιμο με χλωριωμένο νερό έχει περιορισμένη βακτηριοκτόνο δράση (Lin *et al.*, 2000).

Η μόλυνση των λαχανικών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε όλα τα στάδια της παραγωγής, τόσο πριν όσο και μετά την συγκομιδή και επεξεργασία (De Roever, 1998).

Σοβαρή πηγή μόλυνσεως του μαρουλιού είναι το έδαφος που φιλοξενεί πολλά μικρόβια μεταξύ των οποίων και παθογόνους μικροοργανισμούς όπως βάκιλλους, κλωστρίδια, ζύμες, μύκητες, εντεροβακτήρια κτλ, που μπορεί να προέρχονται από περιττώματα ζώων (κοπριά), το νερό, τα έντομα (μέλισσες, μύγες, κτλ.) τα τρωκτικά (αρουραίοι), τα πτηνά, κ.ο.κ. Η μόλυνση μπορεί να γίνει και στο στάδιο της συγκομιδής, καθώς επίσης και στο στάδιο της μεταφοράς και αποθήκευσης της πρώτης ύλης στο εργοστάσιο. Πηγές μόλυνσεως μπορεί να είναι ακόμα και οι εργαζόμενοι και τα μηχανήματα. Τα φυτικά προϊόντα στο στάδιο της πρώτης ύλης είναι συνήθως επιμολυσμένα στην εξωτερική τους επιφάνια με ψευδομονάδες, γαλακτοβακτήρια, στρεπτόκοκκους, βάκιλλους, ζύμες και μύκητες. Το νερό άρδευσης πρέπει να προέρχεται από δίκτυα ύδρευσης όπου το νερό χλωριώνεται (Μπαλατσούρας, 2006).

1.5 Μικροχλωρίδα των λαχανικών

Τα νωπά λαχανικά έχουν την δική τους μικροχλωρίδα και κατά την διάρκεια της παραγωγής τους μπορεί να επιμολυνθούν με άλλους μικροοργανισμούς οι οποίοι μπορεί να είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο. Τα επίπεδα των βακτηρίων στα φρούτα και λαχανικά ποικίλουν σημαντικά. Η μικροβιακή επιμόλυνση των επιφανειακών ιστών είναι μεγαλύτερη ενώ συχνά ο εσωτερικός ιστός θεωρείται αποστειρωμένος. Για τον λόγο αυτό τα φυλλώδη λαχανικά έχουν περισσότερους μικροοργανισμούς γιατί έχουν μεγαλύτερη επιφάνεια (De Roever C, 1998; Liy. *et al.*, 2001).

Οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί μπορεί να βρίσκονται στο φυτό ή στο έδαφος, ή ακόμα να εμφανιστούν κατά την συγκομιδή και την μεταφορά. Περίπου τα δύο τρίτα της αλλοίωσης των λαχανικών προκαλείται από μύκητες. Οι μύκητες που απομονώνονται συνήθως είναι οι *Penicillium*

sclerotinia, *Botrytis*, *Rhizopus* (ICMSF, 1998), καθώς και οι *Aurebasidium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Phoma* (Francis *et al.*, 1999).

Η φυλλόπτωση του μαρουλιού, προκαλείται κυρίως από βακτήρια όπως, η *Pseudomonas cichorii* (Cottyn *et al.*, 2009), η *P. marginalis* και η *Erwinia carotovora*, ή από μύκητες όπως ο *Clerotinia spp*, και ο *Botrytis cinerea*. Τα βακτήρια είναι υπεύθυνα για περίπου το ένα τρίτο της συνολικής αλλοίωσης των λαχανικών (Nguyen – the and Carlin, 1994). Η φθορά αυτή μπορεί να οφείλεται σε βακτήρια που προκαλούν μαλακή σήψη ή και μαρασμό. Η μαλακή σήψη συμβαίνει συνήθως κατά την μεταφορά και αποθήκευση. Προκαλείται από βακτήρια που ανήκουν στα coliforms, *Erwinia carotovora*, και από συγκεκριμένες ψευδομονάδες όπως η *P. fluorescens* (Carlin *et al.*, 1996). Υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές πηγές που αναφέρουν ότι τα Gram αρνητικά βακτήρια, ιδιαίτερα οι *Pseudomonas spp.*, είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση των φρέσκων λαχανικών (Magnuson *et al.*, 1990; Beucnat, 2002). Σε μια μελέτη που έγινε σε φρέσκα λαχανικά έδειξε ένα ευρύ φάσμα μικροβιακού πληθυσμού που ποικίλλει από 70 cfu/g (ξεφλουδισμένη πατάτα) μέχρι και 3×10^8 cfu/g (αντίδια, καρότα, σέλινο, μαρούλι και μίγμα σαλάτας) με τα εντεροβακτήρια και τους ζυμομύκητες να βρίσκονται σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα ενώ το βακτήριο *Staphylococcus aureus* απουσίαζε. Μετά από αποθήκευση των φρέσκων λαχανικών για 6 ημέρες στους 4 και 20°C η ολική μεσόφιλη χλωρίδα σε σαλάτες διάφορων μιγμάτων (φρέσκων λαχανικών) κυμαίνονταν από 3×10^6 έως 3×10^8 cfu/g ενώ ο πληθυσμός των coliforms κυμαίνονταν σε λιγότερο από 100 cfu/g έως 1×10^6 cfu/g αντίστοιχα (Masson, 1988). Η μαλακή σήψη προκαλεί αλλοιώσεις των φρεσκοκομμένων λαχανικών και έχει μελετηθεί σε έτοιμες σαλάτες που περιείχαν αντίδια και ραδίκια. Τα λαχανικά αυτά είχαν υποστεί επεξεργασία (διαλογή, πλύσιμο, κοπή, συσκευασία) διατηρηθήκαν σε θερμοκρασία 10°C και πουλήθηκαν σε 8-10 μέρες. Η αλλοίωση προήλθε κυρίως από φθορίζουσες πηκτινολυτικές ψευδομονάδες όπως *P. fluorescens*. Η *P. fluorescens* επιμολύνει τα φύλλα των λαχανικών στους αγρούς και επειδή είναι ψυχρότροφο βακτήριο επωάζεται και αναπτύσσεται στα λαχανικά κατά την παραμονή τους στα ράφια των ψυγείων των καταστημάτων. Η *Erwinia herbicola* ήταν το επόμενο σημαντικότερο βακτήριο που απομονώθηκε από φυλλώδη λαχανικά όπως το μαρούλι (Nguyen – the and Prunier, 1989; Magnuson *et al.*, 1990).

Σε έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες λάχανου και μαρουλιού διαπιστώθηκε ότι η Ο.Μ.Χ κυμαινόταν από 3×10^4 έως 1×10^6 cfu/g ενώ ο πληθυσμός των ψυχρότροφων κυμαινόταν από 3×10^3 έως 3×10^5 cfu/g. Μεταξύ των ψυχρότροφων βακτηρίων η επικρατέστερη ομάδα ήταν οι ψευδομονάδες. Πολλά μικροβιακά είδη πολλαπλασιάζονται ταχύτατα στα κομμένα λαχανικά. Έτσι βρέθηκε ότι έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά μετά από την παραμονή τους σε ράφια υπό ψύξη (7-10°C), περιείχαν ψευδομονάδες και γαλακτικά βακτήρια παραπάνω από 10^8 cfu/g (Nguyen – the and Prunier, 1989).

Ωστόσο στους 30°C τα γαλακτικά βακτήρια κυριαρχούσαν γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ποσοτική ανάλυση του γαλακτικού οξέος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της υπερβολικής θερμοκρασίας συντήρησης (Francis *et al.*, 1999).

1.6 Παθογόνα βακτήρια στα λαχανικά

Τα πολύτιμα για την υγεία, φυλλώδη πράσινα λαχανικά είναι η συχνότερη πηγή μόλυνσης από παθογόνα βακτήρια ιούς και παράσιτα. Τα λαχανικά έχουν συσχετιστεί επιδημιολογικά με ασθένειες σε πολλές χώρες, αφού είναι ικανά να προκαλέσουν τροφολοιμώξεις. (De Roever 1998; Francis *et al.*, 1999).

Τα τελευταία χρόνια η συχνότητα ασθενειών που σχετίζονται με την κατανάλωση φρέσκων φρούτων και λαχανικών έχει αυξηθεί λόγω της αυξημένης ζήτησης για φρέσκα προϊόντα (Mead *et al.*, 1999).

Τα βακτήρια που προκαλούν ανησυχία για την δημόσια υγεία, διότι μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια ανήκουν στα είδη *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, τα οποία αποτελούν τις πιο συχνές και σοβαρές αιτίες τροφογενών λοιμώξεων. Άλλα βακτήρια που προκαλούν ανησυχία είναι ο *Bacillus cereus*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium perfringens*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio spp.* και *Yersinia enterocolitica*, καθώς και ιοί και παράσιτα όπως τα *Cryptosporidium parvum* και *Cyclospora cayetanensis*. (De Rover, 1998; Beuchat 1998; Tauxe *et al.*, 1997). Οι χρόνοι επιβίωσης των coliforms

(κολοβακτηριδίων) και των παθογόνων βακτηρίων στα περισσότερα νωπά λαχανικά εξαρτώνται από την υγρασία και την θερμοκρασία και επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό το χρόνο ζωής των προϊόντων. Ακόμα και σε περίπτωση που δεν χρησιμοποιείται κοπριά (ως λίπασμα), η επιμόλυνση των λαχανικών από ανθρώπινους παθογόνους παράγοντες είναι συνήθης (Beuchat, 1996).

Στης Ηνωμένες πολιτείες τα ετήσια ποσοστά σαλμονέλωσης είναι υψηλά με καταγεγραμμένες 1,4 εκατομμύρια περιπτώσεις από τις οποίες 500 καταλήγουν σε θάνατο (Kunze *et al.*, 2008). Αρκετά και διαφορετικά είδη που ανήκουν στο γένος *Salmonella* έχουν ανιχνευτεί σε διάφορα λαχανικά (Beuchat, 1996b; Wells and Butterfield, 1997). Εκτεταμένα ξεσπάσματα σαλμονέλωσης έχουν αποδοθεί σε επιμολυσμένους βλαστούς φασολιών (Ο' Mahony *et al.*, 1990a), σέλινο, μαρούλι, λάχανο, αντιδίων, και νεροκάρδαμου (Beuchat, 1996), ντομάτες, πεπόνι, χυμό μήλου και χυμό πορτοκαλιού (Beuchat, 2002).

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA), η σαλμονέλωση και η λιστερίωση κατέχουν την δεύτερη και πέμπτη θέση αντίστοιχα, στην κατάταξη των δέκα πιο συχνά εμφανιζόμενων ασθενειών τροφικής προέλευσης (EFSA, 2005).

Η εντεροτοξινογόνος *E. coli* που αναπτύσσεται στα ωμά λαχανικά έχει αναγνωρισθεί ως μια από τις αιτίες διάρροιας των ταξιδιωτών (Beuchat, 1996). Το μαρούλι ήταν η πηγή σε μια τροφοδηλητηρίαση που ξέσπασε στην Μοντάνα το 1995 από το βακτήριο *E. coli* 0157:H7 και προσέβαλλε πάνω από 100 ανθρώπους (Barnett *et al.*, 1995 ; Beuchat, 1996).

Η *L. monocytogenes* είναι ευρέως διαδεδομένη στην φύση και μπορεί να απομονωθεί από περιπτώματα ζώων, να επηρεάσει την βλάστηση των φυτών καθώς επιβιώνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα στη κοπριά (Beuchat *et al.*, 1990; Beuchat, 1996). Τα νωπά λαχανικά είναι εν δυνάμει φορείς για ανθρώπινη λιστερίωση. Το σέλινο, οι ντομάτες και το μαρούλι, έχουν εμπλακεί σε περιστατικά με επιδημιολογικές συνέπειες (Ho *et al.*, 1986; Odumeru *et al.*, 1997). Στην Αμερική η *L. monocytogenes* ανιχνεύτηκε σε λάχανα, αγγούρια, πατάτες μαρούλια και ρεπανάκια της αγοράς (Heisick *et al.*, 1989; De Simon *et al.*, 1992). Ο ρυθμός όμως ανάπτυξης της *Listeria* στα λαχανικά σπανίως είναι υπερβολικός. Ωστόσο η συχνότητα της επιμόλυνσης ποικίλλει

ανάλογα με τον τόπο συγκομιδής, την θερμοκρασία, τα λιπάσματα, την πλύση κ.ο.κ (NACMCF, 1991).

1.7 Μικροοργανισμοί ως δείκτες ποιότητας των τροφίμων.

Μικροοργανισμοί δείκτες είναι ομάδες μικροοργανισμών οι οποίοι μπορούν εύκολα να προσδιορισθούν και των οποίων η παρουσία όταν υπερβαίνει ορισμένα προκαθορισμένα όρια για κάθε είδος τροφίμου, θεωρείται ένδειξη παραμονής του τροφίμου σε συνθήκες στις οποίες είναι πιθανή η μόλυνση του με παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί δείκτες αντανακλούν τη μικροβιολογική ποιότητα των τροφίμων σε σχέση με την διάρκεια συντηρήσεως τους ή την ασφάλεια των τροφίμων από τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως δείκτες της ασφάλειας των τροφίμων είναι τα εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae*), τα κολοβακτηριοειδή (*coliforms*), τα κολοβακτηριοειδή κοπράνων (*Faecal coliforms*), η *E. coli*, και οι εντερόκοκκοι (Κοτζεκίδου, 2000).

1.7.1 Εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae*)

Τα εντεροβακτήρια χρησιμοποιούνται χρόνια στην Ευρώπη σαν δείκτες ποιότητας και ασφάλειας τροφίμων.

Τα εντεροβακτήρια αποτελούν μια σχετικά ομοιογενή φυλογενετική ομάδα των γ- πρωτεοβακτηρίων και έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: είναι gram αρνητικά βακτήρια, μη σπορογόνα, ραβδόμορφα, ακίνητα ή αυτοκινούμενα με περίτριχα μαστίγια, προαιρετικά αναερόβια, αρνητικά στην δοκιμή οξειδάσης, ζυμώνουν τη γλυκόζη προς οξύ. Η οικογένεια *Enterobacteriaceae* περιλαμβάνει τα γένη: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* και *Yersinia* (Kornacki *et al.*, 2001).

1.7.2 Κολοβακτηρίδια (*coliforms*)

Τα κολοβακτηριοειδή χρησιμοποιούνται ως βακτηριακοί δείκτες κατά τη μικροβιακή ανάλυση της υγειονομικής ποιότητας των τροφίμων και του νερού ή σαν δείκτες εντερικής ρύπανσης του τροφίμου.

Ο όρος κολοβακτηριοειδή επινοήθηκε από τον Blachstein το 1893, για να αναφερθεί σε βάκιλους οι οποίοι είχαν κοινά γνωρίσματα με την *E. coli* και σχημάτιζαν παρόμοιες αποικίες. Τα κολοβακτηριοειδή είναι οργανισμοί αερόβιοι, gram αρνητικοί, ραβδόμορφοι, μη σπορογόνοι, που ζυμώνουν την λακτόζη προς όξυ και αέριο σε 48 ώρες στους 35-37⁰C.(Kornacki *et al.*, 2001).

Τα coliforms είναι πλατιά διαδεδομένα στο περιβάλλον και βρίσκονται στο έδαφος, στο νερό, και στην βλάστηση των φυτών (Jay *et al.*,1996). Στην ομάδα αυτή συμπεριλαμβάνονται τα γένη *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* και *Klebsiella*. Τα κολοβακτηρίδια βρίσκονται στα περιττώματα των θερμόαιμων ζώων. Από αυτά η *Escherichia coli*, έχοντας για βιότοπο το κατώτερο τμήμα του εντέρου των θερμόαιμων ζώων, θεωρείται βέβαιης εντερικής προέλευσης. Έτσι η παρουσία της *E. coli* σε ένα τρόφιμο σημαίνει τη βέβαιη ρύπανση του με κόπρανα, άμεσα ή έμμεσα. Σχεδόν το 100% των στελεχών της *E. coli* προκαλούν ζύμωση της λακτόζης προς οξύ και αέριο στους 44,5⁰C. Για αυτό η δοκιμή αυτή, χρησιμεύει για την γρήγορη ταυτοποίηση των κολοβακτηριοειδών εντερικής προέλευσης.

Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Klebsiella* είναι πιθανής εντερικής προέλευσης. Τα γένη *Enterobacter* και *Citrobacter* είναι συνήθως φυτικής προέλευσης (Kornacki *et al.*, 2001).

1.7.3 Escherichia coli

1.7.3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Η *E. coli* ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Είναι ένα Gram αρνητικό προαιρετικά αναερόβιο και μη σπορογόνο βακτήριο. Τα κύτταρα του έχουν μήκος περίπου 2μm, διάμετρο 0,5μm και όγκο 0,6-0,7 μm³ και η κίνηση τους υποβοηθείται από περίτριχα μαστίγια (Kubitschek, 1990). Είναι θετικό στην καταλάση και αρνητικό στο τεστ της οξειδάσης (Gu *et al.*, 2009).

1.7.3.2 Συνθήκες ανάπτυξης της *E. coli*

Η *E. coli* είναι ένα χαρακτηριστικό μεσόφιλο βακτήριο που αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 7 – 37 °C με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37 °C. (Jones *et al.*, 2003).

Η *E. coli* πολλαπλασιάζεται και σε pH 4,4 και έχει ελάχιστη τιμή ενεργότητας νερού (aw) 0,95 (Gabriel and Nakana, 2010).

1.7.3.3 Παθογένεια της *E. coli*

Κατά την ανίχνευση και την καταμέτρηση της *E. coli*, τα απομονωμένα στελέχη πρέπει να συμφωνούν με τα βασικά χαρακτηριστικά των coliforms και των coliforms εντερικής προέλευσης. Παραδοσιακά η διαφοροποίηση του γένους *Escherichia* από τα άλλα κολοβακτηρίδια γίνεται με τις δοκιμές IMVIC.

Το βακτήριο *E. coli* αποτελεί τον πιο εξειδικευμένο δείκτη υγειονομικής σημασίας. Η παρουσία του βακτηρίου *E. coli* προσδιορίζεται με μια σειρά βιοχημικών δοκιμών, που είναι γνωστή με τη συνοπτική ονομασία IMVIC, όπου το **I** αναφέρεται στη παραγωγή ινδόλης από τον μεταβολισμό της τρυπτοφάνης, το **M** δείχνει τη δυνατότητα του οργανισμού να σχηματίζει οξύ από γλυκόζη όπου ανιχνεύεται από την αντίδραση του ερυθρού του μεθυλενίου, το **V** αναφέρεται στην παραγωγή 2,3-βουτανεδιόλης ή ακετοΐνης από τον μεταβολισμό της γλυκόζης και το **C** αντιπροσωπεύει τη δυνατότητα του βακτηρίου να αποικοδομεί τα κίτρινα ιόντα ως μόνη πηγή άνθρακα. (Komacki *et al.*, 2001).

Το 1885, ο παθογόνος μικροοργανισμός *E. coli* απομονώθηκε αρχικά από παιδικά περιπτώματα και περιγράφηκε από τον Γερμανό παιδίατρο Theodor Escherich. Η *E. coli* είναι σχεδόν μόνιμος κάτοικος του εντέρου των θερμόαιμων ζώων και του ανθρώπου. Παρά το γεγονός ότι είναι ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο μπορεί να προκαλέσει διάφορες μολύνσεις όπως Gram αρνητική σηψαιμία, μολύνσεις της ουροδόχου κύστης, πνευμονία σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς καθώς και μηνιγγίτιδα στα νεογνά. Η *E. coli* σε ένα τρόφιμο σημαίνει βέβαιη ρύπανση του με κόπρανα και για αυτό πήρε

την ονομασία του μικροοργανισμού *E. coli* [(M.R. Adams and M.O. Moss (2008)], ως δείκτης κοπρανώδους μόλυνσεως.

Τα στελέχη της *E. coli* που αναγνωρίστηκαν ταξινομήθηκαν στους παρακάτω τύπους:

- Εντεροπαθογόνος *E. coli* (EPEC).
- Εντεροδιδεισδυτική *E. coli* (EIEC).
- Εντεροτοξινογόνος *E. coli* (ETEC).
- Εντεροαιμορραγική *E. coli* (EHEC).
- Εντεροσυσσωματωμική *E. coli* (EaggEC).

Τα ενεροπαθογόνα στελέχη (EPEC) έχουν συνδεθεί με την νηπιακή διάρροια. Η εντεροδιδεισδυτική *E. coli* (EIEC), προκαλεί συμπτώματα μιας βακτηριακής δυσεντερίας όπως έλκος και αιματώδης διάρροια. Τα εντεροτοξινογόνα στελέχη *E. coli* (ETEC) συνδέονται με την αποκαλούμενη διάρροια των ταξιδιωτών. Εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (EHEC) έχουν αναγνωρισθεί ως αιτία επιδημιολογικών εξάρσεων αιμορραγικής κολίτιδας και αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (Haemolytic Uremic Syndrome – HUS), ειδικότερα ο ορότυπος 0157:H7 (Lim *et al.*, 2007).

1.7.3.4 Τρόφιμα που σχετίζονται με *E. coli* – Παθογένεια

Έχει εκτιμηθεί ότι η *E. coli* 0157:H7 είναι υπεύθυνη για πάνω από 20.000 κρούσματα διάρροιας (Yilmaz *et al.*, 2006), για 73.000 περιπτώσεις μόλυνσης από το βακτήριο (Yang *et al.*, 2007), 10.800 νοσηλείες σε νοσοκομείο και 61 θανάτους στις Η.Π.Α. ετησίως (Jo *et al.*, 2007, Charimba *et al.*, 2010). Τα περισσότερα κρούσματα έχουν συνδεθεί με κατανάλωση τροφίμων φυτικής και ζωικής προέλευσης, ενώ η μετάδοση των παθογόνων λαμβάνει χώρα κυρίως από την κατανάλωση διαφόρων τροφίμων όπως του μη επαρκώς θερμικά επεξεργασμένου βοδινού κιμά, του νωπού γάλακτος, των τυριών προερχομένων από μη παστεριωμένο γάλα, των ζυμωμένων προϊόντων κρέατος, του νερού, των χυμών, καθώς και των ακατέργαστων λαχανικών (Eribo and Ashenafi, 2003).

Τα μηρυκαστικά ζώα και ποιο συγκεκριμένα η γαστροεντερική οδός των υγιών ζώων είναι η κύρια αναγνωρισμένη πηγή του οργανισμού ως μέρος

της ενδογενούς μικροχλωρίδας του εντέρου. Επομένως τα στελέχη της *E. coli* μπορούν να εισέλθουν στο τρόφιμο κατά την διάρκεια της επεξεργασίας των προϊόντων εφόσον οι συνθήκες υγιεινής είναι ανεπαρκείς. Επίσης τα στελέχη της *E. coli* μπορούν να επηρεάσουν τους ανθρώπους έμμεσα μέσω των περιπτώσεων που χρησιμοποιούνται και ως κοπριά. (Zhu *et al.*, 2009).

1.8 Ολική μεσόφιλη χλωρίδα

Ολική μεσόφιλη χλωρίδα ονομάζεται ο πληθυσμός των βακτηρίων που αναπτύσσονται στο άγαρ καταμέτρησης (Plate Count Agar) σε αερόβιες συνθήκες και θερμοκρασία επώασης 35°C για 48±3 ώρες. Για την εκτίμηση της “ολικής μεσόφιλης χλωρίδας” χρησιμοποιείται η μέθοδος καταμέτρησης των αποικιών σε τρυβλία. Πρόκειται για την τεχνική “Aerobic Plate Count” ή “Standard Plate Count”. Η παραπάνω μέθοδος βασίζεται στη παραδοχή ότι κάθε μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσεται στο άγαρ και μπορεί να σχηματίσει μια αποικία. Η παραδοχή αυτή είναι μερικώς μονό σωστή γιατί: α) τα μικροβιακά κύτταρα του δείγματος του τροφίμου ανήκουν σε διαφορετικά είδη με διαφορετικές φυσιολογικές απαιτήσεις και έτσι δεν αναπτύσσονται όλα κάτω από τις ίδιες συνθήκες, β) μια αποικία δεν προέρχεται πάντα από ένα μόνο μικροβιακό κύτταρο. Δυο ή περισσότερα μικροβιακά κύτταρα βρίσκονται κολλημένα μεταξύ τους σχηματίζοντας μια αποικία. Για τον παραπάνω λόγο, τα αποτελέσματα της εκτίμησης του ζωντανού μικροβιακού φορτίου ενός τροφίμου, εκφράζεται σε μονάδες που σχηματίζουν αποικίες”, (C.F.U. Colony Forming Units/g τροφίμου) (Δεληγκάρης, 1992)

1.9 *Listeria monocytogenes*

1.9.1 Γενικά

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes*, είναι η αιτία για την ανθρώπινη και ζωική λιστερίωση και έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία 20 χρόνια (Schlech, 2000).

Αν και ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1891, περιγράφηκε αναλυτικά από τους Murray, Webb και Swann το 1926, όταν ο Murray ανακάλυψε αυτόν τον μικροοργανισμό ως αιτία για ζωική ασθένεια. Αρχικά ο μικροοργανισμός ονομάστηκε *Bacterium monocytogenes*, και στη συνέχεια πήρε το όνομα *Listeria monocytogenes* προς τιμήν του Λόρδου Lister. Η ονομασία *Listeria monocytogenes* έγινε αποδεκτή το 1940 (Data R. Atin, 2003). Επίσης η *L. monocytogenes* διαπιστώθηκε ότι ήταν παθογόνο και για τον άνθρωπο και προξενούσε την σοβαρή ασθένεια που ονομάστηκε λιστερίωση (*listeriosis*) (Jay, M.J. 2000).

Από τότε μέχρι σήμερα, αποδείχθηκε πως είναι παθογόνο για περισσότερα από 50 θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων, καθώς επίσης και για τα πτηνά, τα έντομα, τα αμφίβια, τα ψάρια και τα οστρακόδερμα (Jay Lossner and Golden, 2005).

Η *L. monocytogenes* είναι ένα παθογόνο βακτήριο που έχει προκαλέσει μεγάλη ανησυχία στις βιομηχανίες τροφίμων, διότι είναι ευρέως διαδεδομένη στο περιβάλλον και έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται και σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε σχετικά υψηλά επίπεδα άλατος (Gravessen *et al.*, 2002)

1.9.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Η *L. monocytogenes* είναι ένα gram- θετικό βακτήριο, μη σπορογόνο, προαιρετικά αναερόβιο, ραβδόμορφο με διαστάσεις που κυμαίνονται από 0,4-0,5 μm διάμετρο και 0,5-2μm μήκος που συχνά εμφανίζει αλυσίδες κυττάρων. Από πολλές απόψεις είναι παρόμοιο με το γένος *Brochothrix*, και τα δυο γένη είναι θετικά στο τεστ καταλάσης.

Η *L. monocytogenes* εμφανίζει κίνηση με την βοήθεια των περιτρίχων μαστίγιων. Ο βαθμός της κινητικότητας της εξαρτάται από την θερμοκρασία. Εμφανίζει κίνηση στους 20-25⁰C, ενώ από τους 37⁰C και πάνω μειώνεται η κινητικότητα (Lovett, 1989; Farber και Peterkin, 1991; M.R. Adams και M.O. Moss, 2008).

1.9.3 Ταξινόμηση της *Listeria*

Το γένος *Listeria* περιλαμβάνει έξι διαφορετικά είδη, τα οποία κατατάσσονται σε δυο κατηγορίες. Η μια κατηγορία περιλαμβάνει πέντε είδη που σχετίζονται πιο πολύ μεταξύ τους, την *L. monocytogenes*, την *L. innocua*, την *L. ivanovii*, την *L. welshimeri*, και την *L. seeligeri*. Η άλλη κατηγορία περιλαμβάνει την *L. grayi* [(Seafood HACCP Alliance (2007)]. Έχουν όμως αναφερθεί και άλλα δυο είδη αμφιβόλου ταξινομήσεως τα οποία είναι η *L. murrayi* και η *L. denitrificaus*. (Τζανετάκης Ν., 2004).

Τα έξι είδη *Listeria* χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη αντιγόνων που δημιουργούν 17 ορότυπους (serovars). Τα βασικά παθογόνα είδη, *L. monocytogenes* αντιπροσωπεύονται από 13 ορότυπους, κάποιοι από τους οποίους μοιράζονται από την *L. innocua* και τη *L. seeligeri* (Jay, Loessner and Golden, 2005). Από τους ορότυπους αυτούς, αυτοί που μπορούν να προκαλέσουν τις περισσότερες λοιμώξεις στον άνθρωπο και στα ζώα είναι οι τύποι 1a, 2a και 4b. Από τα έξι είδη της *Listeria*, η *L. monocytogenes* είναι παθογόνο στέλεχος για τον άνθρωπο, όπως επίσης και η *L. ivanovii*. Η *L. innocua*, *L. welshimeri* και *L. seeligeri* είναι μη παθογόνα στελέχη για τον άνθρωπο (Doganay, 2003).

1.9.4 Συνθήκες ανάπτυξης της *Listeria*

Η *Listeria* αναπτύσσεται καλά στα περισσότερα κοινά υποστρώματα όπως το brain heart infusion broth (BHI), και το tryptic- soy broth με 0,6% yeast extract (TSBYE). Η *L. monocytogenes* μπορεί επίσης να αναπτυχθεί σε ορισμένα συνθετικά και ημισυνθετικά μέσα. Ο ρυθμός ανάπτυξης της σε αυτά είναι πολύ πιο αργός από ότι στα πλούσια θρεπτικά υποστρώματα. Η *Listeria* αναπτύσσεται σε θερμοκρασία από 1-44⁰C, η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης της είναι 30-37⁰C με άριστη αυτή των 37⁰C. Είναι ψυχροτρόφο και αναπτύσσεται και σε θερμοκρασία ψυγείου (4⁰C) (Lovett, 1989; Farder and Peterkin, 1991).

Η *L. monocytogenes* σε θερμοκρασία ψύξης, δηλαδή από 0⁰C ως 4⁰C (θερμοκρασία οικιακών αλλά και βιομηχανικών ψυγείων) όχι μόνο δεν

παρεμποδίζεται αλλά πολλαπλασιάζεται και καθιστά το τρόφιμο επικίνδυνο για κατανάλωση (Pinner *et al.*, 1992; ICMSF, 1996).

Η *Listeria* πολλαπλασιάζεται σε εύρος pH από 5-9 στα τρόφιμα αλλά και μέχρι 4,3 σε ζυμούς εργαστηρίου. Η άριστη τιμή pH για την ανάπτυξή της είναι το 7,0 (Wederquist *et al.*, 1994). Αντέχει στο αλάτι σε συγκέντρωση μέχρι και 10%. Όσον αφορά την ενεργότητα του νερού (a_w) η *L. monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε τιμές $a_w > 0,92$ (Κουτσουμάνης, 2004).

1.9.5 Τρόφιμα που σχετίζονται με *L. monocytogenes*

Η *L. monocytogenes* έχει απομονωθεί από διάφορα τρόφιμα ζωικής και φυτικής προέλευσης. Είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση, με πιθανές πηγές μόλυνσης την σάπια βλάστηση, το έδαφος, τα επιφανειακά νερά, τα νερά των ποταμών, τα νερά των καναλιών και τα απόβλητα (Beuchat and Brackett, 1990). Δεδομένου ότι η *L. monocytogenes* εμφανίζεται ευρέως στο χώμα, μεταδίδεται έτσι σε πολλά νωπά λαχανικά (Mc Lauchlin *et al.*, 2004). Σύμφωνα με την Διεθνή Βιβλιογραφία η *L. monocytogenes* έχει απομονωθεί από γαλακτοκομικά προϊόντα, κυρίως μαλακά τυριά (Pinner *et al.*, 1992), από νωπό και παστεριωμένο γάλα (Kim *et al.*, 1994), από κρεατοσκευάσματα (Okutani *et al.*, 2004) όπως αλλαντικά, από νωπά και μαγειρεμένα κοτόπουλα, βρασμένα λουκάνικα (Thayer *et al.*, 1995), ζυμούμενα σαλάμια και λουκάνικα (Whiting *et al.*, 1994), από νωπά λαχανικά και θαλασσινά (Kim *et al.*, 1994).

1.10 Λιστερίωση (*Listeriosis*)

Η *L. monocytogenes* είναι παθογόνος μικροοργανισμός και προκαλεί την σοβαρή ασθένεια που ονομάζεται λιστερίωση (*listeriosis*). Η *L. monocytogenes* είναι ένας μικροοργανισμός του οποίου η επικινδυνότητα, τις προηγούμενες δεκαετίες, δεν λαμβανόταν σοβαρά υπόψη ειδικά από τις βιομηχανίες τροφίμων. Την δεκαετία του '80 είχε κατηγορηθεί ως γενεσιουργό αίτιο τροφικών λοιμώξεων σε όλο τον κόσμο, διότι σε αυτήν την περίοδο

αποκαλύφθηκε το μέγεθος της επικινδυνότητας της λιστερίωσης (Farder and Perkin, 1991).

Περιπτώσεις λιστερίωσης έχουν αναφερθεί σχεδόν σε όλα τα μέρη του κόσμου. Στις Ηνωμένες Πολιτείες τα ετήσια ποσοστά λιστερίωσης είναι χαμηλά. Το 2003, 2.500 άτομα εμφάνισαν τη νόσο, από τα οποία τα 500 κατέληξαν. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την *L. monocytogenes* ως μια σοβαρή απειλή για την δημόσια υγεία (CDC, 2003). Αν και πολλοί άνθρωποι έρχονται σε επαφή με το παθογόνο, μερικοί μόνο παθαίνουν λιστερίωση (Slutsker *et al.*, 1999). Στην Ευρώπη η συχνότητα εμφάνισης της λιστερίωσης είναι 0,3 κρούσματα ανά 10.000 άτομα, με τα περισσότερα να καταγράφονται στη Δανία, το Βέλγιο, την Φιλανδία, τη Γερμανία και την Ολλανδία (EFSA, 2005). Το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας από λιστερίωση κυμαίνεται μεταξύ 20 - 30% και αφορά κυρίως ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Wareing *et al.*, 2007)

1.10.1.1 Συμπτώματα ασθένειας και μετάδοσης στον άνθρωπο – Παθογένεια.

Η λιστερίωση εμφανίζεται συνήθως ως ασθένεια που προσβάλλει τους ευαίσθητους πληθυσμούς, όπως τις έγκυες γυναίκες, τα νεογνά, τους ηλικιωμένους και τα άτομα με αποδυναμωμένο ανοσοποιητικό σύστημα (Jay, M.J. 2000).

Οι περίοδοι επώασης για την ασθένεια ποικίλουν από 1 έως 90 ημέρες, κάτι το οποίο καθιστά δύσκολο τον εντοπισμό των ένοχων τροφίμων. Τα συμπτώματα της ασθένειας μπορεί να ποικίλουν από μια ήπια ασθένεια τύπου γρίπης μέχρι μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα και ενδοκαρδίτιδα. Η λιστέρια μπορεί να προκαλέσει λίγα ή καθόλου συμπτώματα σε υγιή άτομα, αλλά μπορεί να είναι πολύ επικίνδυνη σε έγκυες γυναίκες και βρέφη. Η λιστέρια μπορεί να μεταδοθεί στο αγέννητο έμβρυο και να οδηγήσει σε αποβολή, στην γέννηση νεκρού εμβρύου και στον πρόωρο τοκετό (Mc Lauchlin *et al.*, 2004). Τα συμπτώματα που εμφανίζουν, οι έγκυες γυναίκες συνήθως είναι ήπια και μοιάζουν με γρίπη (πυρετό πονοκεφάλους και γαστρεντερικά συμπτώματα). Στους ενήλικες η ασθένεια της λιστέριας χαρακτηρίζεται από συμπτώματα

σηφαιμίας και μινηγγίτιδας. (M.R. Adams and M.O Moss. 2000; Szado *et al.*, 2003).

Λοιμώξεις από το παθογόνο αυτό βακτήριο μπορεί να εμφανιστούν σε άτομα, τα οποία ακολουθούν κάποια φαρμακευτική αγωγή (διαβήτη, λευχαιμία, AIDS, καρκίνο, ηπατίτιδα, αρθρίτιδα). Η μολυσματική δόση της λιστέριας είναι άγνωστη αλλά θεωρείται ότι ποικίλλει ανάλογα με την ευαισθησία του ανθρώπου. (Conner *et al.*, 1989; Rocourt, 1996). Γενικά η πηγή και η πορεία της ασθένειας δεν καθορίζεται, εν τούτοις η σύνδεση της μόλυνσης με διάφορα τροφικά ξεσπάσματα οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα τρόφιμα μπορούν να είναι σημαντική πηγή μετάδοσης του παθογόνου (Farder, J.M, and Peterkin P.I., 1991).

1.11 Νομοθεσία σχετικά με την *L. monocytogenes* και *E. coli* στα τρόφιμα.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση τον Ιανουάριο του (2005), εξέδωσε την Οδηγία (Commission Regulation, EC) 2073/2005 σχετικά με τα μικροβιολογικά κριτήρια των τροφίμων. Για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, στα οποία μπορεί να αναπτυχθεί η *L. monocytogenes*, ο νέος Κανονισμός απαιτεί την απουσία του παθογόνου (σε 25g) <<προτού το τρόφιμο εγκαταλείψει τον άμεσο έλεγχο του χειριστή της επιχείρησης τροφίμων, που το παρήγαγε>>, αλλά επιτρέπεται μέχρι 100 cfu/g για <<προϊόντα στην αγορά κατά την διατήρησή τους στο ράφι>>. Ο κανονισμός της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της 15 Νοεμβρίου 2005, για τα έτοιμα προς κατανάλωση κομμένα λαχανικά, στα οποία μπορεί να αναπτυχθεί η *E. coli* δηλώνει ότι, όταν έχουμε n=5 (αριθμός μονάδων δειγματοληψίας που αποτελούν το δείγμα) και c=2 (αριθμός μονάδων δειγματοληψίας με τιμές που είναι μεταξύ 100 cfu/g και 1000 cfu/g) η ποιότητα του προϊόντος είναι:

Ικανοποιητική, εάν όλες οι τιμές που παρατηρούνται είναι ≤ 100 cfu/g.

Αποδεκτή, εάν ο μέγιστος αριθμός δειγματοληπτικών μονάδων c/n (2/5) έχει τιμές μεταξύ 100 cfu/g και 1000 cfu/g και οι υπόλοιπες τιμές που παρατηρούνται είναι ≤ 100 cfu/g .

Μη ικανοποιητική, εάν μία ή περισσότερες από τις τιμές που παρατηρούνται είναι >1000 cfu/g ή αριθμός δειγματοληπτικών μονάδων μεγαλύτερος από c/n έχει τιμές μεταξύ 100 cfu/g και 1000 cfu/g.

2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη συγκεκριμένων μικροοργανισμών που βρίσκονται στο μαρούλι και η μελέτη της επιβίωσης της *L. monocytogenes* σε διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης.

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 24 δείγματα πλατύφυλλου μαρουλιού τύπου Ρωμάνα. Όλα τα δείγματα αγοράστηκαν την ημέρα του πειράματος από τοπικό κατάστημα της Θεσσαλονίκης και μεταφέρθηκαν αμέσως στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΤΕΙΘ για τις μικροβιολογικές αναλύσεις.

Τα πρώτα 15 δείγματα υποβλήθηκαν στις παρακάτω αναλύσεις:

1. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα. (Ο.Μ.Χ.).
2. Αρίθμηση κολοβακτηριδίων (coliforms)
3. Αρίθμηση *E. coli*
4. Αρίθμηση της *Listeria*

Τα υπόλοιπα 9 δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* στο μαρούλι. Τα δείγματα επωάστηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 4, 25 και 30°C. Η πειραματική διαδικασία έγινε χρησιμοποιώντας τρία δείγματα για κάθε θερμοκρασία επώασης.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πλατύφυλλο μαρούλι.

Μαρούλι τύπου Ρωμάνο αγοράστηκε από τοπικό κατάστημα την ημέρα του πειράματος. Πριν τον τεμαχισμό, αφαιρέθηκε η περιττή υγρασία που μπορεί να είχε το μαρούλι, ανακινώντας το με απότομη κίνηση. Κατόπιν αφαιρέθηκαν τα εξωτερικά φύλλα και η κεφαλή.

3.1.1 Προετοιμασία δειγμάτων μαρουλιού για καταμέτρηση μικροβιακής χλωρίδας – Παρασκευή αραιώσεων.

Τα δείγματα μαρουλιού εξετάστηκαν για την παρουσία Ο.Μ.Χ., coliforms, *E. coli* και *Listeria*. Μεταφέρθηκαν ασηπτικά 10g δείγματος σε αποστειρωμένη σακούλα stomacher, στην οποία προστέθηκαν 90ml αραιωτικού. Ακολούθησε ομογενοποίηση στο stomacher (Seward 400) για 30 sec. Σκοπός της ομογενοποίησης είναι να καταλείψει τα μικρόβια όσο γίνεται ποιο ομοιόμορφα μέσα στην πρώτη αραιώση, ώστε να ληφθεί αντιπροσωπευτική εικόνα της ολικής μικροβιακής χλωρίδας του μαρουλιού. Μετά την παρασκευή της αρχικής αραιώσης παρασκευάστηκαν οι υπόλοιπες δεκαδικές αραιώσεις (10^{-2} , 10^{-3} ... 10^{-n}), με την μεταφορά 1ml από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9πλάσια ποσότητα αραιωτικού.

Για ποιο ακριβή αποτελέσματα κατά τη διάρκεια της παρασκευής των αραιώσεων τηρηθήκαν οι παρακάτω κανόνες:

- Κατά την μεταφορά του 1ml από την μια αραιώση στην επόμενη, οι σωλήνες ανακινήθηκαν επί 30sec.
- Για κάθε αραιώση χρησιμοποιήθηκε νέο αποστειρωμένο σιφώνιο.
- Όλη η διεργασία εκτελέστηκε κοντά στον λύχνο.

3.1.2 Ενοφθαλμισμός των τρυβλίων Petri.

Τα τρυβλία Petri ενοφθαλμίστηκαν με δύο τρόπους, με την τεχνική της ενσωμάτωσης και την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης. Η τεχνική της ενσωμάτωσης εφαρμόστηκε στα δείγματα που εξετάστηκαν μικροβιολογικά ως προς την ολική μεσόφιλη χλωρίδα, τον ολικό αριθμό κολοβακτηριδίων και

την αρίθμηση της *E. coli*. Από κάθε δεκαδική αραιώση του δείγματος μεταφέρθηκε και τοποθετήθηκε 1ml αιωρήματος στο κέντρο του αποστειρωμένου τρυβλίου. Ενοφθαλμίστηκαν 2 τρυβλία από κάθε αραιώση. Σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν περίπου 15ml λιωμένου υποστρώματος θερμοκρασίας 45-46⁰C. Η ανάμιξη του ενοφθαλμίσματος με το υπόστρωμα έγινε με ήπιες κυκλικές κινήσεις. Για την ανάπτυξη και την καταμέτρηση του βακτηρίου *Listeria* εφαρμόστηκε η τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης. Μετά την ομογενοποίηση του δείγματος 0,1 ml αιωρήματος τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια των τρυβλίων που περιείχαν εκλεκτικό υπόστρωμα με αντιβιοτικά Palcam *Listeria* Selective Agar (Merck, Germany).

3.1.3 Επώαση και καταμέτρηση αποικιών.

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και την καταμέτρηση των βακτηρίων ήταν τα ακόλουθα: P.C.–Αγαρ (Plate Count - Αγαρ), V.R.B.–Αγαρ (Violet Red Bile -Αγαρ), Palcam *Listeria* Selective- Αγαρ (Merck, Germany).

Μετά τον ενοφθαλμισμό, και την πήξη των υποστρωμάτων, τα τρυβλία αναστράφηκαν και επώαστηκαν στον κλίβανο στις παρακάτω θερμοκρασίες:

Ολική μεσόφιλη χλωρίδα : Στους 30⁰C 72 h (P.C.A)

Coliforms : στους 37⁰C για 24 h(V.R.B.A)

E. coli: στους 44,5⁰C για 24h (V.R.B.A)

Listeria: στους 37⁰C για 48h (Palcam *Listeria* Selective Agar)

Η παρασκευή των υποστρωμάτων περιλάμβανε τη διάλυση των επιμέρους συστατικών (παράρτημα) με θέρμανση, τη ρύθμιση του pH, τη διανομή σε κωνικές φιάλες, την αποστείρωση στους 121⁰C για 15 min και τη διανομή με έγχυση στα τρυβλία. Μετά την στερεοποίηση του υποστρώματος τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα στον επωαστικό κλίβανο.

Μετά την επώαση ακολούθησε η καταμέτρηση των αποικιών. Εξετάστηκαν τρία δείγματα για κάθε θερμοκρασία συντήρησης. Για τον υπολογισμό των βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων από κάθε αραιώση. Η καταμέτρηση των αποικιών έγινε από τα

τροβλία των αραιώσεων με αριθμό αποικιών μεταξύ 25 και 250. Για κάθε πειραματική διαδικασία, έγιναν 5 πειράματα με 3 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως δεκαδικοί λογάριθμοι ανά γραμμάριο μαρουλιού (log cfu/g).

3.1.4 Δοκιμές επιβίωσης της *L. monocytogenes* σε διαφορετικές θερμοκρασίες στα μαρούλια.

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μαρουλιού τύπου Ρωμάνο, για να μελετηθεί η επιβίωση του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes* στις θερμοκρασίες 4, 25 και 30°C και διαφορετικούς χρόνους συντήρησης στις



παραπάνω θερμοκρασίες. Κόπηκε με αποστειρωμένο μαχαίρι και υπό ασηπτικές συνθήκες κυκλικό τεμάχιο του φύλλου, ίσο με το μέγεθος ενός τρυβλίου (ακτίνα: 4,5 cm), προσέχοντας να μην συμπεριληφθεί στο δείγμα το κεντρικό νεύρο του φύλλου. Το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε

αποστειρωμένο τρυβλίο, με την επάνω επιφάνεια του φύλλου να βρίσκεται στην ανοιχτή πλευρά του τρυβλίου, ώστε να είναι δυνατός ο εμβολιασμός του με το παθογόνο βακτήριο.

Συγκεκριμένα το μαρούλι ενοφθαλμίσθηκε με 150μl αναιωρήματος *L. monocytogenes*, που μεταφέρθηκαν από την τρίτη αραιώση (10^{-3}) μιας 48ωρης καλλιέργειας του βακτηρίου και τοποθετήθηκαν ομοιόμορφα με τη μορφή σταγόνων στην επιφάνεια του μαρουλιού. Τα δείγματα επωάστηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 4, 25 και 30°C.

3.1.4.1 Το στέλεχος *L. monocytogenes*

Το βακτήριο *L. monocytogenes* 4b που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία έχει απομονωθεί από σαλάτα λάχανο-καρότο ή οποία προκάλεσε τροφολοίμωξη το 1981 στην Αμερική και είναι μια δωρεά του

Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Σχολή Γεωπονίας, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων.

3.1.4.2 Προετοιμασία ενοφθαλμισμού – παρασκευή αραιώσεων - Πειραματική διαδικασία

Πριν την έναρξη του πειράματος απομονώθηκε το στέλεχος *L. monocytogenes* από το υπόστρωμα Palcam (Merck, Germany) και τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 7ml εμπλουτισμένο θρεπτικό ζωμό και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο επώασης στους 37⁰C για 24h. Μετά από 24h οι δοκιμαστικοί σωλήνες ανακινήθηκαν και ακολούθησε μια σειρά δεκαδικών αραιώσεων χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο πεπτονούχο νερό. Ποσότητα 1ml από την καλλιέργεια μεταφέρθηκε από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9ml αραιωτικό. Ακολούθησε ο ενοφθαλμισμός των τρυβλίων με 150μl από την δεκαδική αραιώση 10⁻³ καθαρής καλλιέργειας *L. monocytogenes*. Μετρήσεις του πληθυσμού της *L. monocytogenes* στο εμβολιασμένο μαρούλι έδειξαν πως η συγκέντρωση των μικροβιακών κυττάρων ήταν της τάξης του 10³ - 10⁴ cfu/cm². Μετά τον εμβολιασμό τους τα δείγματα επωάστηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες στους 4, 25 και 30⁰C. Σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα επώασης στις παραπάνω θερμοκρασίες έγινε δειγματοληψία. Εξετάστηκαν τρία δείγματα για κάθε χρόνο και κάθε θερμοκρασία..

Μετά την επώαση που έγινε σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και χρόνο το κυκλικό τεμάχιο φύλλο αφαιρέθηκε ασηπτικά από το τρυβλίο και μεταφέρθηκε σε σακούλα Stomacher. Προστέθηκαν στην σακούλα 50ml αραιωτικό και ακολούθησε ανάδευση στο stomacher (seward 400) σε normal speed για 30 sec.

3.1.4.3 Καταμέτρηση αποικιών

Μετά την ομογενοποίηση σε stomacher ποσότητα 1ml από το ομογενοποιημένο δείγμα αραιώθηκε δεκαδικά και 0,1ml του ενοφθαλμισματος

τοποθετήθηκε στην επιφάνεια των τρυβλίων σε εκλεκτικό υπόστρωμα με αντιβιοτικά Palcam *Listeria* Selective Agar (Merck Germany).

Αφού διατηρήθηκαν τα τρυβλία σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για 48h, έγινε καταμέτρηση των αποικιών της *L. monocytogenes*. Για τον υπολογισμό των βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων από κάθε αραίωση. Η επιλογή του κατάλληλου τρυβλίου που χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση, έγινε με βάση τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο. Ο αριθμός των αποικιών στα τρυβλία που επιλέχθηκαν ήταν μεταξύ 25 και 250. Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται σε δεκαδικούς λογάριθμους $\log \text{cfu cm}^{-2}$

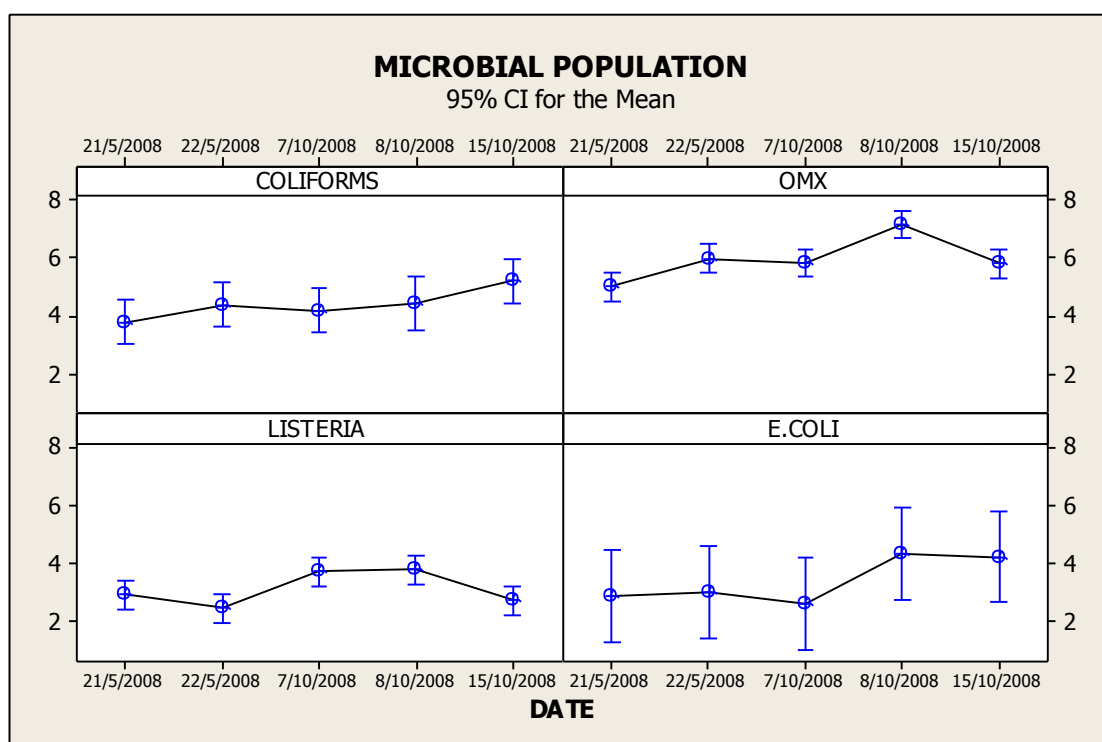
3.1.5 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το Minitab Statistical Software, Release 15. Οι συγκρίσεις αυτές έγιναν με την ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) η οποία χρησιμοποιείται για την σύγκριση δυο ή περισσότερων μέσων όρων δειγμάτων, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την μεταχείριση ενός ή περισσότερων παραγόντων. Η διερεύνηση των αποτελεσμάτων βασίστηκε στα 95% όρια εμπιστοσύνης. Μεγάλες επικαλύψεις δείχνουν στατιστικά σημαντική έλλειψη. Η απουσία επικαλύψεων επιδεικνύει σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων (Πετρίδης Δ. 2009).

4 Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1 Μικροβιακή χλωρίδα στα μαρούλια

Τα αποτελέσματα της μελέτης διαφορετικών βακτηριακών πληθυσμών σε δείγματα μαρουλιού παρουσιάζονται στον Σχήμα 1



Σχήμα 1: Μέσοι όροι και 95% όρια εμπιστοσύνης της Ο.Μ.Χ, των coliforms, της *E. coli* και της *Listeria spp* σε 15 δείγματα μαρουλιού.

21/05/2008: **α** δείγμα.

22/05/2008: **β** δείγμα.

07/10/2008: **γ** δείγμα.

08/10/2008: **δ** δείγμα.

15/10/2008: **ε** δείγμα.

Αποτελέσματα για Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)

Κάθε σημείο που φαίνεται στο **Σχήμα 1** είναι ο μέσος όρος τριών τιμών. Μέγιστη ανάπτυξη της Ο.Μ.Χ εμφανίστηκε στο δείγμα **δ**. ενώ η

μικρότερη ανάπτυξη εμφανίστηκε στα δείγματα **α**, **β**, **γ** και **ε** που δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Το δείγμα **α** εμφάνισε τη μικρότερη μέτρηση όσον αφορά την ΟΜΧ σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Η ΟΜΧ του δείγματος **δ** ήταν αυξημένη περίπου κατά 2 λογαριθμούς σε σύγκριση με την ΟΜΧ του δείγματος **α**. Η αύξηση αυτή μπορεί να οφείλεται σε διάφορους λόγους όπως επιπλέον επιμόλυνση από χώμα/κοπριά από μια πιθανή βροχόπτωση (μιας και η δειγματοληψία έγινε αρχές Οκτώβρη) από περιπτώματα πτηνών, από επιμολυσμένο νερό άρδευσης ή μπορεί να οφείλεται και σε επιμόλυνση κατά τη διάρκεια παραμονής του δείγματος στο σημείο πώλησης.. Επίσης ορισμένοι ερευνητές αναφέρουν, ότι το μικροβιακό φορτίο μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την εποχή και τις συνθήκες καλλιέργειας.

Αποτελέσματα για coliforms

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1** τα coliforms παρουσίασαν μία βαθμιαία βραδεία αυξητική μεταβολή με τη μέγιστη ανάπτυξη τους να παρουσιάζεται στο δείγμα **ε**, όπου ο πληθυσμός τους ήταν περίπου 5 log cfu/g. Ο χρόνος επιβίωσης των coliforms συνήθως εξαρτάται στα νωπά λαχανικά, από την υγρασία και την θερμοκρασία. Οπότε το μικροβιακό φορτίο μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την εποχή. Όσον αφορά την αύξηση του πληθυσμού του δείγματος **ε** αυτή μπορεί να οφείλεται τόσο στον τρόπο λίπανσης του χωραφιού όσο και σε όλους τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Αποτελέσματα για *E. coli*

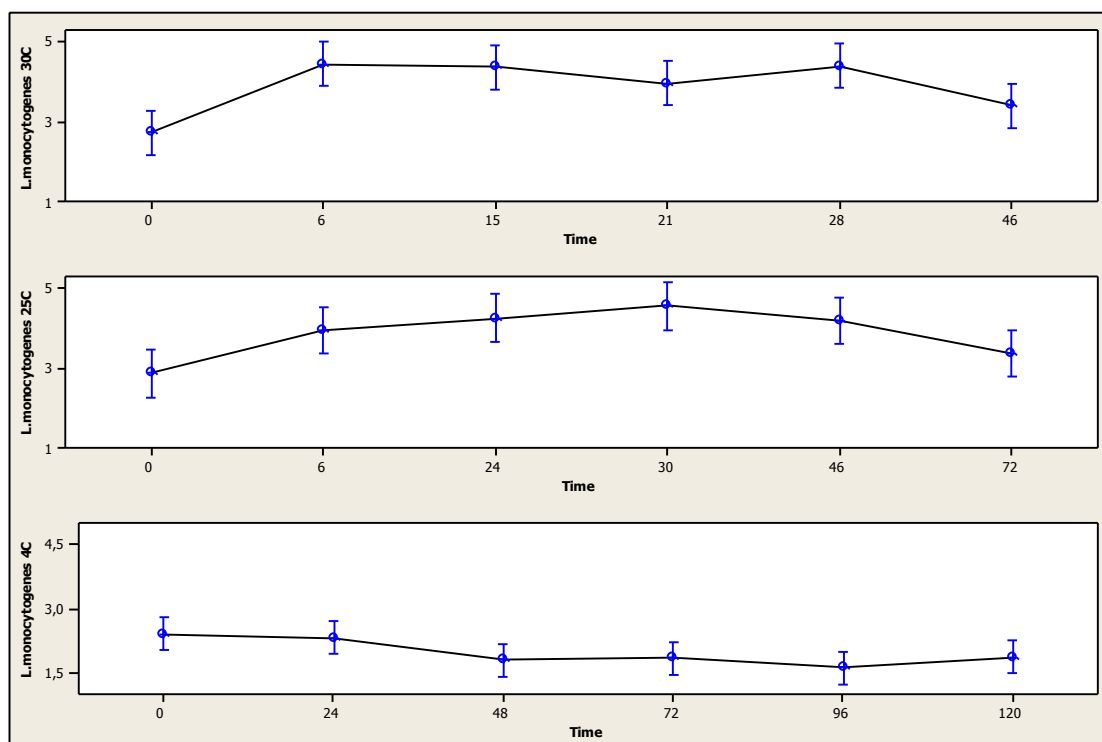
Είναι ένας από τους σημαντικότερους δείκτες υγιεινής κατάστασης των τροφίμων. Η παρουσία της υποδηλώνει βέβαιη εντερική ρύπανση. Από το **Σχήμα 1** παρατηρούμε ότι ο πληθυσμός της *E. coli* δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, λόγω της μεγάλης επικάλυψης των 95% ορίων εμπιστοσύνης των μέσων όρων. Οι μέσοι όροι του πληθυσμού της *E. coli* σε όλα τα δείγματα ήταν της τάξης 3 – 4 log cfu/g δηλαδή μειωμένοι κατά 1 δεκαδικό λογάριθμο από τον πληθυσμό των coliforms. Αυτό σημαίνει ότι το 10% των coliforms αποτελείται από *E. coli*. Ο

υπόλοιπος πληθυσμός των coliforms μπορεί να είναι ένα γένος ή συνδυασμός των, *Enterobacter*, *Citrobacter* και *Klebsiella* που απαρτίζουν τα υπόλοιπα coliforms.

Αποτελέσματα για Listeria

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1** το σύνολο των δειγμάτων αποτελείται από δύο ομάδες όπου τα δείγματα **γ** και **δ** παρουσίασαν μέγιστους πληθυσμούς ανάπτυξης και ισότιμους μεταξύ τους, ενώ μικρότερους πληθυσμούς παρουσίασαν τα δείγματα **α**, **β** και **ε** και ισότιμους μεταξύ τους. Όσον αφορά τις ημερομηνίες αγοράς και ανάλυσης των δειγμάτων μαρουλιού εκτός από το δείγμα **ε**, εποχιακή διαφορά παρουσίασαν τα δείγματα **α**, **β**, (άνοιξη) στον πληθυσμό της Listeria σε σύγκριση με τα δείγματα **γ** και **δ** (φθινόπωρο).

4.2 Μελέτη της επιβίωσης της *Listeria monocytogenes* σε μαρούλια διατηρημένα σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους συντήρησης.



Σχήμα 2: Πληθυσμιακές μεταβολές της *L. monocytogenes*, σε μαρούλια, διατηρημένα σε διαφορετικές θερμοκρασίες (30°C, 25°C, 4°C) και χρόνους συντήρησης.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2** τα μαρούλια που διατηρήθηκαν στους 25°C διαφέρουν στατιστικά οριακά μεταξύ της μέτρησης στις 0 ώρες των δειγμάτων που αναλύθηκαν στις με αυτά που αναλύθηκαν μετά από 6 ώρες. Στατιστικά μικρότερες τιμές της *L. monocytogenes* παρουσίασαν τα δείγματα που αναλύθηκαν στις 0 ώρες. Γενικά, υπάρχει στατιστική επίδραση του χρόνου παραμονής του λαχανικού στους 25°C όσον αφορά τον πληθυσμό της *L. monocytogenes*. Συγκεκριμένα εκτός από τα πρώτα δείγματα που αναλύθηκαν στις 0 ώρες (θερμοκρασία περιβάλλοντος), ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* ήταν μεγαλύτερος στους χρόνους παραμονής των 6, 24, 30 και 46 ωρών συντήρησης. Σε αυτούς τους χρόνους συντήρησης δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Στις 72 ώρες ο

πληθυσμός της *L. monocytogenes* μειώνεται και πλησιάζει τα επίπεδα του πληθυσμού των 0 ωρών ανάλυσης.

Συγκρίνοντας την καμπύλη του πληθυσμού της *L. monocytogenes* στους 30°C με την αντίστοιχη των 25°C διαπιστώνουμε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο πειραμάτων.

Η καμπύλη των πληθυσμών της *L. monocytogenes* στην θερμοκρασία των 4°C ήταν τελείως διαφορετική, συγκρινόμενη με τις δύο προηγούμενες καμπύλες. Μολονότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές των πληθυσμών μεταξύ των ωρών 0, 24, 48, 72, 96 και 120, εντούτοις παρατηρείται μια σχετική μείωση του πληθυσμού μέχρι τις 72 ώρες, για να σημειωθεί ελαφρά αύξηση στις 96 ώρες συντήρησης στους 4°C, χωρίς όμως να υπερβαίνει τα επίπεδα του πληθυσμού στις 0 ώρες συντήρησης. Η *Listeria* έχει ως άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C αλλά επειδή είναι και ψυχροτρόφο βακτήριο επιβιώνει και σε θερμοκρασίες χαμηλότερες, για αυτό τον λόγο μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί και σε θερμοκρασίες ψυγείου.

5 Συμπεράσματα

Το μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων μαρουλιού που αναλύθηκαν έδειξε ένα εύρος τιμών της τάξης του: Ο.Μ.Χ: $10^5 - 10^7$ cfu/g, coliforms: $10^3 - 10^5$ cfu/g, *E. coli*: $10^2 - 10^4$ cfu/g και *Listeria spp.*: $10^2 - 10^4$ cfu/g. Παρόμοια αποτελέσματα συναντούμε και σε άλλες μελέτες που έδειξαν ότι, σε έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες λάχανου και μαρουλιού διαπιστώθηκε ότι η Ο.Μ.Χ κυμαίνονταν από $10^4 - 10^6$ cfu/g ενώ ο πληθυσμός των ψυχρότροφων κυμαίνονταν από $10^3 - 10^5$ cfu/g (Nguyen – the and Carlin, 1994).

Από τα αποτελέσματά μας φαίνεται ότι η διακίνηση και συντήρηση του μαρουλιού που είναι επιμολυσμένο με *L. monocytogenes* εκτός ψυγείου μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του παθογόνου.

Σύμφωνα με τους Koseki and Isobe (2005) σε μαρούλι διατηρημένο στους 5°C ενοφθαλμισμένο με 3,4 log cfu/g *L. monocytogenes*, ο πληθυσμός της παρέμεινε στα ίδια επίπεδα μέχρι και 50h μετά τον ενοφθαλμισμό και κατόπιν αυξήθηκε κατά 1.5 log cfu/g μεταξύ 50 με 100h όπου και

σταθεροποιείται σε αυτά τα επίπεδα μέχρι και στις 150h μέτρησης. Σε αντίθεση, στη δική μας πειραματική διαδικασία τα δείγματα μαρουλιού ήταν ενοφθαλισμένα με περίπου $2.5 \log \text{ cfu cm}^{-2}$ ενώ μετά από 48h ο πληθυσμός του παθογόνου έπεσε κατά $0.5 \log \text{ cfu cm}^{-2}$ και σταθεροποιήθηκε σε αυτά τα επίπεδα μέχρι και τις 120h μέτρησης.

Στην ίδια μελέτη μαρούλι συντηρημένο σε θερμοκρασία 25°C και ενοφθαλισμένο με $3,4 \log \text{ cfu/g}$ *L. monocytogenes*, ο πληθυσμός του παθογόνου άρχισε να αυξάνει μετά από 5h συντήρησης παρουσιάζοντας ανάπτυξη κατά $1 \log \text{ cfu/g}$ μετά από 9h συντήρησης και μέγιστη ανάπτυξη (κατά $1,8 \log \text{ cfu/g}$) μετά από 15h συντήρησης. Παρόμοια αποτελέσματα είχαμε και στη δική μας πειραματική διαδικασία τα δείγματα μαρουλιού ήταν ενοφθαλισμένα με περίπου $3 \log \text{ cfu cm}^{-2}$ ενώ μετά από 6h ο πληθυσμός του παθογόνου αυξήθηκε κατά $1 \log \text{ cfu cm}^{-2}$ και σταθεροποιήθηκε σε αυτά τα επίπεδα μέχρι και τις 46h μέτρησης για να επανέλθει στα αρχικά επίπεδα μετά από 72 h συντήρησης.

Ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* στα μαρούλια που συντηρήθηκαν στους 25°C και στους 30°C δεν παρουσιάζουν μεταξύ τους αξιόλογες διαφορές. Και στα δύο πειράματα παρατηρείται ελαφρά αύξηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* στις πρώτες 48h και στην συνέχεια ελαφρά μείωση στις 72h συντήρησης.

Σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε εξάλειψη της *L. monocytogenes* που διατηρήθηκε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες.

Σημαντικό είναι να τονίσουμε ότι τα μαρούλια αναλύθηκαν απευθείας μετά την αγορά τους χωρίς να υποβληθούν σε διαδικασία πλύσης. Γενικά το πλύσιμο στοχεύει στην απομάκρυνση της βρομιάς, όπως χώμα και φυτοφάρμακα που είναι υπεύθυνα για την υποβάθμιση της ποιότητας των μη επεξεργασμένων και ελάχιστα επεξεργασμένων λαχανικών.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην θερμοκρασία των 5°C έδειξαν ότι η *L. monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει και να αυξηθεί σε θερμοκρασία ψύξης για σημαντικό χρονικό διάστημα (Beuchat *et al.*, 1990).

Σε μελέτη που έγινε από τους Carrasco *et al.*, (2007) σε μαρούλια ενοφθαλισμένα με $3 \log \text{ cfu/g}$ *L. monocytogenes* και διατηρημένα στους 5°C ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* παρέμεινε στα ίδια επίπεδα μέχρι και την 6η μέρα εξέτασης ενώ ο πληθυσμός του παθογόνου αυξήθηκε κατά $2.66 \log$

cfu/g μετά από 14 ημέρες επώασης των δειγμάτων στους 5⁰C. Τα δικά μας αποτελέσματα έδειξαν πως ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* στους 4⁰C παρουσίασε σταδιακή μείωση κατά τη διάρκεια του πειράματος με τη μέγιστη μείωση να εμφανίζεται μετά από 96h κατά 0.8 log cfu cm⁻².

Τα αποτελέσματά μας παρουσιάζουν ορισμένες διαφοροποιήσεις σε σχέση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πολλούς λόγους όπως η διαφορετική πειραματική διαδικασία, η χρήση διαφορετικών υλικών, η χρήση διαφορετικών στελεχών *L. monocytogenes*, ή ακόμα και σε πειραματικό σφάλμα. Από τα αποτελέσματά μας και αυτά της υπάρχουσας βιβλιογραφίας καταλαβαίνουμε την ανάγκη σωστών μέτρων υγιεινής και την διατήρηση των φρέσκων λαχανικών σε χαμηλές θερμοκρασίες

Η αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης στους 30⁰C έχει ως αποτέλεσμα σημαντικά ταχύτερο αποχρωματισμό του μαρουλιού με βάση τον χρόνο συντήρησης. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες οι οποίες δείχνουν ότι η συντήρηση σε υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν το κηλίδωμα των λαχανικών (Samara and Koutsoumanis, 2009). Γενικά λοιπόν γίνεται αντιληπτό ότι ο έλεγχος της θερμοκρασίας συντήρησης των λαχανικών αφορά όχι μόνο την μικροβιολογική ασφάλεια τους αλλά και τη διατήρηση των ποιοτικών τους χαρακτηριστικών. Η επεξεργασία, η μεταφορά, η αποθήκευση και συντήρηση θα πρέπει να γίνονται σε θερμοκρασίες ψύξης (De Roever, 1998).

6 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Πολλές και διαφορετικές παράμετροι μπορούν να μελετηθούν όσον αφορά τη μελέτη βακτηριακών πληθυσμών σε φρέσκα έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά. Για παράδειγμα θα μπορούσε να γίνει μια μελέτη της επιβίωσης του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε άλλα λαχανικά, όπως λάχανο, ρόκα και σπανάκι τα οποία επίσης καταναλώνονται τις περισσότερες φορές ωμά. Επίσης θα μπορούσε να μελετηθεί η επιβίωση της *L. monocytogenes* σε διάφορα λαχανικά εμβαπτισμένα σε νερό διαφορετικής θερμοκρασίας, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οξικού οξέος και να μελετηθεί παράλληλα και ο χρόνος επίδρασης του οξικού οξέος. Θα μπορούσε επίσης

να μελετηθεί η χρήση αιθέριων ελαίων για την εξάλιψη των παθογόνων μικροοργανισμών από την επιφάνεια φρέσκων λαχανικών. Όλα τα παραπάνω μπορούν να μελετηθούν χρησιμοποιώντας και άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς.

7 Βιβλιογραφία

Adams M.R., Moss M.O., Food Microbiology 3rd Edition c. *The Royal Society of Chemistry* (2008), ISBN 978 - 0 - 85404 - 284 -5.

American Academy of Pediatrics. *Listeria monocytogenes* infections (Listeriosis). In: Pickering LK, ed Red BookQ 2003. Report of the Committee on Infectious Diseases, 26th ed, Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics, 2003Q **405 - 407**.

Barnett B.J., Schwartze M. Sweat D., Lea S., Taylor J., Bibb B., Pierce G., Hendricks K., Outbreak of *Escherichia coli* 0157 : H7, Waco, Texas. Epidemic Intelligence Service 44th Annual Conference, March 27 - 31, 1995, Centers for Disease Control, Atlanta, GA pp. **17 - 18**.

Beuchat L.R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce (1996), *Journal of Food Protection*, **59** ; 204 -216.

Beucat. R.E., Brackett R.E., Beuchat L.R., Microbial, Colour and textural qualities of fresh asparagus, broccoli and controlled atmosphere (1990), *Journal of Food Protection*, **53** ; 391 -395.

Beuchat L. R., *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables (1996), *Food Control*, **7**; 223-228.

Beuchat L.R., Brackett R.E., Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by heat treatment, modified atmosphere packaging and temperature (1996b), *Journal of Food Protection*, **57** ;1367 - 71.

Beuchat L.R., Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables (2002), *Microbes and Infection*, **4**; 413–423.

Beuchat L.R., Nail B.V., Adler B.B., Clavero M.R., Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce (1998), *Journal of Food Protection*, **61**; 1305–1311

Beuchat L.R., Pathogenic microorganisms associated with fresh Protection (1996) ,*Journal of Food Protection* , **59** ; 204-216.

Carlin F., Nguyen-the C., Morris C.E., Influence of background microflora on *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh broadleaved endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*) (1996), *Journal of Food Protection*, **59**; 698–703

Carrasco E., Pérez-Rodríguez F., Valero A., García-Gimeno R.M., Zurera G., Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce (2008), *Food Control*, **19**; 487–494.

Charimba G., Hugo C.J., Hugo A.(2010) The growth, survival and thermal inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7 in a traditional South African sausage (2010), *Meat Science*, **85**, 89 - 95.

Conner D.E., Scott V.N., Summer S.S., Bernar D.T., Pathogenicity of food borne, environme ntal and clinical idolates of *Listeria mocytozenes* in mice (1989), *Journal of Food Science* ,**1553 -1556**.

Datta R. Attin ,*Listeria monocytogenes*. International Han book of foodborne pathogens (2003) , Edited by Marriane D. Mikiotis, Jeffrey W. Bier. **105 - 117**.

De Roever C., Microbiological safety evaluations and recommendations on

fresh produce (1998), *Food Control*, **6**; 321–347.

De Simmon M., Tarrago C., Ferrer M.D., Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain), (1992), *International Journal of Food Microbiology* **16** ; 153 -156.

Doganay Mehmet. *Listeriosis: Clinical presentation FEMS* (2003), *Immunology and Medical Microbiology*, **35** ; 173 -175.

Eribo B., Sahenafi M. (2003), Behavior of *Escherichia coli* 0157:H7 in tomato and processed tomato products (2003) , *Food Research International*, **36**, 823 - 830.

European Food Safety Authority (EFSA), 2005. Zoonosen in the European Union: ISSN: 1977 - 0499 Available from: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/report/efsa_zoonosen_2005_brochure_en.pdf.

Farder J.M., Peterkin P.I., *Listeria monocytogenes* a foodborne pathogen (1991), *Microbiol Rev* **55** ; 476 - 511.

Francis G.A., Thomas C., O'Beirne D., The microbiological safety of minimally processed vegetables (1999), *International Journal of Food Science and Technology*, **34** ; 1-22.

Gbriel A. A., Nakano H., Responses of *E. coli* 0157:H7, *L. monocytogenes* 1/2 c and *Salmonella enteritidis* to pH, aw and temperature stress combinations (2010), *Food Control*, **21**, 644 - 650.

Gravessen A., Rammath M., Rechinger K.B., Andersen, Jansch L., Hechard, High level of Resistance to class bacteriocins in associated with one general mechanism in *Listeria mocytoenes*, (2002), *Envivor. Microbiol* , **148** ; 361 - 369.

Gu J., Liu Y., Yu S., Wang H., Wang O., Yi Y., Zhu F., Yu X. - j., Zou Q., Mao X., *Enterohemorrhagic, Escherichia coli* trivalent recombinant vaccine containing EspA, intimin and Stx2 induces strong humoral immune response and confers protection in mice (2009), *Microbes and Infection*, **11**, 835 - 841.

Heisick J.E., Wagener D.E., Nierman M.L., Peeler J.T., *Listeria spp.* Found on fresh market produce (1989) *Applied Environmental Microbiology*, **55** ; 1925 -1927.

Ho J.L. Shands K.N., Friedland G., Eckind P., Fraser D.W., An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals (1986), *Arch. Int. Med.*, **146** ; 520 - 524.

ICMSF (International Commission on Microbiological for Foods) (1996), *Microorganisms in Foods 5 : Characteristics of Microbial Pathogens*. Blackie Academic & Professional, London.

ICMSF) International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1998). In: *Microorganisms in foods. S. Microbiological Specifications of Food Pathogens* (edited by T.A. Roberts, A.C. Baird and R.B. Tompkin). London: Blackie Academic and Professional.

Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A., *Modern Food Microbiology*, 7th Edition (2005), *Springer Science & Business Media, Inc.*, p. **591-618**.

Jay J.M., *Modern Food Microbiology*, 5th Edition (1996) ,Van Nostrand Reinhold New York, Inc., p. **661 - 669**.

Jay, M.I. *Modern food microbiology*, 6th edition (2000). Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, MD.

Jo S. - C., Rim A. - Ram, Park H. - G., Lee S. - C., Combined treatment with

silver ions and organic acid enhances growth - inhibition of *Escherichia coli* 0157:H7 (2007), *Food Control*, **18** ; 1235 - 1240.

Jones T., Gill C. O., McMullen L. M., Behaviour of log - phase *Escherichia coli* at temperatures near the minimum for growth (2003), *International Journal of Food Microbiology*, **88**, 55 - 61.

Kim K.T., Murano E.A., Olson D.G. Heating and Storage Condition affect Survival and recovery of *Listeria monocytogenes* in ground pork (1994), *Journal of food Science*, **59** ; 30 - 32.

Kornacki, J.L. and J.L. Johnson (2001): *Enterobacteriaceae, Coliforms and Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Pouch Downes F. and K. Ito (eds.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed., American Public Health Association, Washington D.C., USA, p. **69-82**.

Koseki S., Isobe S., Growth of *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce and solid media (2005), *International Journal of Food Microbiology*, **101**; 217–225.

Koseki S., Isobe S., Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table (2005), *International Journal of Food Microbiology*, **104**; 239–248.

Koutsoumanis K., Sofos J.N., A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface (2004b), *Food Microbiology*, **21**; 415–422

Kunze D.J., Loneragan G.H., Platt T.M., Miller M.F., Besser T.E., Thomas E., Mohammad, Mindy M., *Salmonella enterica*, Burden in Harvest - Ready Cattle Populations from the Southern High Plains of the United States

(2008), *Environ Microbiol*, **74**; 345-351.

Li Y., Brackett R.E., Shewfelt R.L., Beuchat L.R., Changes in appearance and natural microflora on iceberg lettuce treated in warm, chlorinated water and then stored at refrigeration temperature (2001), *Food Microbiology*, **18**; 299-308.

Lim J. Y., Li J., Sheng H., Besser T. E., Potter K., and Honde C. J., *Escherichia coli* 0157:H7 Colonization at the Rectoanal Junction of Long - Duration Culture - Positive Cattle (2007), *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 1380 -1382.

Linch M.F., Tauxe R.V., Heblberg C.W., The growing burder of foodborne out breaks due to contaminated fresh prodduce, risks and opportunities (2009), *Epidemiology and Infection*, **137**; 307- 315.

Lovett J., *Listeria monocytogenes*. In: MP Doyle, Ed foodborner bacterial pathogens New York : *Marcel Dekker Inc.*, 1989, pp. **284 - 310**.

Magnuson J.A., King A.D., Török T., Microflora of Partially Processed Lettuce (1990), *Environmental Microbiology*, **56**; 3851-3854.

Masson A., Microbiologie des legumes frais predecoupes (Microbiologg of fresh cut vegetables) (1988), *Microbiol. Alim Nutr.*, **6** ; 197-9.

Mc Lauchlin J., Mitchell R.T., Smerdon WJ., Jewell K., *Listeria monocytogenes* and listeriosis : A review of hazard Characterisation for use in microbiological risk assessment of foods (2004), *International Journal of food Microbiol*, **92** ; 15 - 33.

Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McVaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V. (1999), Foodrelated illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* **5** ; 607 - 625.

NACMCF *Listeria monocytogenes*. Recommendations on the National Committee on Microbiological Criteria for food, (1991), *International Journal of food Microbiology*, **14**; 185 - 246.

Nguven -the C., Prunier J.P., Involvement of pseudomonads (1989), *International Journal of Food Science Tecnologies*,**24** ; 47-58.

Nguyen-the C., Carlin F., The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables (1994), *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **34**; 371–401.

O' Mahony M., Cowden J., Smyth B., An Outbreak of *Salmonella* saint - paul infection associated with beansprouts (1990a), *Epidemiological Infection*, **104**; 229 - 235.

Odumetu J.A., Mitchell S.J., Alves D.M., Lynch J.A., Yee A.J., Wang S.L., Styliades S., Farber J.M., Assessment of the microbiological quality of ready - to - use vegetables for health - care food - services (1997), *Journal of Food Protection*, **60** ; 954 - 960.

Pinner R.W., Schuchat A., Swaminathan B., Hayes P.S., Deaver K.A., Weaver R.E., Pilkaytis B.D., Reeves M., Broome C.V., Wengerand J., The *Listeria* Stuby group. Roles of in Sporadic *Listeriosis* II (1992), *Microbiologic and epidemiologic investigation*. JAMA **267** ;2046 - 2050.

Roberts, D. and Greenwood, M. (2003): Practical Food Microbiology, 3rd ed Blackwell Publishing, p.**105**.

Samara A., Koutsoumanis K.P., Effect of treating lettuce surfaces with acidulants on the behaviour of *Listeria monocytogenes* during storage at 5 and 20 °C and subsequent exposure to simulated gastric fluid (2009), *International Journal of Food Microbiology*, **129**; 1–7.

Schlech. W.F., III (2000). Foodborne *listeriosis* (2000), *Clin Infect Dis* **31** ; 770 -775.

Seafood Haccp Alliance (2007). Compedium of fish ant Fishery Product Processes, Hazards and Controls, Chapter 15 : *Listeria monocytogenes* *Seafood Net Work information Center Retrieved January, 28, 2009.*

Tauxe R., Kruse H., Hedberg C., Potter M., Madden J., Wachsmuth K., Microbial hazards and emerging issues associated with produce. A preliminary rept to the nationl advisory committee on microbiological Criteria for Foods(1997), *Journal of Food Protection*, **60**; 1400- 1408.

Thayer D.W., Boyd G., Radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* on beef as affcted by temperature (1995), *Joyrnal of Food Scince*, **586 - 589**.

Wareing P., Femandes R., 2007. Micro - Facts, the worknig companion for food microbiologists, sixth edition. Surry, United Kingdom . *Leatherhead Food International LTD*. ISBN: 978-1905224-43-2.

Wells J.M., Butterfield J.E., *Salmonella* contamination associated with bacterial soft rot of fresh fruits and vegetables in the marketplace (1997), *Plant Disease*, **81**; 867–872.

Whiting R.C., Masana M.O., *Listeria monocytogenes* survival model validated in simulated uncooked fermented meat products for effects of nitrite and pH (1994), *Journal of food Scince*, **59** ; 760 - 767.

Wderquist J., Sofos J.N. Schmidt G.R., *Listeria monocytogenes* inhibition in refrigerated vacuum packaged Turkey bologna by chemical addives (1994), *Journal of Food Scince*, **59**; 498 - 500.

Yang T. - C., Li C. - F., Clou C. - C., Cell age, suspending medioum and metal ion influence the susceptibilty of *Escherichia coli* 0157:H7 to water -

soluble maltose chitosan derivative (2007), *International Journal of Food Microbiology*, **13** ; 258 - 262.

Yilmaz A., Gun H., Ugur M., Turan N., Yilmaz H. (2006), Detection and frequency of VT1, VT2 and eaeA genes in *Escherichia coli* 0157 and 0157:H7 strains isolated from cattle, cattle carcasses and abattoir environment in Istanbul (2006), *International Journal of Food Microbiology*, **106**, 213 – 217

Zhu A., Gu L., Yu J., Yang J., Zhai X., Dong C., Qian H., Tan Z., Pan H., Liu J., Zhu F., Wang H. (2009), Analysis on the epidemiological characteristics of *Escherichia coli* 0157:H7 Infection in Xuzhou, Jiangsu, China, (1999), *Journal of Nanjing Medical University*, **23**(1); 20 -24.

Γερασόπουλος, Δ. (2005). Επεξεργασία και συντήρηση τροφίμων. Πανεπιστημιακό τυπογραφείο Α.Π.Θ. Θεσσαλονίκη. σελ: **1-2**.

Κοτζεκίδου - Ρούκα Π. Μικροβιολογία τροφίμων Εκδόσεις Γιαχούδη - Γιαπούλη. (2000), Θεσσαλονίκη, σελ. **86 -89**.

Μπαλατούρας Γ., Μικροβιολογία Τροφίμων. Εκδόσεις Εμβρυο, (2006) Αθήνα, σελ. **98 - 99**.

Σίωμος Α.Σ., Ειδική Λαχανοκομία Ι., Μέρος Β, Πανεπιστημικό τυπογραφείο Α.Π.Θ., 2003 - 2004, Θεσσαλονίκη, σελ. **1-17**.

Τζανετάκης Ν., Υγιεινής Τροφίμων, Πανεπιστημιακού τυπογραφείου ΑΠΘ, 2004 Θεσσαλονίκη, σελ **4-10**.

15. Παράρτημα

Παρασκευή αραιωτικού (*Peptona bacteriologica*)

Σε 1000ml αποσταγμένο νερό προστίθενται 1g πεπτόνη και 9g NaCl. Στην συνέχεια το υδατικό διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά του, διανέμεται σε κωνικές φιάλες των 100 ml και σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10ml. Τέλος αποστειρώνεται στον κλίβανο στους 121⁰C για 15min. Το αραιωτικό διατηρείται στο ψυγείο (pH 7,2).

Παρασκευή υποστρωμάτων .

Υπόστρωμα ολικής μεσόφυλης χλωρίδας (OMX).

Το μη εκλεκτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και την καταμέτρηση της ολικής μεσόφυλης χλωρίδας είναι το PCA ή ΣΑΜ αγαρ, του οποίου η σύσταση είναι:

Tryptone	5,0 g/l
Yeast extract	2,5 g/l
Glucose	1,0 g/l
Agar	15,0 g/l.

Το τελικό pH του υποστρώματος είναι 7,1 ± 0,1.

Για την παρασκευή του, διαλύονται 22,5g υποστρώματος, το οποίο βρίσκεται υπό μορφή άνυδρης σκόνης σε 1L αποσταγμένου νερού. Στην συνέχεια γίνεται διάλυση των συστατικών δια θερμάνσεως.

Τέλος αποστειρώνεται σε κλίβανο στους 121⁰C για 15 min.

Υπόστρωμα κολοβακτηριδίων (coliforms).

Για την ανάπτυξη και την απομόνωση των coliforms χρησιμοποιήθηκε το V.R.B Agar το οποίο αποτελείται από τα εξής συστατικά:

- Yeast extract 3,5 g
- Peptone 7,0 g

- NaCl 5,0 g
- Lactoge 10,0 g
- Neutral red 0,03 g
- Bile salt mixture 1,5 g
- Crystal violet 0,002 g
- Agar 13,0 g

Το τελικό pH του υποστρώματος είναι $7,4 \pm 0,2$ στους 25°C .

Για την παρασκευή του διαλύονται 39,5g υποστρώματος, το οποίο βρίσκεται υπό μορφή άνυδρης σκόνης, σε 1L απεσταγμένου νερού αναμιγνύεται το μίγμα και ακολουθεί θέρμανση υπό συνεχή ανάδευση και βρασμός για περίπου 2 min . Το υπόστρωμα V.R.B.A. δεν αποστειρώνεται.

Υπόστρωμα *E. coli*

Χρησιμοποιήθηκε το VRB Agar όπου η σύσταση του αναφέρεται παραπάνω.

Υπόστρωμα για *Listeria monocytogenes*.

Για την ανάπτυξη και την απομόνωση του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* χρησιμοποιήθηκε το Palcam το οποίο αποτελείται από τα εξής συστατικά:

- Peptone 23,0 g
- Starch 1,0 g
- NaCl 5,0 g
- Agar 13,0 g
- Esculin 0,8 g
- Ammonium 0,5 g
- Glucose 0,5 g
- Mannitol 10,0 g
- Yeast extract 3,0 g
- Lithium 15,0 g

- Phenol red 0,08 g

Το τελικό pH υποστρώματος είναι $7,2 \pm 0.2$ στους 25°C .

Για την παρασκευή του διαλύονται 35,9g υποστρώματος σε 500 ml απεσταγμένου νερού και στην συνέχεια αποστειρώνεται σε κλίβανο στους 121°C για 15 min.

Σπορά σε υγρά υλικά.

Η σπορά σε υγρά θρεπτικά υλικά είναι πάντοτε σπορά ανάπτυξης ή σπορά ταυτοποίησης. Με αυτήν δηλαδή, επιδιώκουμε την ανάπτυξη ή την ταυτοποίηση του βακτηρίου και συνήθως μεταφέρουμε μεγαλύτερη ποσότητα ενοφθαλμίσματος.

Ο θρεπτικός ζωμός έχει την παρακάτω σύσταση:

- Απεσταγμένο νερό 1L
- Beef 5g
- Πεπτόνη 5g

Ακολουθεί βρασμός και διάλυση των επιμέρους συστατικών διαμονή σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστείρωση στους 121°C για 15min.