

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΠΟΤΩΝ

Π.Μ.Σ. «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ, ΤΗΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΡΥΘΜΟΥ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ ΣΤΗ ΜΕΤΕΠΕΙΤΑ ΘΕΡΜΟΑΝΤΟΧΗ ΤΟΥ
ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *Escherichia coli* O157:H7, ΣΕ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ *in vitro*



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΑΘ. ΜΠΟΣΙΩΛΗ

ΑΘΗΝΑ 2015

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΣΚΑΝΔΑΜΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ,

ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Π.Μ.Σ.)
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ, ΤΗΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΡΥΘΜΟΥ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ ΣΤΗ ΜΕΤΕΠΕΙΤΑ ΘΕΡΜΟΑΝΤΟΧΗ ΤΟΥ
ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *Escherichia coli* O157:H7, ΣΕ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ in vitro

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΑΘ. ΜΠΟΣΙΩΛΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΣΚΑΝΔΑΜΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ,

ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δροσινός Ελευθέριος, Αν. Καθηγητής Γ.Π.Α.

Σκανδάμης Παναγιώτης, Επ. Καθηγητής Γ.Π.Α

Στοφόρος Νικόλαος, Αν. Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2015

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή ερευνητική διατριβή με θέμα: «Η επίδραση της λιποπεριεκτικότητας, της διάρκειας και του ρυθμού κατάψυξης στη μετέπειτα θερμοαντοχή του παθογόνου *Escherichia-coli* O157:H7, σε εργαστηριακά υποστρώματα in vitro», εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Στο σημείο αυτό αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας. Αρχικά, θα ήθελα να απευθύνω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα αυτής της μελέτης και Επίκουρο Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Σκανδάμη Παναγιώτη, όχι μόνο για την ανάθεση του θέματος, αλλά και για τη συνεχή καθοδήγηση και τις ουσιώδεις συμβουλές, που μου παρείχε σε όλο αυτό το διάστημα. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον μεταδιδάκτορα και υπεύθύνό μου κ. Μανιό Σταύρο, για τη βοήθεια και την ανεκτίμητη συνεισφορά του στη διεύθυνση της μεταπτυχιακής μου εργασίας, είτε σε επίπεδο διεξαγωγής των πειραμάτων, είτε σε επίπεδο συγγραφής της. Οι χρήσιμες και καθοριστικές συμβουλές του, οι εύστοχες επισημάνσεις του και η επιστημονική του γνώση, υπήρξαν πολύτιμες. Ειδικότερα, επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη συνάδελφο και φίλη μου Κανακάκη Ευαγγελία, για την άψογη συνεργασία μας. Η πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης θα ήταν αδύνατη χωρίς την υποστήριξη και τη συμβολή της, κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου καθώς και στις συμφοιτήτριες και φίλες μου Αποστολίδου Ζωή, Γκερέκου Μαρία και Σιδεράκου Δανάη για τη συνεργασία και τη δημιουργία ευχάριστου περιβάλλοντος στο χώρο του εργαστηρίου. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, που με στηρίζει καθημερινά όλα αυτά τα χρόνια, με υπομονή και θετική σκέψη για την εκπλήρωση των στόχων μου.

Μποσιώλη Αικατερίνη

Αθήνα, 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 ΤΟ ΚΡΕΑΣ	6
1.1.1 Γενικά.....	6
1.1.2 Κίνδυνοι	7
1.1.3 Συνθήκες ανάπτυξης των μικροβίων στα τρόφιμα	10
1.1.3.1 Επίδραση της ενεργότητας νερού (aw) στην ανάπτυξη των μικροβίων στα τρόφιμα.....	10
1.1.3.2 Επίδραση του pH στην ανάπτυξη των μικροβίων στα τρόφιμα.....	11
1.1.3.3 Επίδραση των θρεπτικών συστατικών στην ανάπτυξη των μικροβίων στα τρόφιμα.....	12
1.1.3.4 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των μικροβίων στα τρόφιμα.	12
1.1.4 Προληπτικά μέτρα για την αντιμετώπιση των μικροβιολογικών κινδύνων....	13
1.2 Ο ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ <i>Escherichia coli</i>	15
1.2.1 Γενικά.....	15
1.2.2 Ιστορικά στοιχεία	16
1.2.3 Χαρακτηριστικά του παθογόνου <i>Escherichia coli</i>	16
1.2.4 Εντεροαιμορραγικά στελέχη <i>E. coli</i> (EHEC)	17
1.2.5 Εντεροτοξινογόνα στελέχη <i>E. coli</i> (ETEC)	20
1.2.6 Εντεροπαθογόνα στελέχη <i>E. coli</i> (EPEC).....	20
1.2.7 Εντεροδιεισδυτικά στελέχη <i>E. coli</i> (EIEC).....	21
1.2.8 Εντεροαθροιστικά στελέχη <i>E. coli</i> (EAEC).....	21
1.3. Η ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΟΥ <i>Escherichia coli</i> O157:H7 ΣΕ ΜΠΙΦΤΕΚΙΑ ΑΠΟ ΒΟΕΙΟ ΚΙΜΑ.....	22
1.3.1 Αξιολόγηση ψησίματος με βάση το χρώμα	23
1.4 ΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ.....	24
1.4.1 Η επίδραση της κατάψυξης στην επιβίωση του παθογόνου <i>E. coli</i> O157:H7	24
1.4.2 Μηχανισμοί επίδρασης της κατάψυξης στην επιβίωση του <i>E. coli</i> O157:H7	25
1.4.3 Η επίδραση του ρυθμού κατάψυξης στην επιβίωση του <i>E. coli</i> O157:H7	26
1.5 ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	27

1.5.1	Θερμική επεξεργασία <i>E. coli</i> O157:H7 για την αδρανοποίησή του	27
1.6	Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΛΙΠΟΥΣ ΣΤΗ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ <i>E. coli</i> O157:H7	28
1.7	Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ ΣΤΗ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ <i>E. coli</i> O157:H7	28
1.8	Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ ΚΑΙ Η ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗ.....	29
1.9	Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΣΤΗΝ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ	30
1.10	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝ ΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥΣ ΣΤΙΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΙΣ.....	31
1.11	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝ ΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΕ ΧΑΜΗΛΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ	32
1.12	ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΧΑΜΗΛΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ	33
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	35
2.	ΥΠΟΘΕΣΗ & ΣΤΟΧΟΣ	35
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	36
3.	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
3.1	ΠΡΟΠΕΙΡΑΜΑΤΑ.....	36
3.1.1	Προσδιορισμός ποσοστού carrageenan.....	36
3.1.2	Προσθήκη NaCl και γλυκερόλης.....	36
3.1.3	Προσδιορισμός ενεργότητας νερού της γλυκερόλης και συσχετισμός με το NaCl	36
3.1.4	Προσθήκη ζωικού λίπους, βουτύρου και Tween80	37
3.1.5	Προσδιορισμός χρόνου θερμικής επεξεργασίας	38
3.2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	40
3.3	Ο ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ <i>Escherichia coli</i> O157:H7	42
3.3.1	Προετοιμασία και αναζωογόνηση του εμβολίου	43
3.3.2	Καθαρισμός εμβολίου	43
3.4	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	44
3.4.1	Εμβολιασμός δειγμάτων.....	44
3.4.2	Σχηματοποίηση, τεμαχισμός και συσκευασία δειγμάτων.....	45
3.4.3	Θερμική επεξεργασία.....	46
3.4.4	Δειγματοληψία και Ομογενοποίηση του δείγματος.....	46
3.4.5	Ενοφθαλμισμός θρεπτικών υποστρωμάτων.....	47
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	48

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
4.1 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΠΡΙΝ ΤΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	48
4.2 ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	53
4.2.1 Θερμική επεξεργασία στους 65° C	53
4.2.2 Θερμική επεξεργασία στους 60° C	56
4.2.3 Θερμική επεξεργασία στους 55° C	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Είναι πλέον αποδεδειγμένο, ότι ο παθογόνος *Escherichia coli* O157:H7, αποτελεί βασική πηγή μόλυνσης των μπιφτεκιών από βόειο κιμά. Για το λόγο αυτό, δημιουργήθηκε ένα μοντέλο τροφίμου (model food) προσομοιάζοντας την συνεκτικότητα του κιμά σε άκρως ελεγχόμενο περιβάλλον (in vitro), αποσύροντας τους λιγότερο σημαντικούς παράγοντες (πρωτεΐνες, ανόργανα στοιχεία, βιταμίνες και λίπος). Η παρούσα έρευνα μελετά την επίδραση του πάχους, της διάρκειας και του ρυθμού κατάψυξης, καθώς επίσης και την επίδραση της ενεργότητας νερού (με την προσθήκη γλυκερόλης) στην θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου *Escherichia coli* O157:H7, ύστερα από την θερμική επεξεργασία του μοντέλου τροφίμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Παρασκευάστηκαν δείγματα meat extract των 1,5 και 3,0 cm με 0%, 10% και 20% γλυκερόλη, με την προσθήκη του πολυσακχαρίτη carrageenan ως πηκτικού παράγοντα. Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους -16 και -28 °C για 20 ημέρες. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κατά τη 0^η, την 1^η και την 20^η ημέρα, για τον προσδιορισμό της επιβίωσης του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 στην κατάψυξη. Η θερμική επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο, στους 65, 60 και 55 °C. Τόσο η διάρκεια, όσο και η θερμοκρασία της κατάψυξης επηρέασε την θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου. Επίσης, ο παράγοντας που μειώνει την ενεργότητα νερού aw (20% γλυκερόλης αντιστοιχεί σε 3,8% NaCl) επέδρασε στην επιβίωση του παθογόνου. Παράλληλα, τα δείγματα μικρότερου μεγέθους (1,5cm), που επεξεργάστηκαν θερμικά για λιγότερο χρόνο, παρουσίασαν μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα. Το συγκεκριμένο μοντέλο τροφίμου προσομοιάζει την πραγματικότητα και μπορεί να αναδείξει το μηχανισμό και τη δράση συγκεκριμένων παραγόντων μέσα σε ένα σταθερό περιβάλλον. Ωστόσο, σε ένα πραγματικό τρόφιμο μπορεί να υπάρξει και συνδυαστική επίδραση των παραγόντων που μελετήθηκαν, με άλλους παράγοντες, όπως είναι οι πρωτεΐνες και η δομή του τροφίμου, παρουσιάζοντας ίσως ένα διαφορετικό αποτέλεσμα.

Λέξεις κλειδιά: *Escherichia coli* O157:H7, θερμοανθεκτικότητα, κατάψυξη, επιβίωση, καραγενάνη, γλυκερόλη, εκχύλισμα κρέατος, μοντέλο τροφίμου.

ABSTRACT

It is now proven that the pathogen *Escherichia coli* O157:H7 is the basic source of pollution by beef minced meat. Thus, we are creating a model food by simulating minced meat's consistency in vitro, drawing out the least important factors (proteins, minerals, vitamins, fat). The current research examines the effect of thickness, duration and rate of deep freezing as well as the effect of the water's activity (added with glycerol) in the thermotolerance of the pathogen *Escherichia coli* O157:H7, after the thermal process of the model food in different temperatures. Samples of meat extract 1,5 and 3,0 cm with 0%, 10% and 20% glycerol have been produced, by adding the polysaccharide carrageenan as coagulative agent. The samples were preserved at -16 and -28 °C for 20 days. The sampling was carried out on the 0, 1st and 20th day, in order to define the survival of the pathogen microorganism *Escherichia coli* O157:H7 in deep freezing. The thermal process of the samples is made in water bath at 65, 60 and 55 °C. The duration and the temperature affected the thermotolerance of the pathogen. However, the factor that reduces the water's activity a_w (20% glycerol accounts for 3,8% NaCl), has affected the pathogen's survival. At the same time, the shorter amount of time of the small size's (1,5cm) thermal process has shown greater thermotolerance. The specific model food simulates reality and can highlight the mechanism and the action of certain factors within a steady environment. Still, in a real food there might be a combined effect of the factors examined here with several others, such as proteins and food structure, having different results.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, thermotolerance, freezing, survival, carrageenan, glycerol, meat extract, model food.

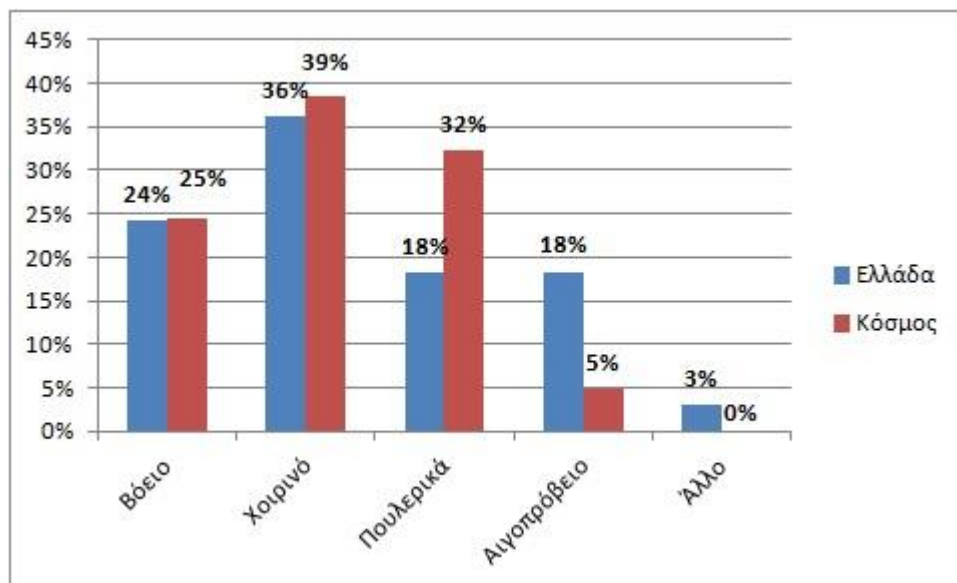
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΤΟ ΚΡΕΑΣ

1.1.1 Γενικά

Ευρήματα απολιθωμάτων καταδεικνύουν ότι οι άνθρωποι καταναλώνουν κρέας εδώ και αρκετά χρόνια. Το κρέας περιέχει μια μεγάλη ποικιλία σημαντικών θρεπτικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών υψηλής ποιότητας (βιολογικής αξίας), της βιταμίνη D, των βιταμινών του συμπλέγματος Β, ιδιαιτέρως του Β12, καθώς επίσης και του σιδήρου, του ψευδαργύρου και του σεληνίου. Όταν καταναλώνεται με μέτρο, το κρέας αποτελεί μέρος μιας υγιεινής και ισορροπημένης διατροφής. Στο γράφημα 1.1.1 παρουσιάζονται τα ποσοστά της παγκόσμιας κατανάλωσης κρέατος.



Γράφημα 1.1.1 Παγκόσμια κατανάλωση κρέατος.

Τα τρόφιμα, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε θρεπτικά συστατικά και της ευκολίας μόλυνσής και ρυπάνσής τους, είναι πάντοτε φορείς μικροοργανισμών. Τα μικρόβια αυτά συμμετέχουν στις φυσικοχημικές και βιολογικές μεταβολές που συμβαίνουν στα τρόφιμα. Αυτό αποτελεί και το αντικείμενο της επιστήμης της μικροβιολογίας των τροφίμων.

Ο όρος μικρόβιο ή μικροοργανισμός είναι όρος της τεχνολογίας και αφορά ένα σύνολο έμβιων όντων από διάφορες ταξινομικές ομάδες με ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Οι μικροοργανισμοί είναι αόρατοι με γυμνό οφθαλμό, με μικροσκοπικές διαστάσεις μεγαλύτερες από τη διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου (0.16 μ). Γενικά, πρόκειται για μονοκύτταρους οργανισμούς ή κοινοκυτταρικούς χωρίς εγκάρσια τοιχώματα ή και πολυκυτταρικούς χωρίς τη διαφοροποίηση των κυττάρων για σχηματισμό οργάνων ή ιστών.

1.1.2 Κίνδυνοι

Το κρέας και τα κρεατοσκευάσματα αποτελούν μία από τις ομάδες «υψηλού κινδύνου» στα τρόφιμα, εξαιτίας των πολλών και σοβαρών μικροβιολογικών κινδύνων που αντιμετωπίζουν.

Δυνητικό μικροβιολογικό κίνδυνο στο κρέας αποτελούν τα βακτήρια, οι τοξίνες, οι ιοί, τα πρωτόζωα και τα παράσιτα, καθώς και άλλες κατηγορίες βιολογικών κινδύνων όπως ο παθογόνος πρωτεϊνικός παράγοντας prion που ευθύνεται για τη νόσο των τρελών αγελάδων. Στον πίνακα 1.1.1 καταγράφονται τα κρούσματα από τροφιμογενή νοσήματα, καθώς επίσης και ο αριθμός των κρουσμάτων–επιδημιών που δηλώθηκαν στην Ελλάδα, κατά τα έτη 2004-2011

Πίνακας 1.1.1 Κρούσματα και αριθμός κρουσμάτων–επιδημιών από τροφιμογενή νοσήματα που δηλώθηκαν στην Ελλάδα, κατά τα έτη 2004-2011.

Νόσημα	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Σαλμονέλωση	1327	1062	886	709	810	406	299	471
Σιγκέλλωση	62	25	28	48	19	38	33	47
Λιστερίωση	3	8	1	10	1	4	10	9
Λοίμωξη από εντεροαιμορραγικό κολοβακτηρίδιο	2	0	1	1	0	0	1	1
Αλλαντίαση	0	0	0	0	0	1	0	0

Το νωπό κρέας είναι ένα ευαλλοίωτο προϊόν επειδή:

- Περιέχει αφθονία θρεπτικών συστατικών που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.
- Έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία που αντιστοιχεί σε μια τιμή aw περίπου 0,99, η οποία είναι ευνοϊκή για τους περισσότερους μικροοργανισμούς.
- Η τιμή του pH είναι 5-7, επίσης ευνοϊκή για την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών.

Από όλους τους μικροβιολογικούς κινδύνους οι σημαντικότεροι είναι αυτοί που προέρχονται από τα βακτήρια. Περίπου το 90% των καταγεγραμμένων τροφολοιμώξεων στα προϊόντα κρέατος προέρχεται από τα βακτήρια. Τα βακτήρια που προκαλούν ασθένειες ονομάζονται παθογόνα και μπορεί να προκαλέσουν τροφολοιμώξη (όταν ο πολλαπλασιασμός του παθογόνου είναι το αίτιο της δηλητηρίασης) ή τροφοτοξίνωση (όταν η τοξίνη που παράγει το παθογόνο είναι το αίτιο). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι μικροοργανισμοί *Salmonella*, *Campylobacter* και *Listeria monocytogenes*, ενώ στην δεύτερη το *Clostridium botulium*, το *Clostridium perfringens*, το *Bacillus cereus* και ο *Staphylococcus aureus*.

Πολλά από τα παραπάνω βακτήρια όπως και οι τοξίνες τους επιβιώνουν κατά την συντήρηση και ψύξη του κρέατος.

Η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στο νωπό κρέας εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν στο χώρο του σφαγείου, τη θερμοκρασία που επικρατεί στο χώρο σφαγής και αποστέωσης του κρέατος και στην ταχύτητα ψύξης του κρέατος αμέσως μετά τη σφαγή. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που τυχόν υπάρχουν στο νωπό κρέας προέρχονται από μόλυνση από τον εντερικό σωλήνα του ζώου και είναι η *Salmonella*, ο *Staphylococcus aureus*, το *Clostridium perfringens* και τα παθογόνα στελέχη της *Escherichia coli*.

Η επιμόλυνση του κρέατος μπορεί να είναι είτε ενδογενής είτε εξωγενής. Η επιμόλυνση ονομάζεται ενδογενής όταν οι μικροοργανισμοί περνούν στο κρέας πριν από τη σφαγή του ζώου ενώ στην εξωγενή μόλυνση τα κρέατα μολύνονται κατά ή μετά την σφαγή του ζώου. Η ενδογενής μόλυνση ελέγχεται, κατά τον προ της σφαγής υγειονομικό έλεγχο των ζώων καθώς και κατά την διάρκεια της κρεοσκοπίας από τους κρεοσκόπους κτηνιάτρους. Η εξωγενής μόλυνση είναι η πιο σημαντική και συμβαίνει στο διάστημα που μεσολαβεί από την σφαγή ζώου, μέχρι να μαγειρευτεί το κρέας από τον καταναλωτή.

Βασικότερες πηγές μόλυνσης είναι:

- Το δέρμα και οι οπλές του ζώου.
- Το πεπτικό σύστημα του ζώου.
- Οι σφαγειοτεχνικές εγκαταστάσεις.
- Τα μέσα και οι τρόποι μεταφοράς του κρέατος.
- Οι χώροι προετοιμασίας, συντήρησης, επεξεργασίας και πωλήσεων.
- Το προσωπικό, σε όλα τα στάδια προετοιμασίας και προσφοράς στον καταναλωτή του κρέατος και των προϊόντων.
- Τα υλικά που προστίθενται σε κάποια κρεατοσκευάσματα.



1.1.3 Συνθήκες ανάπτυξης των μικροβίων στα τρόφιμα

Κατά τη μόλυνση του τροφίμου, οι μικροοργανισμοί αυξάνονται σε αριθμό, δηλαδή πολλαπλασιάζονται. Για να είναι εφικτός ο πολλαπλασιασμός των μικροβίων πρέπει να συντρέξουν ορισμένες προϋποθέσεις και να εξασφαλισθούν ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Γενικά οι παράγοντες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό και κατ' επέκταση τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων στα τρόφιμα διακρίνονται σε:

- ενδογενείς, που σχετίζονται με τη σύσταση του τροφίμου (pH, Eh, aw, θρεπτικά συστατικά, αντιμικροβιακοί παράγοντες, ανταγωνιστική χλωρίδα)
- εξωγενείς, που σχετίζονται με τις συνθήκες συντήρησης (T, RH, P, pO₂, pCO₂)

Οι παραπάνω παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των μικροβιακών κυττάρων, βρίσκονται σε συνεχή αλληλεξάρτηση και αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Το τελικό αποτέλεσμα δεν εξαρτάται μόνο από την απόλυτη τιμή του κάθε παράγοντα ξεχωριστά, αλλά και από τον βαθμό στον οποίο ο παράγοντας αυτός επηρεάζει ή επηρεάζεται από όλους τους άλλους.

1.1.3.1 Επίδραση της ενεργότητας νερού (aw) στην ανάπτυξη των μικροβίων στα τρόφιμα

Οι μικροοργανισμοί προκειμένου να αναπτυχθούν, χρειάζονται νερό σε διαθέσιμη μορφή (αδέσμευτο), το οποίο περιγράφεται από τον όρο ενεργότητα νερού (aw). Η ενεργότητα του νερού αναφέρεται στον βαθμό τον οποίο το νερό είναι δεσμευμένο στα μόρια των τροφίμων, στην ικανότητα του να συμμετέχει σε χημικές και βιοχημικές αντιδράσεις, και στη διαθεσιμότητα του για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Τιμές ενεργότητας νερού μεταξύ 0,97- 0,99 οι οποίες θεωρούνται ιδανικές για την ανάπτυξη των περισσοτέρων μικροοργανισμών. Ο προσδιορισμός των ορίων των τιμών της ενεργότητας νερού που ευνοούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, εξαρτάται από το είδος τους.

Η χαμηλότερη τιμή ενεργότητας νερού που έχει παρατηρηθεί στα βακτήρια είναι 0,75 και αναφέρεται σε «αλόφιλα» βακτήρια (halophilic bacteria), τα οποία έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, ενώ οι «ξηρόφιλοι

μύκητες» (xerophilic moulds), που έχουν την ικανότητα ν' αναπτύσσονται σε συνθήκες ξηρότητας και οι οσμόφιλες ζύμες (osmophilic yeasts), αναπτύσσονται σε τιμές ενεργότητας νερού 0,65 και 0,61 αντίστοιχα.

Στο κρέας λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε υγρασία, η ενεργότητα του νερού είναι 0,99. Σε αυτή την τιμή ευνοείται η αύξηση των κυττάρων του *E. coli*, καθώς αναπτύσσονται περίπου στο 0,98 (Buchanan and Michael, 1997).

1.1.3.2 Επίδραση του pH στην ανάπτυξη των μικροβίων στα τρόφιμα

Το pH ορίζεται ως η ενεργότητα της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου σε ένα διάλυμα. Η μέτρηση του pH γίνεται σε κλίμακα από 0 (όξινο) έως 14 (αλκαλικό), και 7 (ουδέτερο). Τα τρόφιμα κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την τιμή του pH που διαθέτουν σε:

- Όξινα τρόφιμα με τιμή pH της τάξεως του 4,6 ή χαμηλότερο
- Χαμηλής οξύτητας τρόφιμα με pH μεγαλύτερο του 4,6 και ενεργότητα νερού μεγαλύτερη του 0,85
- Οξινοσμένα τρόφιμα με ενεργότητα νερού μεγαλύτερη του 0,85 στα οποία προστίθενται οξέα για να ρίξουν την τιμή του pH στην τιμή 4,6 ή και χαμηλότερα.

Η ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών στα τρόφιμα, ευνοείται όταν οι τιμές pH των τροφίμων κυμαίνονται στην τιμή 7,0 (6,6-7,5) ενώ υπάρχουν και εξαιρέσεις μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε τιμές pH χαμηλότερες του 4,0. Τα βακτήρια, ιδιαίτερα τα παθογόνα, είναι πιο απαιτητικά, όσον αφορά στις τιμές pH για την ανάπτυξή τους, σε σχέση με τις ζύμες και τους μύκητες.

Πιο συγκεκριμένα η τιμή του pH στο κρέας κυμαίνεται από 5,5 έως 6,5, τιμές στις οποίες ευνοείται η ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων και του *E. coli*. Το βέλτιστο pH ανάπτυξης του παθογόνου είναι κοντά στο 7 και το ελάχιστο pH για την ανάπτυξη του είναι 4,0 με 4,5 (Buchanan and Bagi, 1994)

1.1.3.3 Επίδραση των θρεπτικών συστατικών στην ανάπτυξη των μικροβίων στα τρόφιμα

Οι μικροοργανισμοί απαιτούν για την επιβίωση, την ανάπτυξη και την συντήρηση των μεταβολικών τους λειτουργιών, βασικά θρεπτικά συστατικά, όπως νερό, άζωτο, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία, η ποσότητα και το είδος των οποίων διαφέρει ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού. Τα κρέατα διαθέτουν άφθονες πρωτεΐνες, λιπίδια, ιχνοστοιχεία και βιταμίνες στη σύστασή τους. Τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις διαφορετικών ειδών υδατανθράκων, ποικίλα επίπεδα πρωτεϊνών, ανόργανων στοιχείων και βιταμινών. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα και τα αυγά αποτελούν πλούσιες πηγές θρεπτικών συστατικών.

1.1.3.4 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των μικροβίων στα τρόφιμα

Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε συγκεκριμένο φάσμα θερμοκρασιών. Η συσχέτιση μεταξύ χρόνου, θερμοκρασίας και άλλων ενδογενών κι εξωγενών παραγόντων, είναι σημαντική όσον αφορά στην επιλογή των κατάλληλων συνθηκών αποθήκευσης των τροφίμων. Η κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών σε θερμοφίλους, μεσόφιλους, ψυχρόφιλους και ψυχροτρόφους, γίνεται με βάση το φάσμα θερμοκρασιών στο οποίο αναπτύσσονται. Το ιδανικό φάσμα θερμοκρασιών για την ανάπτυξη των θερμοφίλων μικροοργανισμών είναι μεταξύ 55-75 °C, με μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 90 °C και ελάχιστη στους 40 °C. Τα περισσότερα θερμοφιλά βακτήρια που έχουν σημασία για τα τρόφιμα, ανήκουν στα γένη *Bacillus* και *Clostridium*.

Για τους μεσόφιλους μικροοργανισμούς, στους οποίους ανήκουν και τα περισσότερα παθογόνα βακτήρια, το ιδανικό φάσμα θερμοκρασιών ανάπτυξης κυμαίνεται μεταξύ 30-45°C, ενώ η ελάχιστη τιμή ανάπτυξης κυμαίνεται μεταξύ 5-10 °C.

Οι ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί έχουν ιδανικό φάσμα θερμοκρασιών ανάπτυξης μεταξύ 12-15°C με το μέγιστο φάσμα να κυμαίνεται μεταξύ 15-20 °C. Το πλήθος των ψυχρόφιλων μικροοργανισμών που αναπτύσσεται στα τρόφιμα, είναι μικρό.

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *E. coli* είναι ένα μεσόφιλο βακτήριο που αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 7 έως 50 °C με βέλτιστη θερμοκρασία τους 37 °C. Μερικά

εντεροτοξινογόνα στελέχη (ETEC) αυξάνονται και στην θερμοκρασία των 4 °C (Adams & Moss, 2008). Γενικά η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του συγκεκριμένου παθογόνου είναι περίπου 8-10 °C (Buchanan and Bagi, 1994; Rajkowski and Marmer, 1995). Το *E. coli* αδρανοποιείται όταν τα τρόφιμα ψηθούν επαρκώς σε θερμοκρασίες άνω των 51 °C (Cheville *et al.*, 1996; Buchanan and Michael, 1997).

1.1.4 Προληπτικά μέτρα για την αντιμετώπιση των μικροβιολογικών κινδύνων

Για να αντιμετωπιστούν οι μικροβιολογικοί κίνδυνοι για το κρέας και τα προϊόντα κρέατος η επιχείρηση θα πρέπει:

- Να προμηθεύεται κρέας από αξιόπιστους προμηθευτές.
- Κατά την παραλαβή πρέπει να ελέγχει τα συνοδευτικά έγγραφα των σφάγιων (υγειονομικά πιστοποιητικά) ή των τεμαχίων κρέατος καθώς και την σήμανσή τους. Από αυτά πρέπει να προκύπτει η προέλευσή τους (χώρα γέννησης, χώρα εκτροφής), η εγκατάσταση σφαγής/ τεμαχισμού, η ημερομηνία σφαγής και η καταλληλότητα τους για ανθρώπινη κατανάλωση (πιστοποιητικό κτηνιατρικού ελέγχου). Απαραίτητος είναι ο οργανοληπτικός έλεγχος (χρώμα, οσμή, γενική εμφάνιση), ο έλεγχος της θερμοκρασίας και ο έλεγχος της καθαριότητας του οχήματος μεταφοράς.
- Οι εργαζόμενοι της κατά τη διάρκεια της παραγωγής θα πρέπει να εφαρμόζουν τις ορθές πρακτικές υγιεινής (GHP) και βιομηχανικής πρακτικής (GMP), έτσι ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος διασταυρούμενης μικροβιακής επιμόλυνσης και επιμόλυνσης των προϊόντων από το προσωπικό. Πρέπει να δίνεται προσοχή ώστε να μην έρχονται σε επαφή "ασύμβατα" μεταξύ τους προϊόντα τα οποία είναι δυνατόν να αλληλοεπιμολυνθούν (π.χ. τα κόκκινα κρέατα με τα πουλερικά ή τα ωμά με τα θερμικώς επεξεργασμένα προϊόντα).
- Να τηρεί τις προδιαγραφές για τις συνθήκες παραγωγής των κρεατοσκευασμάτων. Για παράδειγμα για τα προϊόντα θερμικής επεξεργασίας (αλλαντικά, καπνιστά) πρέπει να ελέγχεται η επίτευξη των σωστών θερμοκρασιών (πχ. 72 °C στον πυρήνα) και χρόνου εφαρμογής τους (πχ. 15 sec)

ώστε να επιτυγχάνεται η ασφάλεια τους. Η παρακολούθηση των ανωτέρω θερμοκρασιών καταγράφεται με κατάλληλο τρόπο σε ανάλογα αρχεία.

- Να ελέγχει την τήρηση της ψυκτικής αλυσίδας σε όλα τα στάδια της παραγωγής. Συγκεκριμένα, το κόκκινο κρέας δεν πρέπει να ξεπερνά σε κανένα σημείο τους 7 °C, τα πουλερικά τους 4 °C, τα εντόσθια και οι κιμάδες τους 3 °C και τα καταψυγμένα προϊόντα τους -18 °C.
- Επίσης, οι χώροι επεξεργασίας πρέπει να έχουν μέγιστη θερμοκρασία τους 12 °C για να μετριάζεται η αύξηση της θερμοκρασίας των επεξεργαζόμενων κρεάτων και η ανάπτυξη βακτηρίων.
- Να έχει το προσωπικό της κατάλληλα εκπαιδευμένο.
- Να εφαρμόζει προγράμματα καθαρισμού και απολύμανσης των εγκαταστάσεων, των μηχανημάτων και των σκευών επεξεργασίας του κρέατος.
- Να εφαρμόζει σύστημα μυοκτονίας και απεντόμωσης.
- Να διενεργεί αναλύσεις βάσει προγράμματος αναλύσεων α, β υλών τελικών προϊόντων, νερού σύμφωνα με τον Κανονισμό αριθμ. ΕΚ 1447/2007 για τα μικροβιολογικά όρια των τροφίμων και την οδηγία 98/83/ΕΚ για το νερό.
- Να φροντίζει να εφαρμόζονται οι αρχές υγιεινής που περιγράφονται στον Κανονισμό ΕΚ αριθμ. 853/2004 και το σύστημα HACCP που πρέπει να τηρεί η επιχείρηση.

1.2 Ο ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ *Escherichia coli*

1.2.1 Γενικά

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Escherichia coli* (Εικ) έχει συσχετιστεί με πολυάριθμα θνησιγενή κρούσματα που αφορούν τροφικές λοιμώξεις, από μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων (Bell, 2002). Ο παθογόνος *E. coli* μπορεί να αποτελεί τη φυσική μικροχλωρίδα των ανθρώπων και των ζώων. Έχει αποδειχθεί ότι πολλοί τύποι γαστρεντερικών λοιμώξεων, προκαλούνται από έναν μεγάλο



Εικόνα 1.2.1.1: Το βακτήριο *E.coli*, όπως φαίνεται από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

www.nature-education.org

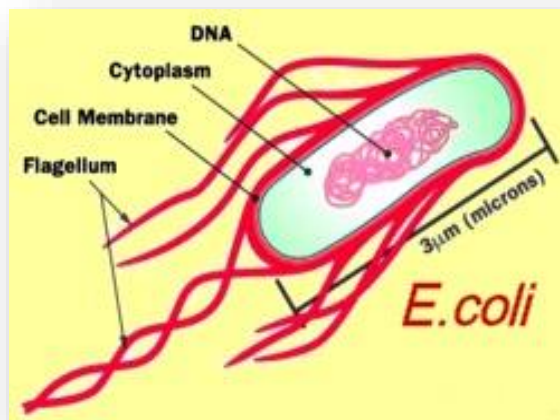
αριθμό διαφορετικών ομάδων του παθογόνου *E. coli*. Οι κύριες κατηγορίες διαρροϊκών στελεχών *E. coli* βάσει της λοιμωξιόγону δράσης τους είναι: εντεροπαθογόνα στελέχη (EPEC), εντεροδιεισδυτικά στελέχη (EIEC), εντεροτοξινογόνα στελέχη (ETEC), εντεροαθροιστικά στελέχη (EAEC), διάχυτα προσκολλημένα στελέχη *E. coli* (DAEC), εντεροαιμορραγικά στελέχη (EHEC) (Kaper, 2005). Μετά το πρώτο ομαδικό κρούσμα το 1982, το βακτήριο *E. coli* O157:H7 έχει γίνει το πιο γνωστό στέλεχος EHEC (Riley *et al.*, 1983).

Γενικά, πολλά παθογόνα στελέχη του *E. coli* έχουν την ίδια βιοχημική συμπεριφορά με άλλα μη παθογόνα στελέχη, με αποτέλεσμα να κάνουν δύσκολη την ανίχνευσή τους, ειδικά μεταξύ των EHEC (Bettelheim, 2007). Έχει βρεθεί ότι ο ορότυπος O157 είναι σε θέση να ζυμώνει την σορβιτόλη το οποίο αποτελεί ένα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό για την ανίχνευσή του (Riley *et al.*, 1983). Σε σύγκριση με άλλα παθογόνα του *E. coli*, ο συγκεκριμένος ορότυπος θα μπορούσε να προκαλέσει αιμορραγική κολίτιδα (HC) και άλλα σοβαρά συμπτώματα. Άλλοι ορότυποι όπως O26, O111 και NM, έχουν επίσης συσχετιστεί με HC και ταξινομούνται ως EHEC (Armstrong *et al.*, 1996). Η ικανότητά τους να παράγουν Shiga τοξίνες είναι κοινό χαρακτηριστικό όλων των EHEC που αναφέρονται συχνά ως Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC).

1.2.2 Ιστορικά στοιχεία

Το βακτήριο *E. coli* απομονώθηκε για πρώτη φορά από βρεφικά περιττώματα και μελετήθηκε από το μικροβιολόγο Dr.Theodor Escherich το 1885. Η βακτηριακή δυσεντερία *Shigella dysenteriae* αναφέρθηκε το 1898 από τον Kioshi Shiga (Shiga, 1898). Το 1955 ορίζεται και περιγράφεται το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS) (Gasser *et al.*, 1955), ενώ οι Keusch *et al.* (1972), έδειξαν ότι οι shiga τοξίνες συμβάλλουν στην αιμορραγική διάρροια. Οι Konowalchuk *et al.* (1977), διαπίστωσαν ότι ορισμένα στελέχη του παθογόνου *E. coli* παράγουν μια τοξίνη ικανή να σκοτώσει τα κύτταρα νεο. Το 1982, σημειώθηκαν σοβαρά περιστατικά αιμορραγικής διάρροιας στο Όρεγκον και το Μίσιγκαν, που σχετίζονται με την κατανάλωση χάμπουργκερ (Riley *et al.*, 1983). Οι O'Brien και LaVeck (1983) ανέφεραν ότι το στέλεχος *E. coli* O157:H7 συνδέεται με την αιμορραγική κολίτιδα (HC), καθώς παρήγαγε shiga τοξίνες.

1.2.3 Χαρακτηριστικά του παθογόνου *Escherichia coli*



Εικόνα 1.2.1.2: Δομή παθογόνου *Escherichia coli*. www.nature-education.org

Το γένος *E. coli* είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο και μη σποριογόνο, ραβδοειδούς σχήματος (Εικόνα 1.2.1.2). Ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Τα κύτταρα έχουν μήκος περίπου 2 μm , διάμετρο 0,5 μm και όγκο 0,6 – 0,7 μm^3 (Kubitschek, 1990). Το κύριο σώμα του βάκιλλου διαθέτει περίτριχα μαστίγια που

τον βοηθούν στην κίνησή του. Ο συγκεκριμένος παθογόνος μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί σε μια πληθώρα υποστρωμάτων. Υπό αναερόβιες συνθήκες παράγει γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Λόγω του ότι πολλά μεταβολικά μονοπάτια απελευθερώνουν υδρογόνο ο μικροοργανισμός *E. coli* συμβιώνει με μικροοργανισμούς ή θειοαναγωγικά βακτήρια προκειμένου οι δεύτεροι να μειώνουν τα επίπεδα του υδρογόνου, καθιστώντας το περιβάλλον πιο ευνοϊκό για την ανάπτυξή του (Madigan and Martinko, 2006).

Είναι ένα χαρακτηριστικό μεσόφιλο βακτήριο, που αναπτύσσεται από τους 7 με 10 °C ως τους 50 °C με βέλτιστη θερμοκρασία τους 37 °C. Επίσης, έχουν γίνει αναφορές για ορισμένα εντεροτοξινογόνα στελέχη (EPEC) που αυξάνονται σε θερμοκρασίες των 4 °C. Δεν παρουσιάζει καμία αξιοσημείωτη θερμοανθεκτικότητα (D_{60} ισούται με 0.1 min) και μπορεί να επιζήσει υπό κατάψυξη για εκτεταμένες περιόδους. Το βέλτιστο pH ανάπτυξής του είναι κοντά στο 7, αλλά η αύξηση είναι δυνατή ακόμα και κάτω από το pH 4.4. Ελάχιστη τιμή ενεργότητας νερού (a_w) για την αύξησή του είναι το 0.95.

Ένα σχέδιο ταξινόμησης ανά ορότυπο για το *E.coli* βασισμένο στο σωματικό λιποπολυσακχαρίτη O, μαστίγιο H, και πολυσακχαρίτη καψιδίου αντιγόνου K προτάθηκε από τον Kauffman. Στις μέρες μας εφαρμόζεται το O:H σύστημα κατά το οποίο οι κύριες οροομάδες καθορίζονται από τα αντιγόνα O και υποδιαιρούνται έπειτα σε ορότυπους βάσει των αντιγόνων H. Οπότε τα διάφορα στελέχη του παθογόνου *E. coli* τείνουν να εμπίπτουν σε κάποιο από τους ορότυπους O:H, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται το έργο της ταυτοποίησης και ανίχνευσης των παθογόνων.

Η μολυσματική δόση του EHEC είναι μια από τις χαμηλότερες δόσεις των παθογόνων του εντέρου, καθώς είναι μεταξύ 1 και 100 CFU (Paton and Paton, 1998a). Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του EHEC είναι η ικανότητά του να συνδέεται με τα κύτταρα του εντέρου (Welinder - Olsson και Kaijser, 2005).

Από το 1980, τα στελέχη EHEC έχουν καθιερωθεί ως τροφιμογενή παθογόνα, που συνδέονται με λοιμώξεις που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Η αιμορραγική κολίτιδα (HC) είναι η κύρια ασθένεια που συνδέεται με τα στελέχη EHEC και χαρακτηρίζεται από κράμπες στην κοιλιά και αιματηρή διάρροια. Το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS) χαρακτηρίζεται από μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία, θρομβοπενία, νεφρική ανεπάρκεια, και περιστασιακή αζωταιμία (Griffin and Tauxe, 1991; Johnson *et al.*, 2006; Paton and Paton, 1998a).

Περίπου το 8 % των ατόμων που έχουν μολυνθεί από το στέλεχος EHEC O157:H7 έχουν εμφανίσει συμπτώματα του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (HUS) (McNabb *et al.*, 2008; Tarr, 2009). Το συγκεκριμένο στέλεχος, έχει επιφέρει θάνατο σε ποσοστό 5% των μολυσμένων ατόμων και νεφρική ανεπάρκεια σε ποσοστό 25% (Garg *et al.*, 2003).

1.2.4 Εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (EHEC)

Ένας από τους ορότυπους που επικρατεί στα εντεροαιμορραγικά στελέχη EHEC είναι

ο O157:H7. Τα στελέχη αυτά μπορούν να προκαλέσουν μη-αιμορραγική διάρροια, μέσω της αιμορραγικής κολίτιδας, αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS) και θρομβωτική θρομβοκυτοπενική ερυθρίαση (TTP) (Karmali *et al.*, 1983, Grotorex and Thorne, 1994, Konowalchuk *et al.*, 1977). Τα στελέχη αυτά είναι ικανά να παράγουν Shiga τοξίνες και έχουν βρεθεί να συσχετίζονται με την αιμορραγική διάρροια ή το HUS, ενώ στελέχη με μόνο Stx1 βρίσκονται σπάνια σε ασθενείς με αιμορραγική διάρροια (Law, 2000). Η υψηλή μολυσματικότητα των στελεχών του *E. coli* O157:H7 εξαρτάται την ικανότητα του παθογόνου να επιβιώνει σε διάφορα περιβαλλοντικά στρες, όπως είναι το χαμηλό pH του γαστρεντερικού σωλήνα (Armstrong *et al.*, 1996). Τα στελέχη *E. coli* είναι κυτταροτοξικά για τα κύτταρα HeLa. Η κυτταροτοξική επίδραση θα μπορούσε να εξουδετερωθεί από αντιτοξίνη που προετοιμάστηκε ενάντια στην τοξίνη Shiga προερχόμενη από τη *Shigella dysenteriae*. Αυτή την τοξίνη, την αποκάλεσαν τοξίνη τύπου shiga (Shiga-like toxin-SLT) (O'Brien and Holmes, 1996). Η βεροτοξίνη και η τοξίνη τύπου shiga είναι η ίδια τοξίνη που είχε παραχθεί από τα στελέχη *E. coli* O157:H7 (Riley *et al.*, 1983). Η βεροκυτοτοξίνη και η τοξίνη τύπου Shiga προκαλούν εντεροκολίτιδα και HUS και είναι υπεύθυνες για την καταστροφή των εντερικών και νεφρικών ιστών (Karmali *et al.*, 1983).

Τα στελέχη της EHEC παράγουν τη βεροτοξίνη ή Verotoxin (αποκαλούμενη έτσι λόγω της ικανότητάς της να καταστρέφει τα νεφρικά κύτταρα του αφρικανικού πράσινου πιθήκου Vero). Μελέτες έχουν επισημάνει την παρουσία τουλάχιστον δύο τοξινών των VTI και VTII που λόγω της ομοιότητάς τους στην τοξίνη Shiga έχουν ονομαστεί επίσης τοξίνες τύπου shiga, SLTI και SLTII. Η ονοματολογία των τοξινών αυτών, έχει προταθεί να εισαχθεί στην «οικογένεια» των τοξινών Shiga, έτσι ώστε η τοξίνη Shiga να λάβει την κωδική ονομασία Stx, και οι τοξίνες SLTI και II να ονομαστούν Stx 1 και Stx 2 αντίστοιχα. Το Stx 1 φέρει μεγαλύτερη ομοιότητα προς την τοξίνη Shiga αφού αποτελείται επίσης από τις A (μοριακό βάρος 32 kDa) και B (μοριακό βάρος 7.7 kDa) υποομάδες και οι ομάδες B είναι δομικά ίδιες μεταξύ των δύο τοξινών. Οι ομάδες B προσκολλώνται στο δέκτη γλυκολιπιδίων Gb3, στην επιφάνεια ευκαρυωτικών κυττάρων. Η αυξημένη ευαισθησία του νεφρού στις μολύνσεις από τα στελέχη O157 μπορεί να οφείλεται στο μεγαλύτερο αριθμό αυτών των δεκτών στα νεφρικά σπειράματα (kidney glomeruli). Μετά από τη σύνδεση, η τοξίνη εισέρχεται εντός του κυττάρου με ενδοκύτωση και την υποομάδα A ενεργοποιημένη. Υδρολύει στη συνέχεια τον N-γλυκοσιδικό δεσμό μιας συγκεκριμένης αδενοσίνης στο 28S rRNA με αποτέλεσμα την παύση της πρωτεϊνικής σύνθεσης στο κύτταρο. Η τοξίνη Stx 2 επίσης

περιλαμβάνει δύο υποομάδες A και B αλλά αυτές είναι μεγαλύτερες απ' ό,τι στην Stx 1 (μοριακό βάρος 35 kDa και 10.7 kDa αντίστοιχα για τις A και B). Παρόλα αυτά διαθέτουν μια ομοιότητα 60% στην ακολουθία των αμινοξέων, με την τοξίνη Shiga. Ενώ η Stx 1 είναι μια ιδιαίτερα συντηρητική τοξίνη, η Stx 2 εμφανίζει παραλλαγές όπως είναι οι Stx2c, Stx2v, Stx2hb, και Stx2e. Ένα στέλεχος EHEC μπορεί να εκφράσει την Stx 1 μόνο, την Stx 2 μόνο, και τις δύο μαζί ή ακόμα και κάποιες από τις παραλλαγές της Stx 2.

Οι στομαχικές κράμπες, η υδατώδη ή αιματηρή διάρροια με κοιλιακό πόνο, είναι μερικά από τα συμπτώματα της αιμορραγικής κολίτιδας μετά από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων. Διακρίνεται από την τυπική κολίτιδα από την έλλειψη πυρετού και την απουσία λευκοκυττάρων στον εμετό. Έχει επιπτώσεις κυρίως στους ενήλικους, με μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης κατά τους θερινούς μήνες, και μπορεί να είναι απειλητική για τη ζωή των ηλικιωμένων. Το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS) διαθέτει τρία χαρακτηριστικά γνωρίσματα, την οξεία νεφρική ανεπάρκεια, την αιμολυτική αναιμία (μείωση του αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων) και τη θρομβοκυτοπενία (μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων του αίματος). Εμφανίζεται πολύ συχνά στα παιδιά όπου είναι η κύρια αιτία της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας στη δυτική Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική. Περίπου 10% των παιδιών κάτω από 10 ετών που μολύνθηκαν με E. coli O157 τείνει να εμφανίσει HUS και το 50% εξ αυτών θα χρειαστεί αιμοκάθαρση ενώ το ποσοστό θνησιμότητας ανέρχεται γενικά στο 3-5%. Σε 70 περιπτώσεις κρουσμάτων στο Λονδίνο μεταξύ 1980 και 1986 το ποσοστό μοιραίων περιστατικών ήταν 6-13% από άτομα που εμφάνιζαν μακροχρόνια νεφρική βλάβη. Σ' έναν οίκο ευγηρίας στην Αμερική, το ποσοστό θνητότητας εκ συνόλου 55 ασθενών ήταν 31%. Η θρομβωτική θρομβοκυτοπενική ερυθρίαση (TTP) συσχετίζεται με το HUS αλλά προκαλεί μικρότερη βλάβη στους νεφρούς και περιλαμβάνει πυρετό και νευρολογικά συμπτώματα ως αποτέλεσμα των θρόμβων αίματος στον εγκέφαλο. Η σύνδεση στα κύτταρα είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην ικανότητα πρόκλησης συμπτωμάτων και το στέλεχος O157:H7 διαθέτει την περιοχή παθογένειας LEE και προσκολλώνται με ένα μηχανισμό όμοιο αυτού των στελεχών EPEC, που χαρακτηρίζεται από την σύνδεση των βακτηριακών κυττάρων στα επιθηλιακά κύτταρα και την αποβολή μικρολαχνών.

1.2.5 Εντεροτοξινογόνα στελέχη *E. coli* (ETEC)

Η ασθένεια που προκαλείται από τα εντεροτοξινογόνα στελέχη ETEC εμφανίζεται συνήθως μεταξύ 12 και 36 ωρών μετά από την κατανάλωση του τροφίμου. Τα συμπτώματα μπορούν να κυμανθούν από μια ήπια απύρετη διάρροια ως μια οξεία αντίδραση σαν αυτές που εμφανίζονται στην περίπτωση της χολέρας (Sixma *et al.*, 1993) χωρίς όμως έκκριση αίματος ή βλέννας και παράλληλα με στομαχικούς πόνους και εμετό. Η ασθένεια συνήθως περιορίζεται από μόνη της μετά από 2-3 ημέρες. Στις αναπτυσσόμενες χώρες είναι μια κοινή αιτία της παιδικής διάρροιας και μπορεί να προκαλέσει σοβαρή αφυδάτωση.

Παράγονται δύο τύποι τοξινών: οι τοξίνες (ST), που είναι σταθερές και ανθεκτικές στη θέρμανση και στην παρουσία οξέων και οι τοξίνες (LT), που είναι ασταθείς στη θέρμανση και αδρανοποιούνται σε θερμοκρασίες των 60°C μετά από 30 min και σε χαμηλό pH. Η τοξίνη LTI φέρει μια ισχυρή ομοιότητα με την τοξίνη της χολέρας αφού αποτελείται από πέντε υπομονάδες B (με μοριακό βάρος 11.5 kDa) (Clemens *et al.*, 1988) που είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση της τοξίνης στα επιθηλιακά κύτταρα και μια υπομονάδα A (με μοριακό βάρος 25 kDa) που μεταφέρεται στα επιθηλιακά κύτταρα όπου και ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση (cyclase adenylate) (Tauschek *et al.*, 2002).

1.2.6 Εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli* (EPEC)

Οι μολύνσεις από τα εντεροπαθογόνα στελέχη EPEC μεταδίδονται συχνά από άτομο σε άτομο. Έχουν συνδεθεί με τη νηπιακή διάρροια. Μερικά από τα συμπτώματα της μόλυνσης είναι η δυσφορία, ο εμετός και η διάρροιας που περιέχει βλέννα και σπανιότερα αίμα. Εμφανίζονται μεταξύ 12-36 ωρών μετά την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου. Η παθογένεια σχετίζεται με τη δυνατότητα των στελεχών EPEC να προσκολλώνται έντονα στη μεμβράνη των κυττάρων και να προκαλούν τραύματα (Donnenberg *et al.*, 1997).

1.2.7 Εντεροδισιδυτικά στελέχη *E. coli* (EIEC)

Η μόλυνση από τα εντεροδισιδυτικά στελέχη EIEC παρουσιάζει τα κλασσικά συμπτώματα μιας βακτηριακής δυσεντερίας σαν αυτή που προκαλείται από τη *Shigella* (Day *et al.*, 1981). Και στις δύο περιπτώσεις ο παθογόνος εισβάλλει και πολλαπλασιάζεται μέσα στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου προκαλώντας έλκος και φλεγμονή παρά το γεγονός ότι η EIEC δεν παράγει τοξίνη όπως η *Shigella* (Shiga toxin). Τα συμπτώματα είναι πυρετός, κοιλιακοί πόνοι, δυσφορία και αιμορραγική διάρροια. Η μολυσματική δόση EIEC εμφανίζεται να είναι ουσιαστικά υψηλότερη σε σχέση με τη *Shigella* καθώς παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στο γαστρικό οξύ (Day *et al.*, 1981).

1.2.8 Εντεροαθροιστικά στελέχη *E. coli* (EAEC)

Τα κολοβακτηρίδια των εντεροαθροιστικών στελεχών (EAEC) προσκολλώνται στα κύτταρα της ιστοκαλλιέργειας Hep-2 *in vitro*. Τα EAEC σχηματίζουν αθροίσματα που προσκολλώνται τόσο πάνω στα κύτταρα, όσο και στα μεταξύ τους κενά, σε αντίθεση με τα EPEC στελέχη τα οποία προσκολλώνται κατά τόπους και λιγότερο συχνά στα κύτταρα της ιστοκαλλιέργειας (Nataro, 1987).

Η παθογένεια των EAEC δεν έχει γίνει απολύτως κατανοητή παρά τις ιστοπαθολογικές αλλαγές που επιφέρει στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου των ασθενών (Tzipori *et al.*, 1992, Hicks *et al.*, 1996). Οι αλλαγές που προκλήθηκαν κατά τη διάρκεια της μόλυνσης συνδέθηκαν με την παραγωγή μιας κυτταροτοξίνης. Με βάση αυτή την κυτταροτοξίνη προσδιορίστηκαν δύο πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους (Eslava *et al.*, 1993), η Pic (protein of intestinal colonization) (Henderson *et al.*, 1999) και η Pet (plasmid-encoded toxin) (Navarro-Garcia *et al.*, 1999). Αυτές προκαλούν σμίκρυνση των λαχνών, αιμορραγικές και νεκρωτικές αλλαγές καθώς και έλκος του ανώτερου επιθηλίου.

1.3. Η ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΟΥ *Escherichia coli* O157:H7 ΣΕ ΜΠΙΦΤΕΚΙΑ ΑΠΟ ΒΟΕΙΟ ΚΙΜΑ

Διάφορες έρευνες έχουν δημοσιευθεί σχετικά με την πρόληψη, το χαρακτηρισμό και τον έλεγχο του *E. coli* O157: H7 στα τρόφιμα, και κυρίως στο βόειο κρέας (Enache *et al.*, 2011).

Είναι πλέον αποδεδειγμένο, ότι το *E. coli* O157:H7 αποτελεί βασική πηγή μόλυνσης των μπιφτεκιών από βόειο κιμά. Το 50% των καταγεγραμμένων κρουσμάτων στις ΗΠΑ μεταξύ του 1982 και του 1994, αναφέρουν τον συγκεκριμένο παθογόνο (Meng and Doyle, 1998). Το 3,2% των Ιρλανδικών σφάγιων ζώων έχει μολυνθεί από *E. coli* (McEnoy *et al.*, 2001). Εκτιμάται ότι το *E. coli* O157: H7 από ένα μολυσμένο σφάγιο κρέας θα μπορούσε να οδηγήσει στην μόλυνση αρκετών τόνων μπιφτεκιών (Armstrong *et al.*, 1996).

Τα μπιφτέκια αποτελούν μια πιθανή ανησυχία για την ασφάλεια των τροφίμων, επειδή ποικίλουν στην αγορά ως προς το μέγεθος, τα συστατικά και την μορφή συντήρησής τους, καθώς άλλα πωλούνται υπό κατεψυγμένη μορφή και άλλα σε θερμοκρασία ψυγείου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, να μην είναι καθορισμένος ο χρόνος ψησίματος, προκειμένου να έχουμε την επιθυμητή θερμοκρασία στο κέντρο του προϊόντος. Σε μια έρευνα που διεξήχθη στην Καλιφόρνια για την προετοιμασία των μπιφτεκιών πριν το ψήσιμο, το 22% των καταναλωτών δεν είχε αποψύξει τα μπιφτέκια πριν το μαγείρεμα (Phang, H. S., and C. M. Bruhn, 2011).

Αν και στις ετικέτες των συσκευασιών αναγράφεται ο χρόνος και ο τρόπος ψησίματος, οι συγγραφείς επισημαίνουν ότι το κρέας πρέπει πρώτα να ξεπαγώνετε ώστε να ψηθεί ομοιόμορφα και να αποφύγουμε την ύπαρξη ψυχρών σημείων στη μάζα τους (http://www.foodsafety.gov/blog/fathers_day.html).

Ωστόσο η απόψυξη των κατεψυγμένων μπιφτεκιών σε θερμοκρασία δωματίου, είναι μια πρακτική που θα μπορούσε ενδεχομένως να παρέχει ευνοϊκές συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων (Phang, H. S., and C. M. Bruhn, 2011).

Ο Κώδικας Τροφίμων στο U.S. Food and Drug Administration (FDA) απαιτεί ελάχιστη στιγμιαία εσωτερική θερμοκρασία μαγειρέματος τους 70 °C ή μια εσωτερική θερμοκρασία των 68.5 °C για 15 s (U.S. Food and Drug Administration, 2001). Στις οδηγίες που δίνει στους καταναλωτές η USDA – Food Safety Inspection Services (USDA-FSIS) για ασφαλή τρόφιμα, δηλώνει ότι τα αλεσμένα κρέατα πρέπει να

μαγειρεύονται μέχρι η εσωτερική θερμοκρασία στο κέντρο του προϊόντος να φτάσει στους 71,1°C (http://www/fsis.usda.gov/FACTSheets/Keep_Food_Safe_Food_Safety_Basics/index.asp).

Επιπλέον, τόσο ο ρυθμός κατάψυξης όσο και η θερμοκρασία αποθήκευσης, μπορεί να επηρεάζει τη βιωσιμότητα του βακτηρίου στην επακόλουθη θερμική πρόκληση (Jackson *et al.*, 1996).

1.3.1 Αξιολόγηση ψησίματος με βάση το χρώμα

Για το βόειο κρέας, το σωστό μαγείρεμα είναι ο τελικός φραγμός για την πρόληψη των καταναλωτών, από τις ασθένειες που δημιουργεί το μολυσμένο κρέας. Αυτό είναι ιδιαίτερα αληθές για μπιφτέκια που τοποθετούνται στη σχάρα υπό κατεψυγμένη μορφή, σε αντίθεση με τα μπιφτέκια που διατηρούνται στο ψυγείο. Το ψήσιμο των κατεψυγμένων μπιφτεκιών θα μπορούσε να διαρκέσει έως και το διπλάσιο χρόνο προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή θερμοκρασία στο κέντρο (American Meat Institute, 2010).

Περίπου το 80% των Αμερικανών έχουν καταναλώσει βόειο κρέας στο σπίτι τους εντός 2 εβδομάδων και το 18% των 6.433 ερωτηθέντων ενηλίκων που καταναλώνουν βόειο κρέας στο σπίτι ανέφεραν ότι το έτρωγαν " ροζ " (Taylor *et al.*, 2012).

Όσον αφορά το τελευταίο, οι περισσότεροι καταναλωτές αξιολογούν το μπιφτέκι αν είναι αρκετά ψημένο από το χρώμα που έχει στο κέντρο του (Phang, H. S., and C. M. Bruhn, 2011). Έχει επίσης υπολογιστεί ότι μόνο το 14% των καταναλωτών χρησιμοποιούν θερμόμετρο για την αξιολόγηση του ψησίματος (American Meat Institute, 2010).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, για την πρόληψη των καταναλωτών από τις ασθένειες που δημιουργούν τα μολυσμένα κρέατα, είναι αναγκαίο να γίνουν πρόσθετες μελέτες, προκειμένου να μειωθεί η εμφάνιση του παθογόνου *E. coli* O157:H7 στο βόειο κρέας. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητο να ερευνηθούν σε συνδυασμό συγκεκριμένοι παράγοντες στην θερμική επεξεργασία των μπιφτεκιών, όπως είναι το λίπος, το αλάτι, το μέγεθος, η κατάψυξη, η διάρκεια κατάψυξης, ο χρόνος και η θερμοκρασία μαγειρέματος, με στόχο την μελέτη της θερμοανθεκτικότητας του παθογόνου.

1.4 ΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ

1.4.1 Η επίδραση της κατάψυξης στην επιβίωση του παθογόνου *E. coli* O157:H7

Η κατάψυξη είναι ένας εξαιρετικός τρόπος διατήρησης των τροφίμων. Τεράστιες ποσότητες τροφίμων ανά τον κόσμο καταψύχονται, καθώς με αυτό τον τρόπο διατηρείται η γεύση, η σύσταση και η θρεπτική αξία των τροφίμων καλύτερα από κάθε άλλη μέθοδο.

Στις χαμηλές θερμοκρασίες υπό το μηδέν, οι ρυθμοί των αντιδράσεων μειώνονται. Έτσι οι μικροοργανισμοί μπορούν να αδρανοποιηθούν στα τρόφιμα σε συνθήκες κατάψυξης για μεγάλα χρονικά διαστήματα, καθιστώντας τα ασφαλή για την υγεία του καταναλωτή. Ωστόσο, κάποιοι παθογόνοι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να προσαρμόζονται σε δύσκολες περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα μικρόβια, ανάλογα με τη θερμοκρασία όπου αναπτύσσονται, διακρίνονται σε θεμόφιλα, μεσόφιλα και ψυχρόφιλα.

Ορισμένα από τα ψυχρόφιλα αναπτύσσονται σε συνθήκες υπό το μηδέν. Τα πιο συνηθισμένα παθογόνα μικρόβια, είναι μεσόφιλα, όπως είναι ο παθογόνος μικροοργανισμός *E. coli*. Η ψύξη και η κατάψυξη των τροφίμων αναστέλλει την ανάπτυξη του *E. coli* και για αυτό το λόγο η συμπεριφορά αυτού του οργανισμού σε συνθήκες κατάψυξης έχει ενδιαφέρον. Αν και ένα μέρος του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού πεθαίνει ή αδρανοποιείται, μια υπολειπόμενη ποσότητα κατορθώνει να επιβιώνει στα κατεψυγμένα τρόφιμα, συνιστώντας απειλή για την υγεία του ανθρώπου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την πιθανότητα επιδημιών τροφιμογενών λοιμώξεων που σχετίζονται με κατανάλωση κατεψυγμένων τροφίμων. Μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί πολλές επιδημικές εκρήξεις οφειλόμενες σε κατεψυγμένα τρόφιμα ή σε πάγο που περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς ή τοξίνες. Παρασκευάσματα μολυσμένου με *E. coli* κρέατος αποτέλεσαν αιτία επιδημίας στις ΗΠΑ (Centres For Disease Control And Prevention, 1997)

Τα βακτηριακά κύτταρα μπορεί να τραυματιστούν κατά τη διάρκεια της κατάψυξης (Mossel and Netten, 1984; Ray, 1986; Musarrat and Ahmad, 1988). Η επιβίωση του *E. coli* O157: H7 έχει μελετηθεί για έναν μεγάλο αριθμό προϊόντων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους στην κατάψυξη, καθώς επίσης και κατά την απόψυξή τους, συμπεριλαμβανομένων το βόειο κρέατος (Sage & Ingham, 1998a), τον χυμό μήλου

(Sage & Ingham, 1998b) τα λαχανικά (Ackers *et al.*, 1998), το γάλα (Chapman, Wright & Higgins, 1993) και το κοτόπουλο (Conner & Hall, 1994).

1.4.2 Μηχανισμοί επίδρασης της κατάψυξης στην επιβίωση του *E. coli* O157:H7

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η κατάψυξη μπορεί να προκαλέσει βλάβη των μικροβίων είναι πολλοί. Αυτοί σχετίζονται με τη συγκέντρωση πάγου ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια, με τη συγκέντρωση ενδοκυττάρια ή εξωκυττάρια διαλυτών ουσιών, που σε μεγάλες δόσεις μπορεί να είναι τοξικές για το κύτταρο με τη μείωση τον κυτταρικού όγκου, με οξειδωτική βλάβη (Lynd *et al.*, 2000; Potter NN, 1986; Stead D and Park SF, 2000)

Η συγκέντρωση του πάγου εξωκυττάρια οδηγεί σε μετακίνηση μεγάλου όγκου του νερού από τον ενδοκυττάριο χώρο, με αποτέλεσμα τη ρίκνωση του κυττάρου. Κατά την κατάψυξη, η κυτταρική μεμβράνη υφίσταται βλάβη, λόγω της αποδόμησης της λιπιδιακής δομής της, και της επίδρασης των μικροκρυστάλλων που σχηματίζονται ενδοκυττάρια (Souzou H. *et al.*, 1989)

Κατά τη διαδικασία της κατάψυξης, το υδάτινο διάλυμα παραμένει σε υγρή μορφή έως ότου φθάσει τη θερμοκρασία πήξης του, σε κάποια θερμοκρασία υπό το μηδέν. Η πήξη επεκτείνεται σταδιακά σε όλη τη μάζα τον τροφίμου. Όταν η τροφή παγώνει, ο πάγος διαχωρίζεται από το υδάτινο διάλυμα και η πίεση ατμών του πάγου είναι σε ισορροπία με την πίεση ατμών τον διαλύματος που δεν έχει παγώσει. Καθώς ο πάγος διαχωρίζεται, διαλυτές ουσίες που υπάρχουν στην τροφή συγκεντρώνονται στο εναπομένον υγρό. Οι ουσίες αυτές είναι σάκχαρα, αμινοξέα, αμίνες, άλατα κ.ά. Η συγκέντρωση ουσιών αυξάνεται μέχρι την πήξη του εναπομένοντος υγρού. Το φυσικοχημικό αυτό περιβάλλον επηρεάζει την επιβίωση των μικροβίων (Erickson and Hungy, 1997) Τα μικρόβια που έχουν επιβιώσει σε συνθήκες κατάψυξης διατηρούν την ικανότητα ανάπτυξης, όταν βρεθούν σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και θρεπτικού υλικού. Υπάρχουν περιπτώσεις που τα μικρόβια μετά από κατάψυξη δεν είναι δυνατόν να καλλιεργηθούν. Αυτό συμβαίνει όταν το θρεπτικό υλικό στο οποίο καταψύχθηκε ο μικροοργανισμός δεν ήταν ευνοϊκό γι' αυτόν. Τα τρόφιμα αποτελούν συνήθως καλό θρεπτικό υλικό (Chang *et al.*, 2003)

Τα ψυχρόφιλα βακτήρια διαθέτουν ειδικές πρωτεΐνες. Με τις πρωτεΐνες αυτές, ευνοείται η ανάπτυξή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες και μπορούν να ανταπεξέλθουν σε ένα ψυκτικό shock.. Έχειδειχθεί ότι ο παθογόνος *E. coli* O157:H7, μπορεί να προσαρμόζεται σε ψυχρό περιβάλλον και να αναπτύσσει προστατευτικές πρωτεΐνες (Hebraud M, Potier P, 1999; Inoue M, Phadtar S, 2004)

Η επιβίωση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα, που είναι αποθηκευμένα σε συνθήκες κατάψυξης, δεν περιορίζεται πάντοτε ανάλογα με τη μείωση της θερμοκρασίας. Η καταστροφή των μικροβίων γίνεται κατά τη διάρκεια της κατάψυξης και συνεχίζεται για μερικές ημέρες μετά από τη σταθεροποίηση της θερμοκρασίας, στο εσωτερικό του προϊόντος. Το μικροβιακό φορτίο παραμένει σταθερό (Moorhead SM, Dykes GA, 2002). Θεωρείται ότι η αποθήκευση των τροφίμων σε θερμοκρασίες κάτω των -60 °C σχεδόν αναστέλλει την περαιτέρω καταστροφή όσων μικροβίων έχουν επιβιώσει κατά τη διαδικασία κατάψυξης.

Οι μικροβιακές τοξίνες παραμένουν αναλλοίωτες σε συνθήκες κατάψυξης. Έτσι, είναι δυνατόν να απειλήσουν την υγεία, τρόφιμα τα οποία περιέχουν πριν από την κατάψυξή τους σταφυλοκοκκική ή αλλαντική τοξίνη (Olson JC, Nottingham PM, 1980)

1.4.3 Η επίδραση του ρυθμού κατάψυξης στην επιβίωση του *E. coli* O157:H7

Ο ρυθμός κατάψυξης επηρεάζει επίσης την επιβίωση του παθογόνου *E. coli* O157:H7. Η ταχεία κατάψυξη συνήθως αντιστοιχεί σε μείωση θερμοκρασίας 20-25 °C σε μισή ώρα, ενώ η αντίστοιχη βραδεία κατάψυξη διαρκεί αρκετές ώρες. Η ταχεία κατάψυξη ευνοεί την επιβίωση του μικροοργανισμού. Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί επειδή με την ταχεία κατάψυξη η πτώση της αναλογίας μερικής πίεσης των ατμών νερού και πάγου είναι ταχύτερη και η έκθεση του μικροοργανισμού σε αυξημένες συγκεντρώσεις βλαπτικών ουσιών είναι μικρότερη. Επίσης, η ταχύτερη ψύξη οδηγεί σε σχηματισμό μικρότερων κρυστάλλων. Ο ρυθμός καταστροφής μικροβίων είναι μεγαλύτερος στα αρχικά στάδια της κατάψυξης και ακολούθως μειώνεται. Η *Escherichia coli* επιβιώνει

καλύτερα όταν ο ρυθμός κατάψυξης είναι 6 °C/min, συγκριτικά με μεγαλύτερους ή μικρότερους ρυθμούς κατάψυξης (Calcott PH, McLeod RA, 1974).

1.5 ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Η θερμική επεξεργασία των τροφίμων, στηρίζεται στην αδρανοποίηση ή και καταστροφή μικροοργανισμών στόχων (βλαστικών μορφών ή /και σπορίων) ή μορίων (πχ ενζύμων, τοξινών, αλλεργιογόνων), τα οποία μπορεί να αλλοιώσουν τα τρόφιμα. Η θερμική επεξεργασία, δηλαδή η μεταφορά θερμότητας στο κρέας, θα πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να αποφευχθούν οι δυσμενείς επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό με την εμφάνιση κυρίως τροφικών δηλητηριάσεων. Οι παράγοντες που συμμετέχουν στο να εξασφαλιστεί η ασφάλεια του κρέατος είναι αποτέλεσμα της θερμοκρασίας, του χρόνου και της μεθόδου που θα χρησιμοποιηθεί για το μαγείρεμα του.

1.5.1 Θερμική επεξεργασία *E. coli* O157:H7 για την αδρανοποίησή του

Σήμερα η αδρανοποίηση του *E. coli* O157: H7 σε μπιφτέκια, επιτυγχάνεται μέσω της θερμότητας κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος. Η ελάχιστη θερμική επεξεργασία που προτείνεται στην Ιρλανδία και το Ηνωμένο Βασίλειο για το μαγείρεμα του μοσχαρίσιο κιμά και των μπιφτεκίων είναι οι 70 ° C για 2 λεπτά στο κέντρο (FSAI, 1999; ACMSF, 1995). Ωστόσο, επειδή υπάρχει η πιθανότητα διασταυρούμενης επιμόλυνσης ή και η πιθανότητα ανεπαρκούς μαγειρέματος (Griffith *et al.*, 1994; Scott, 1996; Tarsitani *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 1998), είναι επιθυμητό το προϊόν να είναι απαλλαγμένο από το παθογόνο όταν φεύγει από το εργοστάσιο παραγωγής (Jordan *et al.*, 1999). Για τη μείωση ή την εξάλειψη του παθογόνου, εκτός από θερμική επεξεργασία, υπάρχουν και άλλες μέθοδοι όπως είναι η κατάψυξη, η χρήση βακτηριοκτόνων ουσιών, όπως γαλακτικό νάτριο, γαλακτικό οξύ και κιτρικό οξύ (Dorsa, Siragusa, Cutter, Berry and Koohmaraie, 1997), η εφαρμογή παλμών υψηλής ηλεκτρικής τάσης (Liu, Yousef and Chism, 1997) , καθώς επίσης και η χρήση υψηλής πίεσης.

1.6 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΛΙΠΟΥΣ ΣΤΗ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *E. coli* O157:H7

Η επιβίωση του μικροοργανισμού σε κατεψυγμένο κρέας διαφέρει ανάλογα με το είδος του κρέατος και την περιεκτικότητά του σε λίπος. Συγκεκριμένα, αυξάνεται όταν η περιεκτικότητα σε λίπος είναι μεγαλύτερη, αλλά όταν η συγκέντρωση λίπους πλησιάζει το 50% η αντοχή του μικροβίου μειώνεται. Αυτό μάλλον οφείλεται στην κρυσταλλοπροστατευτική δράση που ασκούν η γλυκερόλη και τα γλυκερίδια, ενώ όταν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα αυξηθούν, ο παθογόνος καταστρέφεται από το ψύχος (Sheridan JJ, 1997). Η ποσότητα των μικροβίων επηρεάζει το ποσοστό επιβίωσης. Πιθανόν, τα μικρόβια που έχουν καταστραφεί, δημιουργούν συνθήκες προστασίας για τα εναπομείναντα. Δεν είναι σαφές αν αυτό οφείλεται στην παραγωγή κρυσταλλοπροστατευτικών ουσιών (Muntada-Carriga JM *et al.*, 1995) ή στην παραγωγή ειδικών μορίων, όπως λακτόνες ή πρωτεΐνες, που λειτουργούν ως αγγελιοφόροι προς άλλα κύτταρα, ώστε αυτά να προσαρμοστούν στο ψυκτικό stress (Rowbury RJ, 2000).

Κατά τη θερμική επεξεργασία, το λίπος επιδρά στην ανθεκτικότητα του παθογόνου *E. coli* O157:H7, προστατεύοντάς τον. Η αύξηση της περιεκτικότητας σε λίπος ελαττώνει την ενεργότητα νερού (a_w), με αποτέλεσμα να συμβάλει στην επιβίωσή του. Αυτό συμβαίνει διότι η περιεκτικότητα του νερού είναι περιορισμένη και συνεπώς η θερμική αγωγιμότητα είναι μειωμένη. Δημιουργούνται μικροθύλακες νερού, που μεταβάλλουν τη μεταφορά θερμότητας, προσφέροντας στο κύτταρο δομική προστασία. Έτσι, τα κύτταρα του παθογόνου δεν επηρεάζονται από την θερμική αντίσταση και επιβιώνουν (Banwart, 1981). Αυτό αποδεικνύεται και σε μια μελέτη, στην οποία αναφέρονται τα αποτελέσματα της θερμικής επεξεργασίας καταψυγμένων μπιφτεκίων χαμηλής και υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος. Τα μπιφτέκια υψηλού ποσοστού λίπους σημείωσαν μεγάλη θερμοανθεκτικότητα στον παθογόνο *E. coli* O157:H7, σε σχέση με αυτά που περιείχαν μικρό ποσοστό λίπους (Luchansky *et al.*, 2013).

1.7 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ ΣΤΗ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *E. coli* O157:H7

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η προσθήκη NaCl, λειτουργεί ως ανασταλτικός παράγοντας για την ανάπτυξη των παθογόνων. Ωστόσο, όταν επιδρά η προσθήκη NaCl σε συνδυασμό με τη θέρμανση κατά τη θερμική επεξεργασία, αυξάνεται η αντοχή του παθογόνου *E. coli* O157:H7. Αυτό συμβαίνει διότι ελαττώνεται η ενεργότητα νερού των δειγμάτων και δεν υπάρχει διαθέσιμο νερό για να μεταφερθεί η θερμότητα, με αποτέλεσμα τα κύτταρα του παθογόνου να μην έρχονται σε επαφή γρήγορα με την αλλαγή της θερμοκρασίας και να προστατεύονται έμμεσα.

Όσο αυξάνεται η ποσότητα του NaCl, τόσο αυξάνεται η θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου *E. coli* O157:H7. Αυτό αποδεικνύεται και σε μια συγκεκριμένη μελέτη, στην οποία αποδείχτηκε ότι ο συνδυασμός της θερμότητας και της προσθήκης NaCl επιδρούν σημαντικά στην θερμοανθεκτικότητα. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της έρευνας (Πίνακας 1.7.1) δείχνουν ότι με την προσθήκη 8,5% (w/w) NaCl σε συνδυασμό με τη θερμότητα κατά τη θερμική επεξεργασία, υπάρχει αυξημένη θερμοαντοχή του *E. coli* O157:H7, σε σχέση με την προσθήκη μικρότερου ποσοστού άλατος (3%) (Blackburn *et al.*, 1997). Επομένως, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του NaCl, από ανασταλτικός παράγοντας έχει τη δυνατότητα να προσδώσει θερμική αντίσταση στον παθογόνο.

Πίνακας 1.7.1. Προσθήκη NaCl κατά τη θερμική επεξεργασία (Blackburn *et al.*, 1997)

D_{62,5°C} (s) <i>E. coli</i> O157:H7				
Συνθήκες (% w/w NaCl, pH)	Στελέχη			
	E30138	E30228	E30480	E32511
0,5% w/w NaCl, pH 4,3	19	34	15	33
3,5% w/w NaCl, pH 5,1	62	112	80	59
8,5% w/w NaCl, pH 4,3	140	158	108	114

1.8 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ ΚΑΙ Η ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗ

Κάποιες ουσίες έχουν την ιδιότητα να προστατεύουν τα κύτταρα από βλάβες που προκαλούνται από την κατάψυξη, συμβάλλοντας έτσι στην επιβίωση των μικροοργανισμών στην κατάψυξη. Οι ουσίες αυτές ονομάζονται κρυοπροστατευτικές.

Πρόκειται για μικρομοριακές ενώσεις, όπως σάκχαρα, αμινοξέα, γλυκερόλη, γλυκόλες. Αν και μεγαλομοριακές ενώσεις μπορεί να έχουν κρυοπροστατευτική δράση (Fennema OR et al., 1973; Ray B, Speck ML, 1973).

Ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν οι ουσίες αυτές δεν είναι απόλυτα σαφής. Σύμφωνα με κάποιες θεωρίες, δεσμεύουν το νερό πλησίον της κυτταρικής επιφάνειας, προστατεύοντας αυτήν από την ψύξη, ή μειώνουν τον ενδοκυττάριο πάγο ή περιορίζουν το σχηματισμό βλαπτικών ηλεκτρολυτών. Πρόσφατα, έχει δειχθεί ότι ορισμένες ουσίες μπορεί να επηρεάσουν τη συμπεριφορά ενός μικροοργανισμού στο ψύχος, παρεμβαίνοντας στο επίπεδο ενζύμων που ασκούν προστατευτική δράση έναντι της οξειδωτικής βλάβης του κυττάρου (Stead D, Park SF, 2000).

Η γλυκερόλη, έχει παρόμοια δράση με το NaCl, καθώς δεσμεύει το νερό πλησίον της κυτταρικής επιφάνειας, με αποτέλεσμα να προστατεύει τον παθογόνο από την ψύξη, αλλά και από την θέρμανση κατά την θερμική επεξεργασία.

1.9 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΣΤΗΝ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ

Το μέγεθος των μπιφτεκιών μπορεί να προκαλέσει πιθανή ανησυχία για την ασφάλεια των τροφίμων. Το ψήσιμο σε ένα μπιφτέκι μεγάλου μεγέθους μπορεί να διαρκέσει περισσότερο σε σχέση με ένα μικρότερου μεγέθους και να χρειαστεί υψηλότερες θερμοκρασίες για την επίτευξη της θερμοκρασίας στόχου στο κέντρο του. Έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε τρυφεροποιημένο κρέας, το οποίο προσομοιάζει το μπιφτέκι, έδειξε ότι τα δείγματα μικρότερου μεγέθους, παρουσιάζουν μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου *E.coli* O157:H7, σε σχέση με τα μεγαλύτερα (Πίνακας 1.9.1) (Shen et al., 2010).

Πίνακας 1.9.1 Επίδραση μεγέθους κατά τη θερμική επεξεργασία (Shen et al., 2010).

Διαδικασία	Συσκευή	Πάχος (cm)		
		1,5	2,5	4,0
Μάρτυρας	χωρίς θερμική επεξεργασία	6,4 ± 0,1 a	6,4 ± 0,1 a	6,4 ± 0,1 a
τηγάνισμα (pan broiling)	ηλεκτρικό τηγάνι (presto electric skillet)	4,7 ± 0,1 b A	4,3 ± 0,4 b A	3,6 ± 0,6 b B
ψήσιμο (roasting)	φούρνος (oster toaster oven)	4,2 ± 0,2 c A	3,7 ± 0,5 c A	2,7 ± 1,1 c B
	ηλεκτρική κουζίνα (magic chef kitchen oven)	4,4 ± 0,3 bc A	3,5 ± 1,0 bc A	2,2 ± 1,0 c B

1.10 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝ ΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥΣ ΣΤΙΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΙΣ

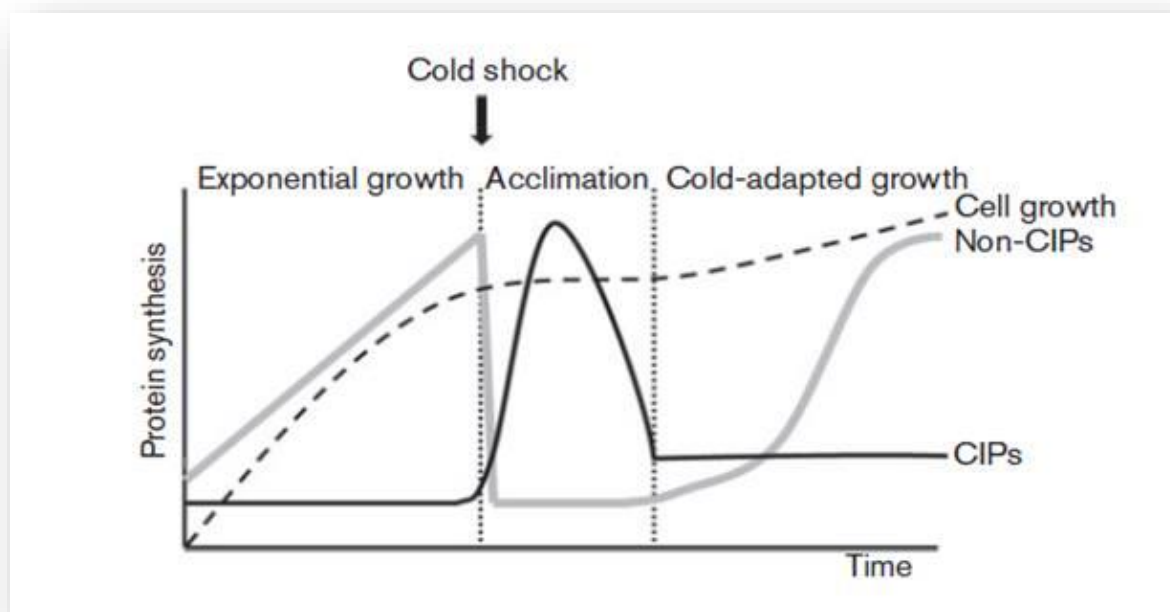
Οι διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις προκαλούν την αναστολή των μικροοργανισμών, οι οποίοι καλούνται κάτω από αυτές τις συνθήκες να προσαρμοστούν. Στις περιβαλλοντικές αυτές καταπονήσεις περιλαμβάνονται οι υψηλές και χαμηλές τιμές θερμοκρασίας, οι όξινες καταπονήσεις και η επίδραση των λιπαρών οξέων. Αν οι μικροοργανισμοί καταφέρουν να προσαρμοστούν στο εκάστοτε περιβάλλον, υπερνικούν τις περιβαλλοντικές προκλήσεις και έπεται η ανάπτυξη και η εξέλιξη τους. Για την προσαρμογή στα ερεθίσματα αυτά, λαμβάνει χώρα μία σειρά από προγραμματισμένες αποκρίσεις (programmed responses). Στις αποκρίσεις αυτές, πραγματοποιείται μία μεταβολή στο περιβάλλον, μεταδίδεται και οδηγεί στην αλλαγή έκφρασης των γονιδίων. Εκτός από την αλλαγή έκφρασης των γονιδίων, ορισμένες φορές πραγματοποιείται και προγραμματισμός των γονιδίων. Τα γονίδια αυτά θα υποβληθούν εσκεμμένα σε μεταλλάξεις και παράγονται φαινότυποι που οδηγούν σε μικτούς πληθυσμούς. Οι μικτοί πληθυσμοί προσδίδουν μεγαλύτερη παραλλακτικότητα και ικανότητα επιβίωσης. Επιπλέον η διαδικασία αυτή του προγραμματισμού των γονιδίων αναφέρεται και ως παραλλαγή φάσης (phase variation). Στην παραλλαγή

φάσης πραγματοποιούνται αλλαγές στη δομή του βακτηριακού DNA που μεσολαβεί της έκφρασης των φαινοτύπων για αντιστροφή μιας περιβαλλοντικής πρόκλησης και δημιουργίας προσαρμοστικότητας στα διάφορα περιβάλλοντα (Salaun *et al.*, 2003). Η αλλαγή στο περιβάλλον προηγείται και έπεται αλλαγή και στον μικροοργανισμό. Όσον αφορά την παραλλαγή φάσης, το σύστημα είναι πιο δυναμικό αφού παράγονται συνεχώς νέοι φαινότυποι. Οι οργανισμοί που χρησιμοποιούν την παραλλαγή φάσης με σκοπό την προσαρμογή τους στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, ίσως υποβάλλονται σε περισσότερες κλωνικές μεταβάσεις. Συγκεκριμένα, ο μικροοργανισμός *E. coli* για να αποφύγει αυτή την κλωνική αντικατάσταση, έχει αναπτύξει μηχανισμούς αντιστροφής που μεσολαβούν στη ρύθμιση των γονιδίων. Παράλληλα διατηρούν ασταθείς επαναλαμβανόμενες ακολουθίες στα γονιδιώματά τους. Όσον αφορά τις υποθανάτιες καταπονήσεις (sublethal stresses), μέσω της έκθεσης του μικροοργανισμού σε αυτές, ενδέχεται να επιτραπεί η επιβίωση τους καθώς επίσης και να προκαλέσουν στο μέλλον την αντοχή του στην ίδια καταπόνηση καθώς και σε μεταγενέστερες καταπονήσεις (Abee and Wouters, 1999).

1.11 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝ ΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΕ ΧΑΜΗΛΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ

Κατά την μείωση της θερμοκρασίας, ο μικροοργανισμός χρησιμοποιεί μηχανισμούς με σκοπό την προσαρμογή του στο εκάστοτε περιβάλλον. Η απόκριση στις χαμηλές θερμοκρασίες (cold shock response) επιτρέπει στο κύτταρο να αντιμετωπίσει αυτές τις δυσμενείς αλλαγές, ως επί το πλείστον από την επιλεκτική παραγωγή ενός συνόλου πρωτεϊνών, όπως των πρωτεϊνών που επάγονται από τις χαμηλές θερμοκρασίες (cold induced proteins). Στο διάγραμμα που ακολουθεί, παρατηρείται η απόκριση στις χαμηλές θερμοκρασίες (Διάγραμμα 1.11.1). Η απόκριση ενεργοποιείται από μια απότομη μετατόπιση της καλλιέργειας αυξανόμενη εκθετικά από τη βέλτιστη θερμοκρασία σε μια χαμηλότερη θερμοκρασία, συνήθως από τους 37 °C στους 15 °C. Με τη μείωση της θερμοκρασίας υπάρχει μία παροδική διακοπή της ανάπτυξης των κυττάρων από 3 έως 6 ώρες. Αυτή η περίοδος ονομάζεται φάση εγκλιματισμού. Κατά τη φάση εγκλιματισμού, σταματά η παραγωγή των περισσότερων πρωτεϊνών, εκτός

από τις πρωτεΐνες που επάγονται από τις χαμηλές θερμοκρασίες οι οποίες εξακολουθούν να μεταφράζονται (Polissi *et al.*, 2003). Μετά τη φάση του εγκλιματισμού, τα κύτταρα προσαρμόζονται στη χαμηλή θερμοκρασία και αναπτύσσονται αλλά με βραδύτερο ρυθμό (Phadtare, 2004).



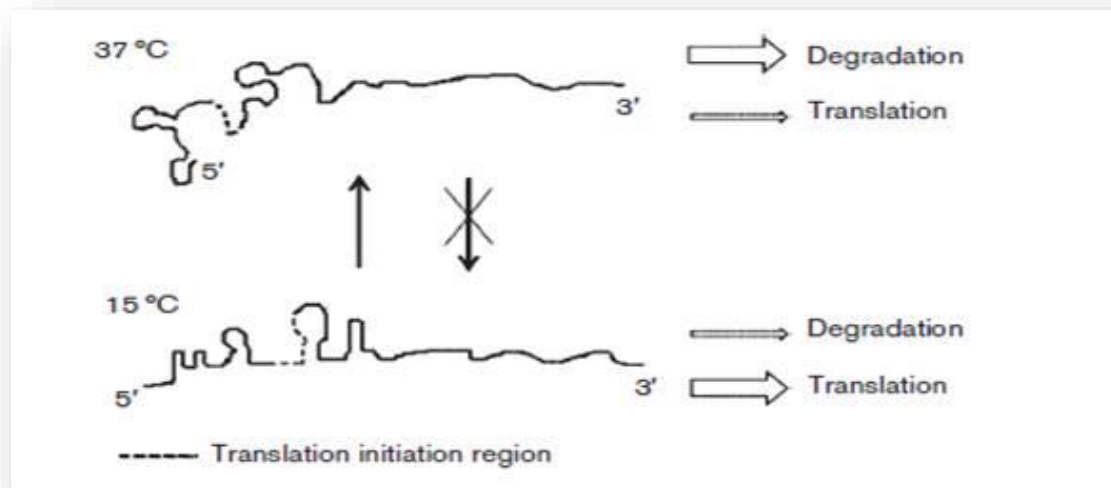
Διάγραμμα 1.11.1 Απόκριση σε χαμηλές θερμοκρασίες

1.12 ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΧΑΜΗΛΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ

Όταν τα κύτταρα προσαρμόζονται σε χαμηλές θερμοκρασίες, περιορίζεται η έκφραση των μερικών πρωτεϊνών τους και ενεργοποιείται η έκφραση άλλων πρωτεϊνών που ονομάζονται cold - induced proteins. Η εμφάνισή τους δεν στηρίζεται σε ειδικούς παράγοντες μεταγραφής, αλλά σε αλλαγές της σταθερότητας του mRNA και του μηχανισμού της μετάφρασης. Το CspA cold induction, όπως φαίνεται στην εικόνα

1.12.1 επάγεται από τις χαμηλές θερμοκρασίες. Σε συνθήκες ψύχους, το CspA αντιπροσωπεύει σχεδόν το 13% του συνόλου των πρωτεϊνών του κυττάρου, ενώ στους 37 °C μειώνεται σε αρκετά χαμηλά επίπεδα (Goldstein *et al.*, 1990). Με τη μείωση της θερμοκρασίας, η δομή του 5'UTR του CspA mRNA αλλάζει. Η αναδιάταξη του CspA 5'UTR σε χαμηλές θερμοκρασίες σταθεροποιεί το mRNA και διασφαλίζει την πιο σταθερή μετάφραση του (Giuliodori *et al.*, 2010).

Εικόνα 1.12.1 Το CspA mRNA ως ένα θερμοστοιχείο.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2



2. ΥΠΟΘΕΣΗ & ΣΤΟΧΟΣ

Σε πειραματικό επίπεδο, επειδή το κρέας είναι ένα πολύπλοκο τροφικό σύστημα, καθώς αποτελείται από πρωτεΐνες, ανόργανα στοιχεία, βιταμίνες και λίπος, δεν είναι εύκολα εφικτό να προσδιορίσουμε ποιος από τους παραπάνω παράγοντες επηρεάζει την θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου *E. coli* O157:H7. Για το λόγο αυτό δημιουργούμε ένα μοντέλο του συγκεκριμένου τροφίμου (model food), αποσύροντας τους λιγότερο σημαντικούς παράγοντες. Στόχος είναι ο προσδιορισμός του παράγοντα που επηρεάζει περισσότερο στην θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου *E. coli*, παρόλο που το model food δεν αντιπροσωπεύει την πραγματικότητα λόγω δομής.

Η παρούσα έρευνα μελετά την επίδραση του πάχους, της διάρκειας και του ρυθμού κατάψυξης, καθώς επίσης και την επίδραση της γλυκερόλης στην θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου *E.coli*, ύστερα από την θερμική επεξεργασία του μοντέλου τροφίμου σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΠΡΟΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

3.1.1 Προσδιορισμός ποσοστού carrageenan

Για την παρασκευή του διαλύματος meat extract προστέθηκαν τρία διαφορετικά ποσοστά του πολυσακχαρίτη carrageenan (1,5%, 2% και 2,5%), με σκοπό να σημειωθεί ποιο από αυτά τα ποσοστά θα δημιουργεί ένα σταθερό προϊόν που θα διατηρεί το τελικό κυλινδρικό σχήμα του, αλλά παράλληλα δε θα πήζει σε θερμοκρασία μικρότερη των 40 με 48 °C. Να σημειωθεί ότι το σημείο πήξης είναι σημαντικό, διότι ο εμβολιασμός των διαλυμάτων του meat extract πρέπει να γίνει σε θερμοκρασία μεταξύ 42 με 48 °C. Οπότε σύμφωνα με τα παραπάνω επιλέχθηκε ως πηκτικός παράγοντας, το 1,5% carrageenan (Lebert *et al.*, 1998)

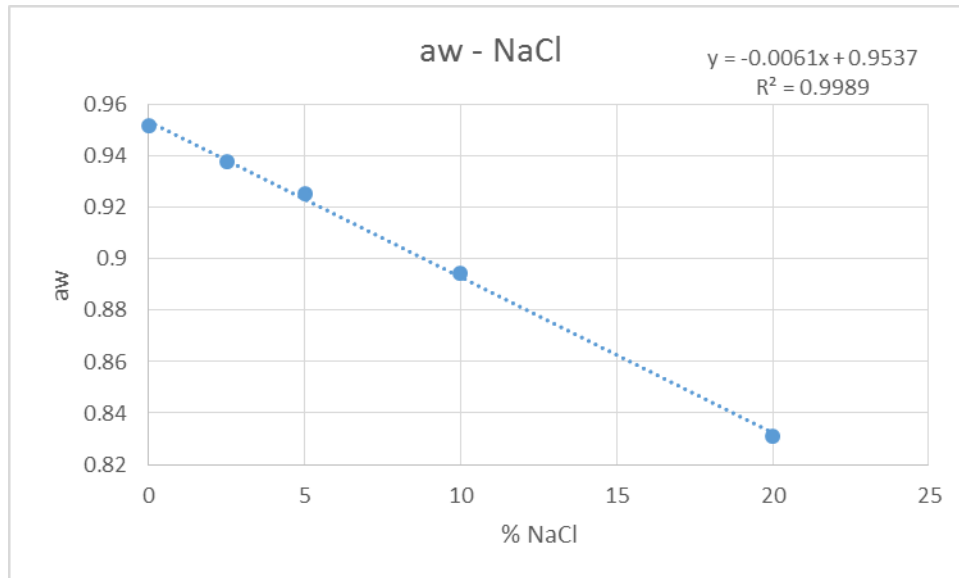
3.1.2 Προσθήκη NaCl και γλυκερόλης

Αρχικά, ένας από τους παράγοντες μελέτης ήταν το αλάτι. Παρασκευάστηκαν διαλύματα meat extract με NaCl. Όμως επειδή η παρουσία του NaCl στο meat broth, παρεμπόδιζε τη δημιουργία συμπλόκου με την carrageenan, το τελικό προϊόν δεν έπηξε και η προσθήκη αλατιού απορρίφθηκε (Nono *et al.*, 2011). Επομένως το NaCl αντικαταστάθηκε με την προσθήκη γλυκερόλης, η οποία εν μέρει, έχει την ίδια επίδραση με το αλάτι, καθώς ελαττώνει την ενεργότητα νερού (a_w).

3.1.3 Προσδιορισμός ενεργότητας νερού της γλυκερόλης και συσχετισμός με το NaCl

Παρασκευάστηκαν δείγματα meat broth με γλυκερόλη και meat broth με αλάτι. Στα δείγματα αυτά μετρήθηκαν οι ενεργότητες νερού (a_w) και συσχετίστηκαν μεταξύ τους. Σύμφωνα με το παρακάτω διάγραμμα (διάγραμμα 3.1.3.1), στο οποίο απεικονίζεται η a_w σε σχέση με το ποσοστό του NaCl, προσδιορίζεται εύκολα το ποσοστό της γλυκερόλης.

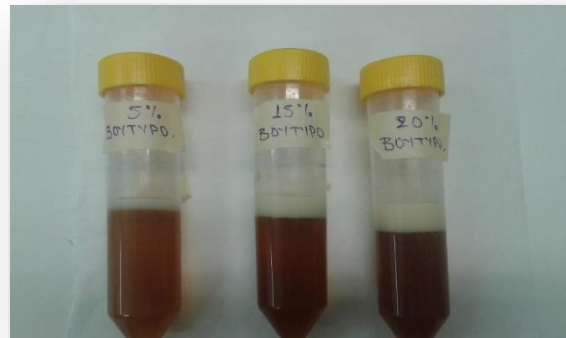
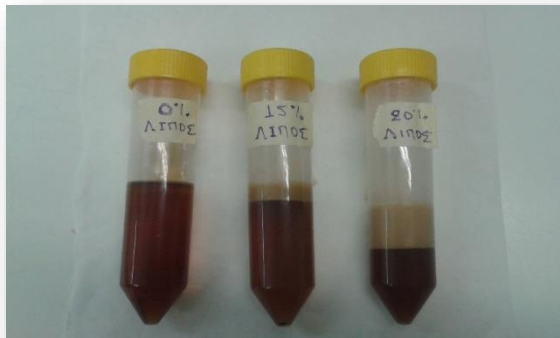
- Η προσθήκη 10% γλυκερόλης, αντιστοιχεί στο 2,5% αλατιού
- Η προσθήκη 20% γλυκερόλης αντιστοιχεί στο 3,8% αλατιού



Διάγραμμα 3.1.3.1 Καμπύλη ενεργότητας νερού και NaCl

3.1.4 Προσθήκη ζωικού λίπους, βουτύρου και Tween80

Παρασκευάστηκαν δείγματα meat broth με ζωικό λίπος, με βούτυρο και με Tween 80, με στόχο να μελετηθεί ο παράγοντας του λίπους και η επίδρασή του στην συντήρηση και τη θερμική επεξεργασία. Ωστόσο, όλα αυτά τα δείγματα είχαν υψηλό σημείο πήξης, με αποτέλεσμα το υλικό να πήζει σε υψηλές θερμοκρασίες μεταξύ 50 έως 64 °C (εικόνα 3.5.4.1). Επομένως, ο παράγοντας λίπος απορρίφθηκε, διότι ο εμβολιασμός των διαλυμάτων του meat extract πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασία μεταξύ 42 με 48 °C, για να μην υπάρξει τραυματισμός ή θανάτωση του παθογόνου.



Εικόνα 3.1.4.1 Δείγματα meat broth 0%, 10% και 20% γλυκερόλης με ζωικό λίπος και βούτυρο.

3.1.5 Προσδιορισμός χρόνου θερμικής επεξεργασίας

Για να προσδιοριστεί ο χρόνος που χρειάζεται κάθε δείγμα μέχρι να επιτευχθεί η θερμοκρασία στόχος στο κέντρο του (65, 60 και 55 °C), χρησιμοποιήθηκε το καταγραφικό θερμοκρασίας Pico-PP222 (Εικόνα 3.1.5.2), το οποίο ήταν συνδεδεμένο με υπολογιστή. Τοποθετήθηκαν θερμοζεύγη στο κέντρο των συσκευασμένων υπό κενό δειγμάτων. Για να μην εισχωρήσει αέρας στα σακουλάκια, στο σημείο που εισχώρησε το θερμοζεύγος κλείστηκε ερμητικά με σιλικόνη, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.5.5.1. Στην συνέχεια, υπολογίστηκε ο μέσος όρος όλων των επαναλήψεων (n=4) και προσδιορίστηκαν οι χρόνοι της θερμικής επεξεργασίας. Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.5.5.1, οι χρόνοι της θερμικής επεξεργασίας διαφέρουν ανάλογα με το μέγεθος των δειγμάτων, την προσθήκη γλυκερόλης, καθώς επίσης και τη θερμοκρασία συντήρησής τους (θερμοκρασία δωματίου στους 22 °C και συντήρησης στους -16 και -28 °C). Κατά την πειραματική διαδικασία, επειδή δεν ήταν εφικτή η χρήση ηλεκτροδίων σε όλα τα δείγματα, τηρήθηκαν οι παρακάτω χρόνοι. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, γινόταν η χρήση ηλεκτροδίων σε ένα δείγμα, ώστε να επιβεβαιωθούν οι χρόνοι και να καταγραφεί η θερμοκρασία στο κέντρο των δειγμάτων.

Πίνακας 3.1.5.1 Χρόνοι της θερμικής επεξεργασίας

Size	Storage	Glycerol	Duration		
			65oC	60oC	55oC
1.5	RT	0%	2 min + 56 sec	2 min + 49 sec	2 min + 39 sec
1.5	-16	0%	4 min + 46 sec	4 min + 29 sec	4 min + 14 sec
1.5	-28	0%	4 min + 52 sec	4 min + 39 sec	4 min + 30 sec
1.5	RT	10%	3 min + 19 sec	3 min + 8 sec	3 min + 4 sec
1.5	-16	10%	6 min + 8 sec	5 min + 47 sec	5 min + 39 sec
1.5	-28	10%	6 min + 18 sec	6 min	5 min + 6 sec
1.5	RT	20%	4 min + 14 sec	3 min + 48 sec	3 min + 12 sec
1.5	-16	20%	5 min + 39 sec	4 min + 53 sec	4 min + 25 sec
1.5	-28	20%	6 min + 36 sec	6 min + 4 sec	5 min + 10 sec
3	RT	0%	4 min + 46 sec	4 min + 39 sec	4 min + 25 sec
3	-16	0%	9 min + 3 sec	8 min + 46 sec	8 min + 46 sec
3	-28	0%	12 min + 19 sec	11 min + 21 sec	11 min + 13 sec
3	RT	10%	5 min + 52 sec	5 min + 42 sec	5 min + 22 sec
3	-16	10%	12 min + 41 sec	12 min + 24 sec	12 min + 27 sec
3	-28	10%	14 min + 34 sec	13 min + 28 sec	12 min + 2 sec
3	RT	20%	7 min + 30 sec	7 min + 22 sec	6 min + 44 sec
3	-16	20%	13 min + 1 sec	12 min + 41 sec	10 min + 48 sec
3	-28	20%	15 min + 10 sec	14 min + 14 sec	13 min + 6 sec



Εικόνα 3.1.5.1 Συσκευασία δείγματος με την τοποθέτηση θερμοζεύγους



Εικόνα 3.1.5.2 Καταγραφικό θερμοκρασίας Pico-PP222 και θερμοζεύγη.

3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Σύμφωνα με τα παραπάνω προπειράματα, η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε και οι μικροβιακοί χειρισμοί που διενεργήθηκαν, σε κάθε περίπτωση υπό ασηπτικές συνθήκες, παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα ροής (Εικόνα 3.2.1). Ακολουθεί αναλυτικά η περιγραφή των σταδίων αυτών.

Το πείραμα αποτελείται από:

- Ένα επίπεδο εμβολιασμού (7.0 log CFU/g)
- 3 μέρες δειγματοληψίας: 0^η, 1^η, 20^η
- Δύο θερμοκρασίες κατάψυξης (-16 και -28°C)
- Τρία ποσοστά γλυκερόλης (0%, 10% και 20%)
- Δύο πάχη (1.5cm, 3cm)
- Τρεις θερμοκρασίες ψησίματος (65, 60 και 55°C)

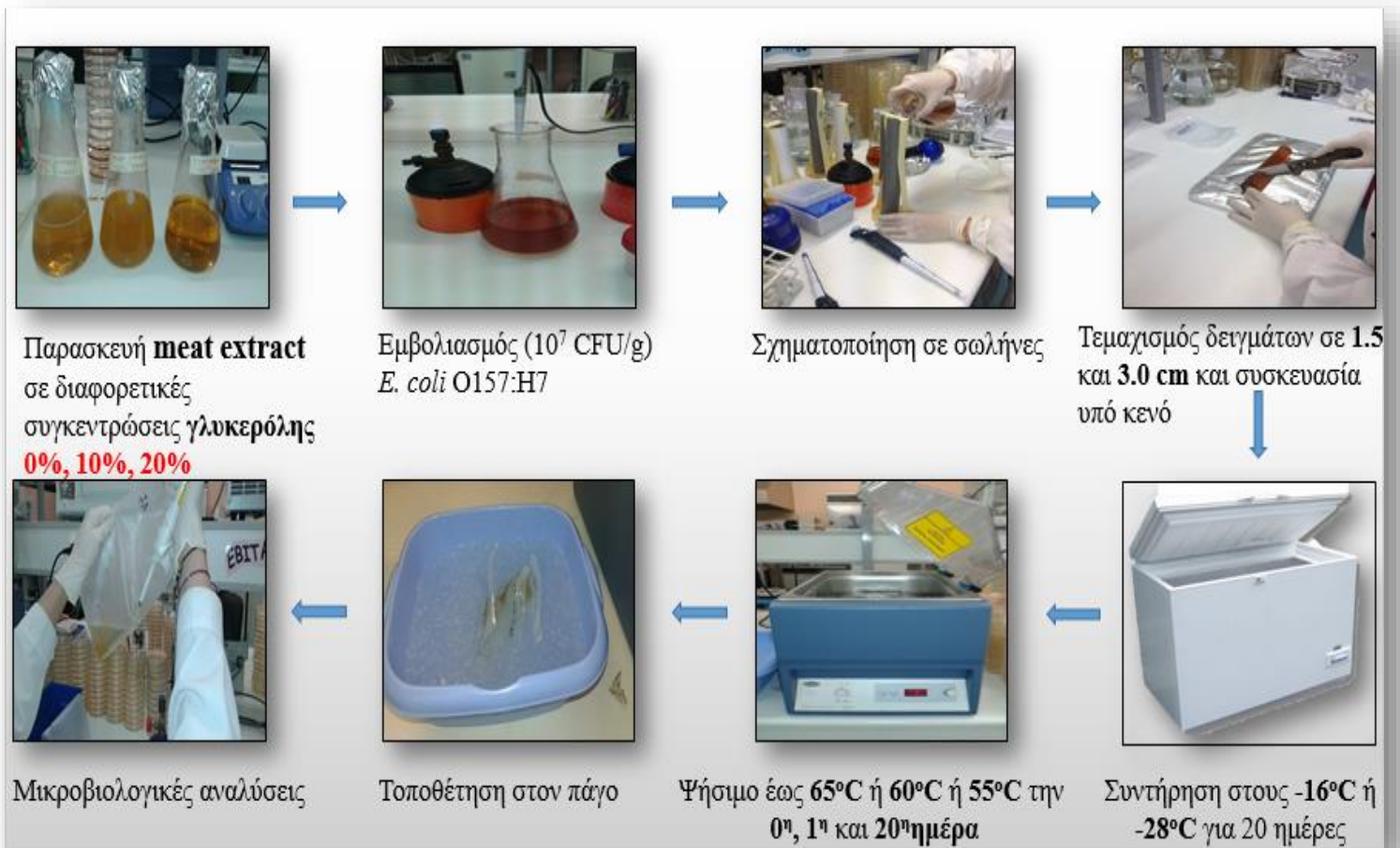
Παρασκευάστηκαν δείγματα meat extract των 1,5 και 3,0 cm με:

- 0% γλυκερόλη
- 10% γλυκερόλη
- 20% γλυκερόλη

Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους -16 και -28 °C για 20 ημέρες. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κατά τη 0^η μέρα, την 1^η ημέρα και την 20^η με σκοπό τον προσδιορισμό της επιβίωσης του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 στην κατάψυξη.

Η θερμική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε στους 65, 60 και 55 °C.

Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο δεκαδικός λογάριθμος του πληθυσμού των κυττάρων του παθογόνου που επιβίωσε κατά τη θερμική επεξεργασία στους 65, 60 και 55 °C. Για την σύγκριση των παραπάνω παραγόντων, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση μέσω του προγράμματος JUMP, με τη χρήση του τεστ Tukey HSD, σε επίπεδο βαθμού σημαντικότητας $p=0,05$.



Εικόνα 3.2.1 : Διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας

3.3 Ο ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ *Escherichia coli* O157:H7

Ο παθογόνος μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μελέτης, είναι ο μικροοργανισμός *Escherichia coli* O157:H7. Για την προετοιμασία του εμβολίου χρησιμοποιήθηκε μίγμα τριών διαφορετικών στελεχών όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3.1). Οι καθαρές καλλιέργειες συντηρούνταν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptic Soy Broth (TSB, Biolife - 4021552) + 20% γλυκερόλης στους -22°C, στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πίνακας 3.3.1 Στελέχη μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία του εμβολίου

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 <u>NCTC 12079</u>	B15	Κόπρανα ανθρώπου
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 <u>NCTC 13125</u>	B16	Άγνωστη
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 <u>NCTC 13127</u>	B18	Άγνωστη

3.3.1 Προετοιμασία και αναζωογόνηση του εμβολίου

Πριν τον ενοφθαλμισμό του μικροοργανισμού, προηγείται το στάδιο της ανανέωσης των τριών στελεχών, υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar flow).

Πραγματοποιούνται δύο ανανεώσεις, προκειμένου τα κύτταρα του μικροοργανισμού να αναζωογονηθούν και να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους. Η πρώτη ανανέωση του μικροοργανισμού διαρκεί 24 ώρες και η δεύτερη 18 ώρες.

Για την πρώτη ανανέωση των κυττάρων, παραλήφθηκε μία αποικία από το κάθε στέλεχος, οι οποίες αιωρήθηκαν σε τρία διαφορετικά αποστειρωμένα σωληνάκια με 10mL μη-επιλεκτικού υγρού, θρεπτικού υποστρώματος TSB (Tryptone Soy Broth). Τα διαλύματα αναδεύτηκαν για μερικά δευτερόλεπτα σε αναδευτήρα Vortex και επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια ακολούθησε η δεύτερη ανανέωση κατά την οποία 0,1mL από το παραπάνω διάλυμα αιωρήθηκε παρομοίως σε αποστειρωμένα σωληνάκια με 10mL TSB. Η επώαση έγινε στους 37°C για 18 ώρες. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η αναζωογόνηση και η ενεργοποίηση των κυττάρων του μικροοργανισμού.

3.3.2 Καθαρισμός εμβολίου

Μετά το πέρας των 18 ωρών, το εμβόλιο αποσύρεται από τον κλίβανο των 37 °C και υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar flow), γίνεται ο καθαρισμός του. Οι τρεις διαφορετικοί δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται σε αναδευτήρα Vortex και το περιεχόμενό τους τοποθετείται σε πλαστικούς περιέκτες φυγοκέντρησης (falcon). Ακολουθεί φυγοκέντρηση (φυγόκεντρος - Heraeus Instruments) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C στις 3600 rpm. Έπειτα, το υπερκείμενο κάθε στελέχους απορρίφθηκε και η βιομάζα (ίζημα) επαναιωρήθηκε σε αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα Ringer 10ml. Το στάδιο του καθαρισμού (έκπλυσης) επαναλήφθηκε δύο φορές. Τέλος, αφού έγινε παραλαβή της ποσότητας εμβολίου από κάθε στέλεχος (NCTC 12079, NCTC 13125, NCTC 13127), τα στελέχη αναμίχθηκαν σε αποστειρωμένη γυάλινη φιάλη Duran των 50 mL.

3.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Την μηδενική ημέρα παρασκευάστηκαν τα διαλύματα του meat extract με 0, 10 και 20% γλυκερόλη. Χρησιμοποιήθηκαν 12 κωνικές φιάλες των 500 mL για την παρασκευή 425 mL διαλύματος στην κάθε μία. Στην κάθε κωνική φιάλη, ζυγίστηκαν :

- 4,25 g meat extract (10g/L)
- 4,24 g proteose peptone (10g/L)
- 2,125 g tryptone (5g/L)
- 2,125 g glycose (5g/L)
- 6,375 g carrageenan (1,5%) (Lebert *et al.*, 1998)

Στις τέσσερις πρώτες κωνικές φιάλες προστέθηκαν στην κάθε μία 85 mL γλυκερόλης και 340 mL νερού, με στόχο τον τελικό όγκο των 425 mL. Αυτές οι φιάλες αποτελούσαν το meat extract με 20% γλυκερόλη. Στις επόμενες τέσσερις φιάλες, οι οποίες αποτελούσαν το meat extract με 10% γλυκερόλη, προστέθηκε 42,5 mL γλυκερόλη και 382,5 mL νερό σε τελικό όγκο 425 mL. Τέλος, στις υπόλοιπες προστέθηκαν μόνο 425 mL νερό, για την απόκτηση των διαλυμάτων meat extract με 0% γλυκερόλη.

Αφού αναδεύτηκαν όλα τα υλικά σε χαμηλή θερμοκρασία πάνω σε θερμαντική εστία, στο τέλος προστέθηκαν 6,375 g carrageenan στην κάθε φιάλη. Η carrageenan εισάγεται στο τέλος για να επιτευχθεί καλύτερη ομογενοποίηση του διαλύματος, αποφεύγοντας τους σβόλους και την πήξη του υλικού.

Στη συνέχεια, τα διαλύματα τοποθετούνται στην αποστείρωση για περίπου 45 min. Η διαδικασία αυτή γίνεται για να καταστραφεί κάθε μορφή μικροβιακής ζωής, συμπεριλαμβανομένων και των ανθεκτικών μορφών, ώστε τα δείγματα να είναι στείρα.

3.4.1 Εμβολιασμός δειγμάτων

Μετά τις ανανεώσεις, η συγκέντρωση των μικροβιακών κυττάρων του εμβολίου ήταν περίπου 10^9 . Για την απόκτηση τελικής συγκέντρωσης μικροβιακού φορτίου 10^7 , η κάθε κωνική φιάλη των 425 mL διαλύματος εμβολιάστηκε με 4,25 mL εμβολίου. Σημειώνεται ότι οι κωνικές φιάλες αμέσως μετά την αποστείρωση παρέμειναν σε

υδατόλουτρο, το οποίο ήταν ρυθμισμένο στους 53 °C, με σκοπό η θερμοκρασία των διαλυμάτων να κυμαίνεται μεταξύ των 42 με 48 °C. Αυτό είναι σημαντικό, διότι δεν θα μπορούσαν να εμβολιαστούν τα δείγματα σε υψηλότερες θερμοκρασίες, καθώς θα υπήρχε τραυματισμός ή και θανάτωση του παθογόνου.

3.4.2 Σχηματοποίηση, τεμαγισμός και συσκευασία δειγμάτων

Αφού εμβολιάζεται το διάλυμα της κάθε κωνικής φιάλης, αμέσως περιχύνεται μέσα σε σωλήνα (διαμέτρου D=4cm, Φ40), για να επιτευχθεί η σχηματοποίηση των δειγμάτων. Ο κάθε σωλήνας είναι σταθεροποιημένος πάνω σε ένα τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα, ώστε να στερεοποιηθεί το διάλυμα του meat extract. Στη συνέχεια, οι σωλήνες τοποθετήθηκαν στους 4 °C για 15 min με σκοπό την καλύτερη προσκόλληση των κυττάρων. Μετά το πέρας του χρόνου, αφαιρούνται οι σωλήνες. Το κυλινδρικού σχήματος meat extract τεμαχίζεται με μαχαίρι, πάνω σε ένα πάγκο κοπής, για την απόκτηση δειγμάτων 1,5 και 3,0 cm. Τέλος, όλα τα δείγματα κλείνονται υπό κενό σε σακουλάκια και συντηρούνται για 20 ημέρες στους -16 και -28°C (εικόνα 3.4.2.1)



Εικόνα 3.4.2.1 Δείγμα meat broth σε συσκευασία υπό κενό.

3.4.3 Θερμική επεξεργασία

Η θερμική επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο, την 0^η μέρα, την 1^η και την 20^η στους 65, 60 και 55 °C, με στόχο τον προσδιορισμό της θερμοανθεκτικότητας του μικροοργανισμού, μετά την θερμική καταπόνησή του. Το υδατόλουτρο ήταν ρυθμισμένο στους 70 °C. Τα συσκευασμένα δείγματα τοποθετούνται ανά τριάδες μέσα στο νερό και στερεώνονται ώστε να βρίσκονται κάτω από την επιφάνειά του. Η συσκευασία έχει γίνει υπό κενό, για να επιτευχθεί ομοιόμορφη θερμική επεξεργασία σε όλη την επιφάνεια των δειγμάτων. Μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, το οποίο έχει υπολογιστεί στα προπείράματα (3.5.5), όταν τα δείγματα αποκτήσουν στο κέντρο τους την αντίστοιχη θερμοκρασία στόχο (65, 60, 55 °C), αφαιρούνται από το υδατόλουτρο και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο για 5 min, με σκοπό την άμεση πτώση της θερμοκρασίας τους.



3.4.4 Δειγματοληψία και Ομογενοποίηση του δείγματος

Για τη διαδικασία της δειγματοληψίας, τα δείγματα τοποθετούνται σε σακούλα τύπου stomacher με τη βοήθεια μικρής σπάτουλας και ζυγίζονται στον ζυγό (BEG Engineering & KERN PCB). Ακολουθεί η προσθήκη αποστειρωμένου ισοτονικού διαλύματος Ringer στη σακούλα (βάρους 4 φορές εκείνου του δείγματος), έτσι ώστε να προκύψει αραιώση 1 προς 5. Τέλος, το μίγμα ομογενοποιείται ομογενοποιητή (Stomacher® 400 CIRCULATOR), για συνολικό χρόνο 1 min και 230 rpm. Με την ομογενοποίηση, το μικροβιακό φορτίο του δείγματος διαχέεται στον ορό Ringer, δεδομένου ότι για να πραγματοποιηθεί ο μικροβιολογικός έλεγχος, το δείγμα θα πρέπει να βρίσκεται σε υγρή μορφή. Όλη η διαδικασία της δειγματοληψίας που αναφέρθηκε παραπάνω, πραγματοποιείται δίπλα σε λύχνο για τη διατήρηση ασηπτικών συνθηκών.

3.4.5 Ενοφθαλμισμός θρεπτικών υποστρωμάτων

Το ομογενοποιημένο διάλυμα του δείγματος αραιώνεται με διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, μεταφέροντας 1mL διαλύματος σε 9mL αποστειρωμένου Ringer. Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιήθηκαν οι αραιώσεις 10^{-1} και 10^{-2} .

Ακολουθεί ο ενοφθαλμισμός του βακτηριακού εναιωρήματος (δείγμα) σε στερεό υπόστρωμα (TSA + 0,6% Yeast Extract). Η διαδικασία αυτή έγινε με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique). Αναρροφάται δείγμα όγκου 100 μ L με χρήση tip και στη συνέχεια πραγματοποιείται ομοιόμορφη διασπορά (εξάπλωση) του βακτηριακού αιωρήματος σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου με τη βοήθεια μικροβιολογικού τριγώνου. Τα τρυβλία επωάζονται σε κλίβανο επώασης για 24 ώρες στους 37°C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της έρευνας απεικονίζονται στα παρακάτω γραφήματα και πρόκειται να αναλυθούν ξεχωριστά για την κάθε θερμοκρασία θερμικής επεξεργασίας.

Αρχικά παρατίθενται στην ενότητα 4.1 γραφήματα που περιγράφουν τη μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E.coli* O157:H7 πριν τη θερμική επεξεργασία και στη συνέχεια, στην ενότητα 4.2 παρατίθενται τα γραφήματα της επιβίωσης του μικροοργανισμού *E.coli* O157:H7, μετά τη θερμική επεξεργασία.

Από τα γραφήματα προκύπτει η επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης, καθώς και η επίδραση της θερμοκρασίας της θερμικής επεξεργασίας, σε συνδυασμό με την προσθήκη διαφορετικών ποσοστών γλυκερόλης (0%, 10% και 20%), στην επιβίωση και θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου μικροοργανισμού *E.coli* O157:H7.

4.1 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΠΡΙΝ ΤΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Τα ενοφθαλμισμένα δείγματα meat broth διατηρήθηκαν υπό κατάψυξη για 20 ημέρες, για να διαπιστωθεί αν η διάρκεια συντήρησης σε συνθήκες κατάψυξης επηρεάζει τον πληθυσμό του παθογόνου μικροοργανισμού.

Αναλυτικότερα, στο γράφημα 4.1.1, παρουσιάζονται οι μεταβολές του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7, κατά τη συντήρηση δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης, τη 0^η, την 1^η και την 20^η μέρα συντήρησης στους -16 °C.

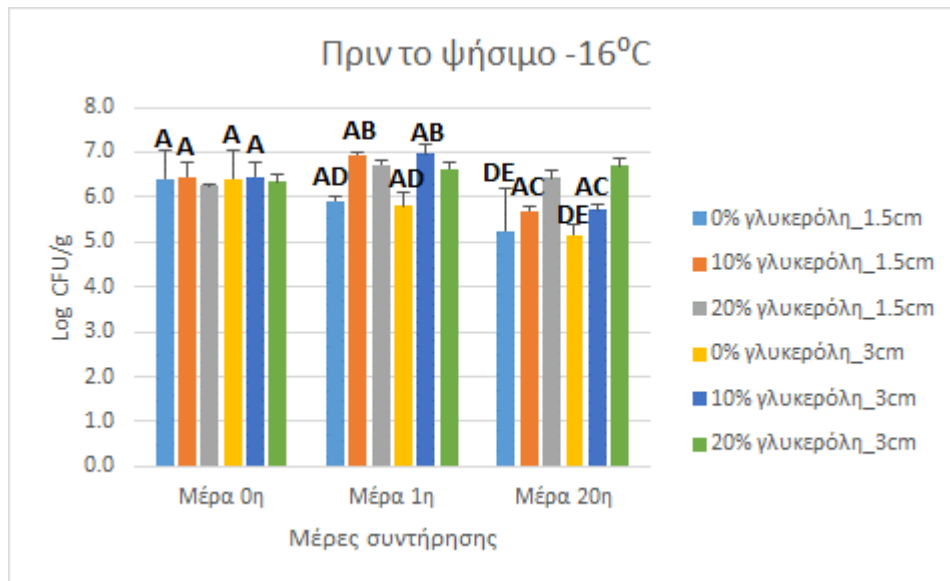
Παρατηρείται ότι τη 0^η μέρα, ο πληθυσμός του παθογόνου στα δείγματα που δεν περιέχουν γλυκερόλη (0%) ανέρχεται 6,60 log CFU / g, την 1^η μέρα ελαττώνεται στα 5,84 log CFU / g και την 20^η μέρα στα 5,70 log CFU / g. Η απουσία γλυκερόλης, ευνοεί

τον τραυματισμό και την καταπόνηση των κυττάρων του παθογόνου κατά τη διάρκεια της κατάψυξης.

Από την άλλη πλευρά, η προσθήκη 20% γλυκερόλης δεν επηρεάζει την επιβίωση του παθογόνου κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Ο πληθυσμός ανέρχεται στα 6,20 με 6,50 log CFU / g. Αυτό συμβαίνει διότι, η γλυκερόλη προστατεύει τα κύτταρα από βλάβες που προκαλούνται από την κατάψυξη, συμβάλλοντας έτσι στην επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού στην κατάψυξη, καθώς έχει κρυοπροστατευτική δράση (Fennema OR et al., 1973; Ray B, Speck ML, 1973). Δεσμεύει το νερό πλησίον της κυτταρικής επιφάνειας, προστατεύοντας αυτήν από την ψύξη και μειώνει τον ενδοκυττάριο πάγο.

Ομοίως τα ίδια αποτελέσματα σημειώνονται και με την προσθήκη 10% γλυκερόλης. Μετά από μια μέρα συντήρησης στους -16 °C, η γλυκερόλη προστατεύει τον παθογόνο, λόγω της κρυοπροστατευτικής της δράσης. . Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός τους ανέρχεται στα 6,50 log CFU / g τη 0^η μέρα και στα 7,00 log CFU / g την 1^η μέρα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρείται ότι με την προσθήκη 10% γλυκερόλης ο πληθυσμός του παθογόνου διαφοροποιείται κατά 0,5 λογαριθμικούς κύκλους, μετά από 24 ώρες συντήρησης, χωρίς όμως να σημειώνεται σημαντική μεταβολή. Μετά από 20 μέρες συντήρησης ο πληθυσμός του παθογόνου μειώνεται σημαντικά στα 5,80 log CFU / g ($p < 0,05$).

Στα δείγματα που έχουν διαφορετικά μεγέθη (1,5 και 3cm), ανεξαρτήτως του ποσοστού της γλυκερόλης, δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p > 0,05$).



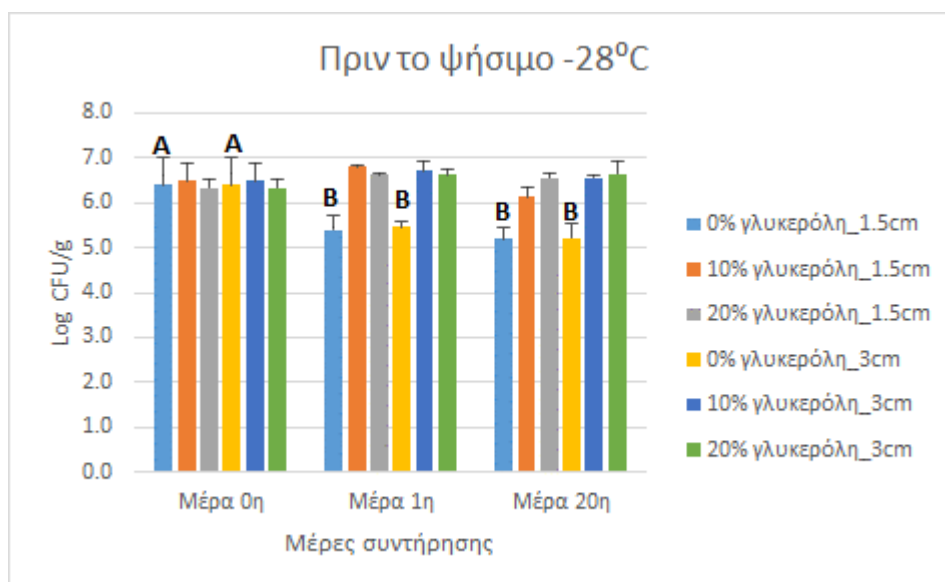
Γράφημα 4.1.1 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (σε γενικό υπόστρωμα TSA) κατά τη συντήρηση δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης, τη 0^η, την 1^η και την 20^η μέρα συντήρησης στους -16 °C. Οι μπάρες που μοιράζονται τουλάχιστον ένα γράμμα, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ($p > 0,05$).

Στο γράφημα 4.1.2 παρουσιάζονται οι μεταβολές του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 κατά τη συντήρηση δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης, τη 0^η, την 1^η και την 20^η μέρα συντήρησης στους -28 °C.

Παρατηρείται ότι η 0^η μέρα, με την πρώτη μέρα συντήρησης στην κατάψυξη, στα δείγματα που δεν περιέχουν γλυκερόλη (0%), ο πληθυσμός του παθογόνου, ελαττώνεται κατά 1,2 λογαριθμικούς κύκλους και μεταβάλεται στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$). Επίσης, η 0^η μέρα με την 20^η μέρα συντήρησης, παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$), καθώς ο πληθυσμός του παθογόνου ελαττώθηκε κατά 1,4 λογαριθμικούς κύκλους. Σημειώνεται ότι η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης των -28°C, ευνοεί τον τραυματισμό των κυττάρων από την πρώτη μέρα συντήρησής τους.

Τα δείγματα που περιέχουν 10% και 20% γλυκερόλη δεν επηρεάζουν την επιβίωση του παθογόνου, καθώς η προσθήκη της γλυκερόλης δρα κρυοπροστατευτικά.

Από την άλλη πλευρά, στα δείγματα που έχουν διαφορετικά μεγέθη (1,5 και 3cm), ανεξαρτήτως του ποσοστού της γλυκερόλης, δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p=0,67$).



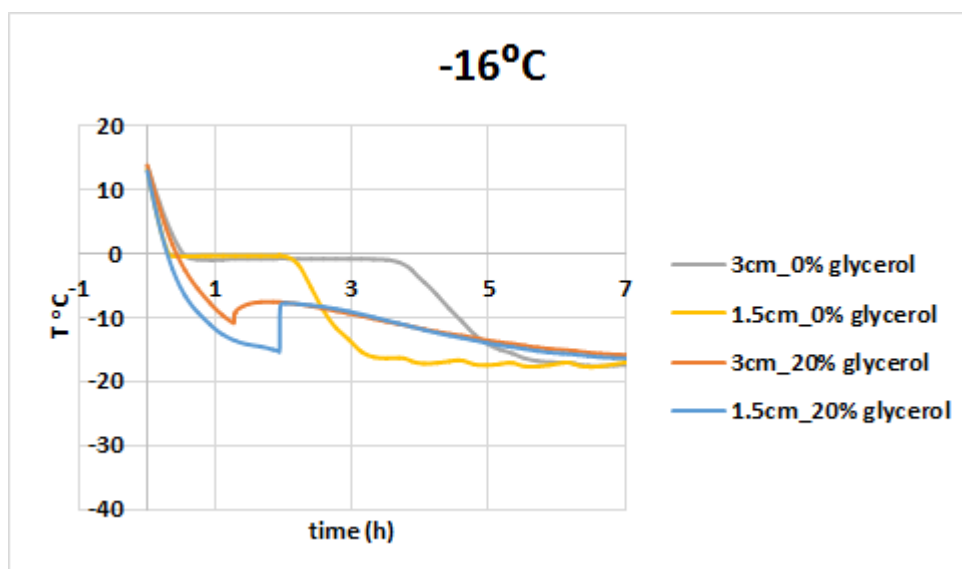
Γράφημα 4.1.2 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (σε γενικό υπόστρωμα TSA) κατά τη συντήρηση δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης, τη 0^η, την 1^η και την 20^η μέρα συντήρησης στους -28 °C. Οι μπάρες που μοιράζονται τουλάχιστον ένα γράμμα, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ($p>0,05$).

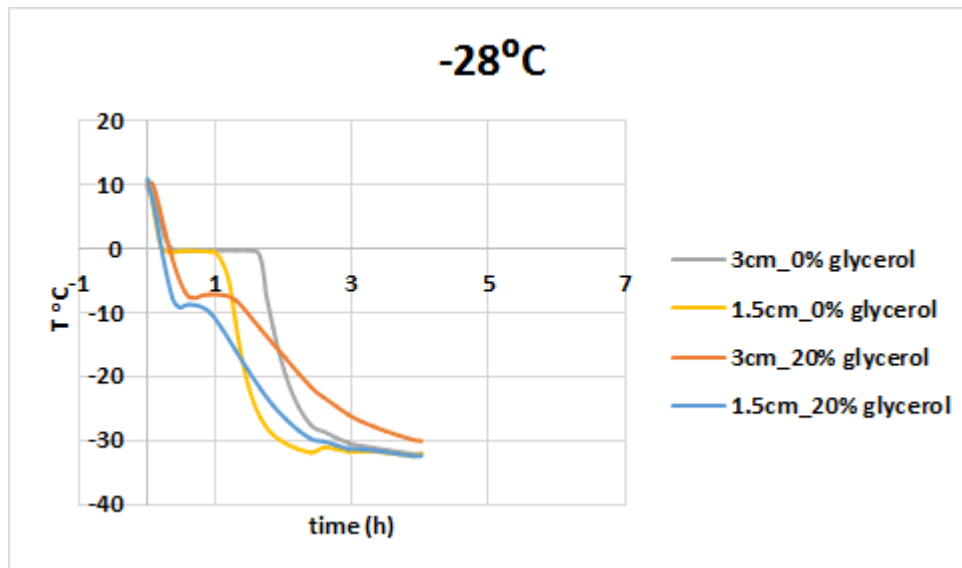
Συγκρίνοντας τα γραφήματα 4.1.1 και 4.1.2, παρατηρείται ότι την πρώτη μέρα των δύο συντηρήσεων, ο πληθυσμός του παθογόνου των δειγμάτων που δεν περιέχουν γλυκερόλη καταπονείται και τραυματίζεται ισχυρά. Αντιθέτως, στα δείγματα που περιέχουν 10% και 20% γλυκερόλη ο πληθυσμός παρουσιάζει επιβίωση, καθώς δρα η κρυοπροστατευτική δράση της γλυκερόλης, προστατεύοντας τα κύτταρα από την ψύξη. Συγκρίνοντας την 20^η μέρα των δύο συντηρήσεων, ομοίως σημειώνεται τραυματισμός του πληθυσμού στα δείγματα που δεν περιέχουν γλυκερόλη (0%) και επιβίωση στα δείγματα που περιέχουν 20% γλυκερόλη. Από την άλλη πλευρά, τα δείγματα που περιέχουν 10% γλυκερόλη, μετά από 20 μέρες συντήρησης, παρουσιάζουν τάση για μεγαλύτερο τραυματισμό στους -16 απ' ό τι στους -28 °C. Ο πληθυσμός αυτών των δειγμάτων στους -16 °C συντήρηση, ανέρχεται τα 5,80 log CFU

/ g και στους $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ τα $6,50\text{ log CFU / g}$. Έχει βρεθεί ότι η διαφορά τους είναι σημαντική ($p < 0,05$). Επομένως, η διαφορετική θερμοκρασία συντήρησης και συγκεκριμένα ο διαφορετικός ρυθμός των δύο καταψύξεων, επηρεάζει στην επιβίωση του παθογόνου.

Στο διάγραμμα 4.1.1 απεικονίζεται ο ρυθμός με τον οποίο καταψύχονται τα δείγματα των 1,5 και 3 cm, με την προσθήκη 0 και 20% γλυκερόλης. Στους $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$, παρατηρείται ταχεία κατάψυξη των δειγμάτων σε σχέση με τους $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$, καθώς η θερμοκρασία πέφτει στους $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ σχεδόν μία ώρα πιο γρήγορα.

Γενικά η ταχεία κατάψυξη ($-28\text{ }^{\circ}\text{C}$) μειώνει την πιθανότητα τραυματισμού των μικροοργανισμών. Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί επειδή με την ταχεία κατάψυξη η πτώση της αναλογίας μερικής πίεσης των ατμών νερού και πάγου είναι ταχύτερη και η έκθεση του μικροοργανισμού σε αυξημένες συγκεντρώσεις βλαπτικών ουσιών είναι μικρότερη. Επίσης, η ταχύτερη ψύξη οδηγεί σε σχηματισμό μικρότερων κρυστάλλων, σε σχέση με τη βραδεία που οδηγεί στο σχηματισμό μεγαλύτερων κρυστάλλων, με αποτέλεσμα τον τραυματισμό περισσότερων κυττάρων. Επομένως, η αργή κατάψυξη ($-16\text{ }^{\circ}\text{C}$) επιφέρει μεγαλύτερο τραυματισμό στον πληθυσμό των δειγμάτων που περιέχουν 10% γλυκερόλη.





Διάγραμμα 4.1.1 Ρυθμός κατάψυξης στους -28 και -16 °C

4.2 ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

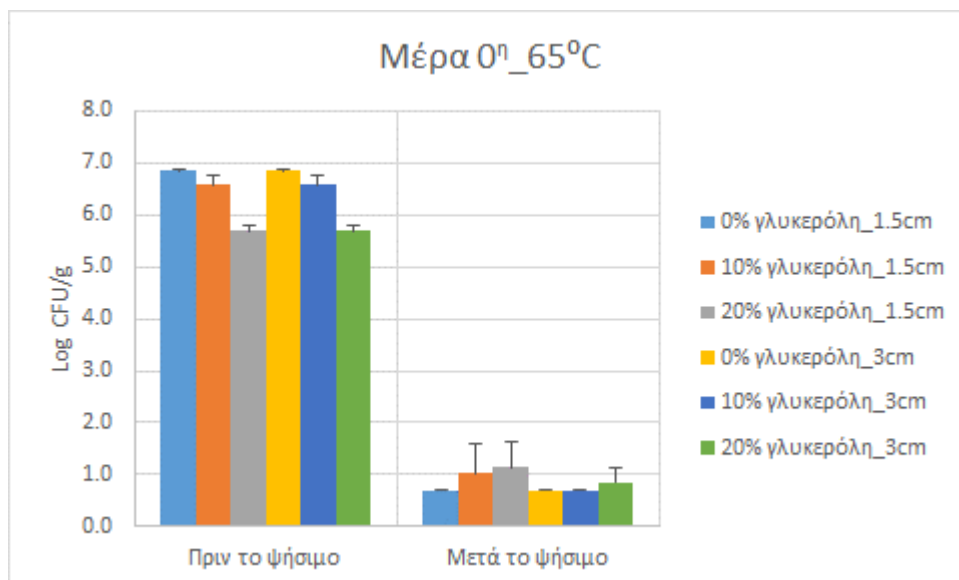
Σκοπός είναι να διερευνηθεί η επίδραση της γλυκερόλης, του μεγέθους, αλλά και της θερμοκρασίας συντήρησης των δειγμάτων, μεμονωμένα ή σε συνδιασμούς, στη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου σε θερμική καταπόνηση στους 65, 60 και 55 °C.

4.2.1 Θερμική επεξεργασία στους 65° C

Στο γράφημα 4.2.2.1 παρουσιάζονται οι μεταβολές του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 στα δείγματα meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης, τη 0^η μέρα συντήρησης πριν και μετά τη θερμική επεξεργασία στους 65 °C. Παρατηρείται, ότι ο πληθυσμός του παθογόνου θανατώνεται στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$), μετά τη θερμική επεξεργασία.

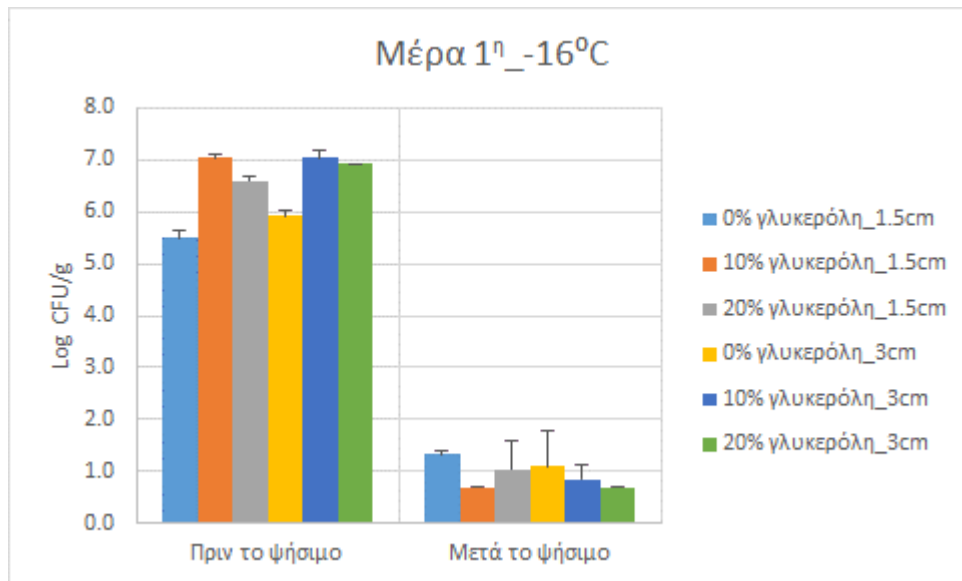
Ο παράγοντας γλυκερόλη δεν επέδρασε στατιστικώς σημαντικά στην μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου ($p > 0,05$). Ομοίως, δεν υπάρχουν στατιστικώς

σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που έχουν διαφορετικά μεγέθη 1,5 και 3cm ($p>0,05$), ανεξάρτητα από το ποσοστό της γλυκερόλης που προστέθηκε.



Γράφημα 4.2.1.1 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (σε γενικό υπόστρωμα TSA) κατά θερμική επεξεργασία των δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης στους 65 °C, τη 0^η μέρα συντήρησης.

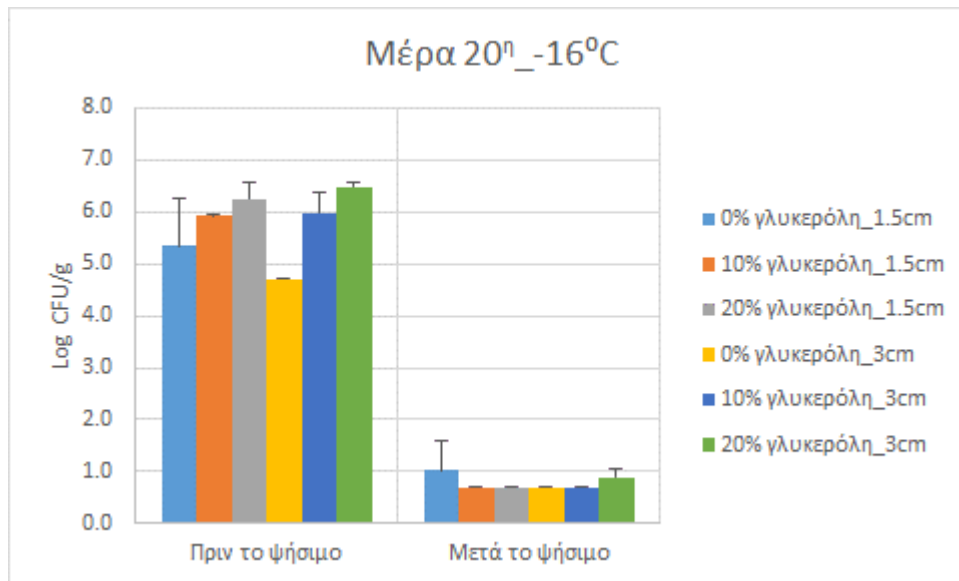
Παρόμοια αποτελέσματα με τη 0^η μέρα, παρατηρούνται την 1^η μέρα συντήρησης στους -16 °C, μετά τη θερμική επεξεργασία (Γράφημα 4.2.1.2). Δεν φάνηκε να υπάρχει διαφορά κατά τη θερμική επεξεργασία. Η θερμοκρασία των 65 °C θεωρείται πολύ ισχυρή και θανατηφόρα για τον παθογόνο.



Γράφημα 4.2.1.2 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (σε γενικό υπόστρωμα TSA) κατά θερμική επεξεργασία των δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης στους 65 °C, την 1^η μέρα συντήρησης στους -16 °C.

Τέλος, την 20^η μέρα κατάψυξης (Γράφημα 4.2.1.3) δεν επηρεάζουν στην επιβίωση του παθογόνου στατιστικώς σημαντικά ούτε η προσθήκη διαφορετικών ποσοστών γλυκερόλης, ούτε τα διαφορετικά μεγέθη ($p > 0,05$).

Συμπερασματικά, η υψηλή θερμική επεξεργασία των 65 °C, πιθανώς να επικαλύπτει τους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την επιβίωση του παθογόνου, με αποτέλεσμα τη θανάτωσή του.



Γράφημα 4.2.1.3 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (σε γενικό υπόστρωμα TSA) κατά θερμική επεξεργασία των δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης στους 65 °C, την 20^η μέρα συντήρησης στους -16 °C.

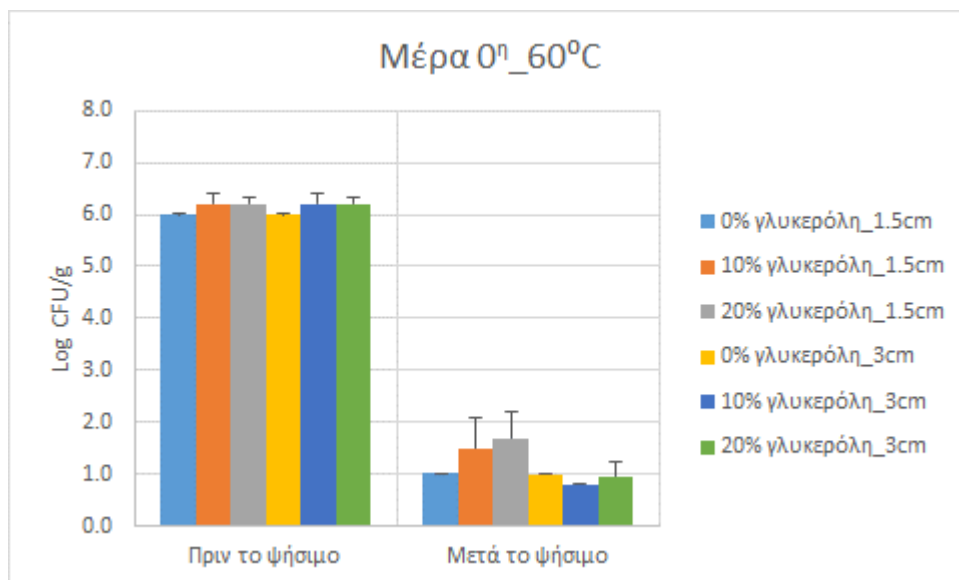
4.2.2 Θερμική επεξεργασία στους 60° C

Στο γράφημα 4.2.2.1 παρουσιάζονται οι μεταβολές του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 στα δείγματα meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης, τη 0^η μέρα συντήρησης πριν και μετά τη θερμική επεξεργασία στους 60 °C. Παρατηρείται, ότι ο πληθυσμός του παθογόνου παρουσιάζει σημαντική ($p < 0,05$) μείωση μετά τη θερμική επεξεργασία.

Ο παράγοντας γλυκερόλη δεν επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($p > 0,05$) στην μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου.

Ομοίως, δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που έχουν διαφορετικά μεγέθη 1,5 και 3cm ($p > 0,05$), ανεξάρτητα από το ποσοστό της γλυκερόλης που προστέθηκε. Επομένως, σε αυτή τη περίπτωση που δεν υπάρχει η επίδραση της κατάψυξης, η υψηλή θερμική επεξεργασία των 60 °C, επικαλύπτει τους

παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την επιβίωση του παθογόνου, με αποτέλεσμα τη θανάτωσή του.



Γράφημα 4.2.2.1 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (σε γενικό υπόστρωμα TSA) κατά θερμική επεξεργασία των δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης στους 60 °C, τη 0^η μέρα συντήρησης.

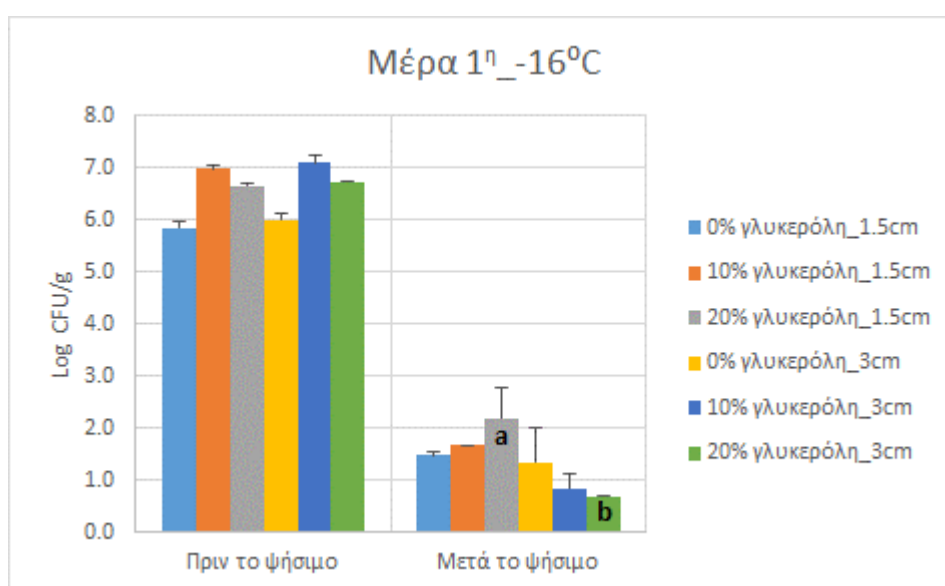
Ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού *E.coli* O157:H7, μετά από μια μέρα συντήρησης παρουσιάζεται στο Γράφημα 4.2.2.2.

Αναλυτικότερα, στα θερμικώς επεξεργασμένα δείγματα δεν υπάρχει στατιστικώς καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων που περιέχουν διαφορετικά ποσοστά γλυκερόλη ($p>0,05$).

Από την άλλη πλευρά, παρατηρείται ότι στα δείγματα των 1,5cm που περιέχουν 20% γλυκερόλη, ο πληθυσμός του παθογόνου ανέρχεται στα 2,18 log CFU / g, ενώ στα δείγματα των 3cm που περιέχουν επίσης το ίδιο ποσοστό γλυκερόλης, ο πληθυσμός του παθογόνου ανέρχεται στα 0,70 log CFU / g και έχει βρεθεί ότι η διαφορά τους είναι σημαντική ($p<0,05$).

Επομένως, σε αυτή την περίπτωση που τα δείγματα συντηρήθηκαν στους -16 °C για μια μέρα, φαίνεται ότι η υψηλή θερμική επεξεργασία επικαλύπτει τον παράγοντα της γλυκερόλης, όμως δεν επικαλύπτει τον παράγοντα του μεγέθους. Τα μικρά δείγματα

που περιέχουν 20% γλυκερόλη, σημειώνουν μεγαλύτερη επιβίωση σε σχέση με τα μεγάλα Η επίδραση αυτή του μεγέθους θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα δείγματα των 3 cm υπέστησαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα θερμική επεξεργασία συγκριτικά με εκείνα των 1,5 cm, με αποτέλεσμα ο παθογόνος να εκτίθεται για μεγαλύτερο διάστημα σε θανατηφόρες θερμοκρασίες, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού.



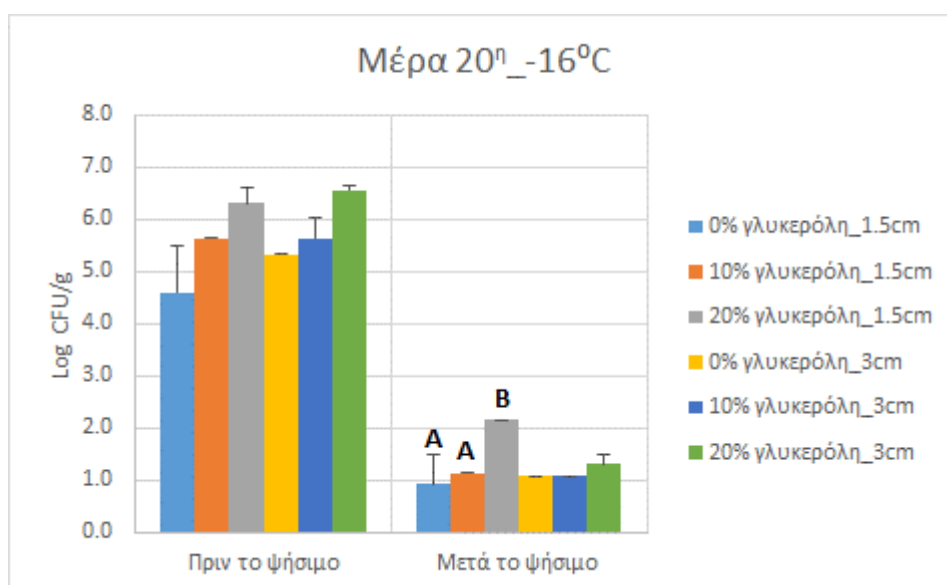
Γράφημα 4.2.2.2 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (σε γενικό υπόστρωμα TSA) κατά θερμική επεξεργασία των δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης στους 60 °C, την 1^η μέρα συντήρησης στους -16 °C. Οι μπάρες που μοιράζονται τουλάχιστον ένα γράμμα, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ($p>0,05$).

Στο γράφημα 4.2.2.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεταβολής του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού κατά τη θερμική επεξεργασία στους 60 °C, μετά από 20 μέρες συντήρησης στους -16 °C.

Συγκρίνοντας την 1^η με την 20^η μέρα, παρατηρείται ότι ο πληθυσμός του παθογόνου δεν επηρεάστηκε από την παρατεταμένη διάρκεια της κατάψυξης, ώστε να οδηγήσει σε μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα. Αντιθέτως, τα κύτταρα του παθογόνου καταπονούνται.

Όμοια με την 1^η μέρα, υπάρχει η ίδια τάση με μικρότερες διαφορές. Το υψηλό ποσοστό της γλυκερόλης επηρέασε την επιβίωση του παθογόνου. Παρατηρείται θερμοανθεκτικότητα στα δείγματα μικρού μεγέθους που περιέχουν 20% γλυκερόλη σε σχέση με αυτά που περιέχουν 10% και 0% γλυκερόλη. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι το υψηλό ποσοστό γλυκερόλης, με την κρυοπροστατευτική της δράση, έδρασε συνεργιστικά με το μικρό μέγεθος, που υπέστη για μικρότερο χρονικό διάστημα θερμική επεξεργασία.

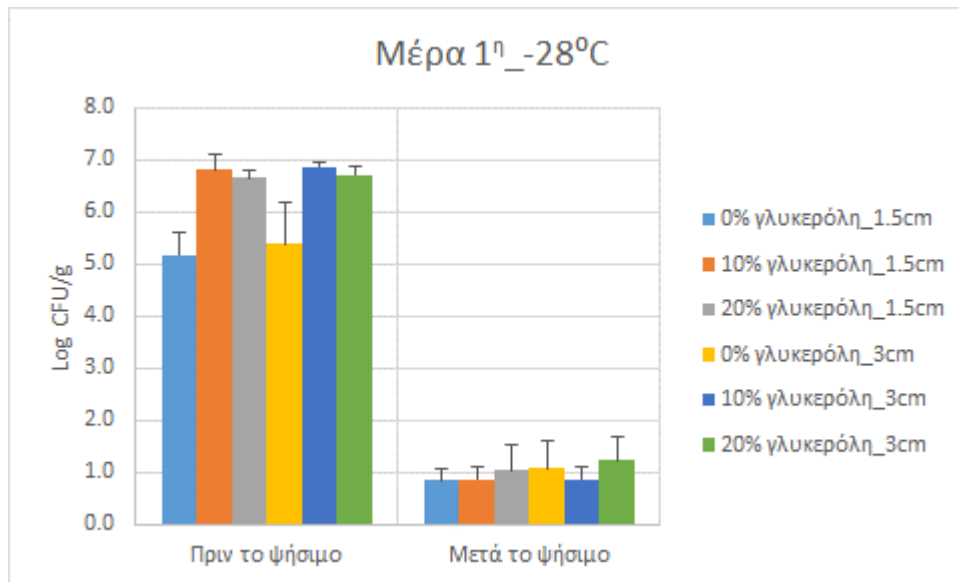
Επίσης, δεν σημειώνονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές του πληθυσμού στα δείγματα που έχουν διαφορετικό πάχος (1,5 και 3 cm) ($p=0,43$).



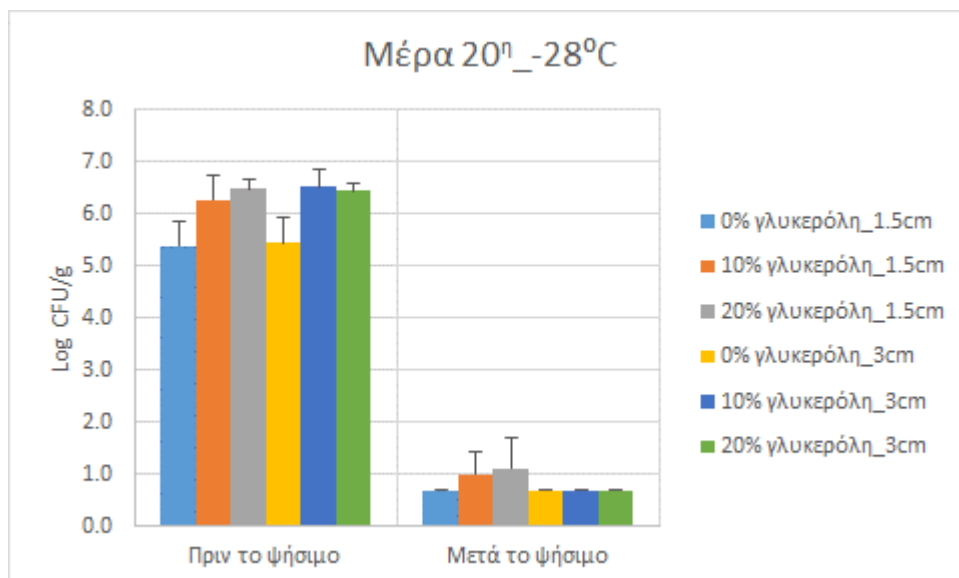
Γράφημα 4.2.2.3 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (σε γενικό υπόστρωμα TSA) κατά θερμική επεξεργασία των δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης στους 60 °C, την 20^η μέρα συντήρησης στους -16 °C. Οι μπάρες που μοιράζονται τουλάχιστον ένα γράμμα, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ($p>0,05$).

Στη συνέχεια, παρατίθενται τα γραφήματα 4.2.2.4 και 4.2.2.5, τα οποία παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της επιβίωσης του παθογόνου μικροοργανισμού *E.coli* O157:H7, σε δείγματα που υπέστησαν θερμική επεξεργασία στους 60 °C, μετά την συντήρησή τους για μια και για 20 μέρες αντίστοιχα στους -28 °C.

Δεν παρουσιάστηκαν μεταβολές στατιστικώς σημαντικές μεταξύ των δειγμάτων διαφορετικής σύστασης γλυκερόλης ($p>0,05$), ούτε μεταξύ των δειγμάτων διαφορετικού μεγέθους, ανεξαρτήτου της προσθήκης γλυκερόλης ($p>0,05$).



Γράφημα 4.2.2.4 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (σε γενικό υπόστρωμα TSA) κατά θερμική επεξεργασία των δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης στους 60 °C, την 1^η μέρα συντήρησης στους -28 °C.



Γράφημα 4.2.2.5 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (σε γενικό υπόστρωμα TSA) κατά θερμική επεξεργασία των δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης στους 60 °C, την 20^η μέρα συντήρησης στους -28 °C.

3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης στους 60 °C, την 20^η μέρα συντήρησης στους -28 °C.

Συγκρίνοντας την 1^η μέρα της θερμικής επεξεργασίας των δειγμάτων που έχουν συντηρηθεί στους -16 °C, με αυτά που έχουν συντηρηθεί -28 °C, παρατηρείται σημαντική ($p < 0,05$) διαφορά του πληθυσμού του παθογόνου μεταξύ των δειγμάτων των 1,5 cm που περιέχουν 20% γλυκερόλη. Ο πληθυσμός του παθογόνου ανέρχεται στα 2,18 log CFU / g στους -16 °C, ενώ στους -28 °C, μειώνεται στα 1,00 log CFU / g.

Ομοίως, συγκρίνοντας την 20^η μέρα των δύο συντηρήσεων στους -16 °C και στους -28 °C, παρατηρείται ότι ο πληθυσμός των δειγμάτων των 1,5 cm που περιέχουν 20% γλυκερόλη και συντηρήθηκαν στους -16 °C παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά με τον πληθυσμό του παθογόνου των δειγμάτων που συντηρήθηκαν στους -28 °C.

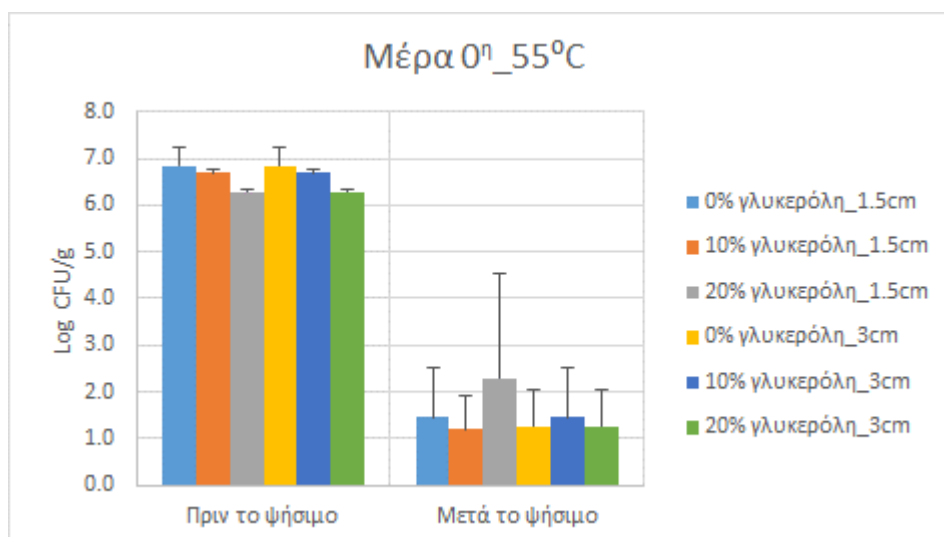
Συμπερασματικά, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η θερμοκρασία της συντήρησης. Τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους -28 °C, χρειάστηκαν παραπάνω χρόνο κατά τη θερμική επεξεργασία για να φτάσουν τη θερμοκρασία στόχο στο κέντρο τους, σε σχέση με αυτά που συντηρήθηκαν στους -16 °C. Επομένως, κανένας παράγοντας (μέγεθος, γλυκερόλη) δεν επέδρασε συνδυαστικά, με αποτέλεσμα να σημειώνεται μικρότερη επιβίωση στα δείγματα που συντηρήθηκαν στους -28 °C.

4.2.3 Θερμική επεξεργασία στους 55° C

Στο γράφημα 4.2.3.1 παρουσιάζονται οι μεταβολές του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 στα δείγματα meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης, τη 0^η μέρα συντήρησης πριν και μετά τη θερμική επεξεργασία στους 55 °C. Παρατηρείται, ότι ο πληθυσμός του παθογόνου παρουσιάζει σημαντική μείωση μετά τη θερμική επεξεργασία ($p < 0,05$).

Μελετώντας τους παράγοντες ξεχωριστά, η προσθήκη διαφορετικών ποσοστών γλυκερόλης δεν έχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στην επιβίωση του παθογόνου ($p > 0,05$).

Επίσης, δεν παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών μεγεθών ($p>0,05$). Επομένως, σε αυτή τη περίπτωση που δεν υπάρχει η επίδραση της κατάψυξης, οι διαφορετικοί παράγοντες της γλυκερόλης και του μεγέθους, δεν αρκούν για να επικαλύψουν τη θερμική επεξεργασία των 55 °C και να επηρεάσουν στην επιβίωση του παθογόνου.



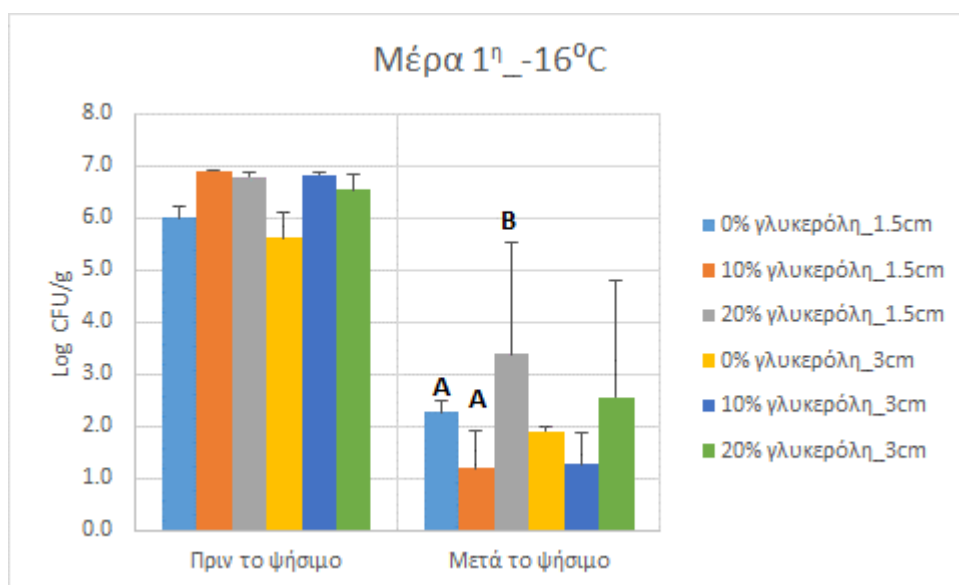
Γράφημα 4.2.3.1 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (σε γενικό υπόστρωμα TSA) κατά θερμική επεξεργασία των δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης στους 55 °C, την 0^η μέρα συντήρησης.

Συγκρίνοντας τη 0^η με τη 1^η μέρα της θερμικής επεξεργασίας στους 55 °C, παρατηρείται στατιστικώς σημαντική επιβίωση του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E.coli* O157:H7 ($p<0,05$) στα δείγματα των 1,5 cm που περιέχουν 20% γλυκερόλη, μετά τη συντήρησή τους, στους -16 °C για μια μέρα (Γράφημα 4.2.3.2). Σημειώνεται προσαρμογή των κυττάρων και μερική ανάκτηση.

Αναλυτικότερα, τα θερμικώς επεξεργασμένα δείγματα δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς το διαφορετικό πάχος (1,5 και 3 cm), ανεξάρτητα του ποσοστού της γλυκερόλης που προστέθηκε ($p>0,05$). Ο πληθυσμός των μικρών δειγμάτων ανέρχεται από τα 1,10 έως τα 3,40 log CFU / g, ενώ των μεγάλων από τα 1,10 έως τα 2,50 log CFU / g.

Αντιθέτως, παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα δείγματα που περιέχουν 20% γλυκερόλη, με τα δείγματα που περιέχουν 10% και 0% γλυκερόλη. Στα μικρά δείγματα των 1,5 cm, με το υψηλότερο ποσοστό γλυκερόλης, ο πληθυσμός του παθογόνου ανέρχεται 3,40 log CFU / g και διαφέρει στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$) με τα δείγματα που εμπεριέχουν 10% και 0% γλυκερόλη.

Επομένως, η κρυοπροστατευτική δράση του υψηλότερου ποσοστού της γλυκερόλης επιδρά στην θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου κατά τη θερμική επεξεργασία στους 55 °C, χωρίς να επηρεάζει το μέγεθος των δειγμάτων.



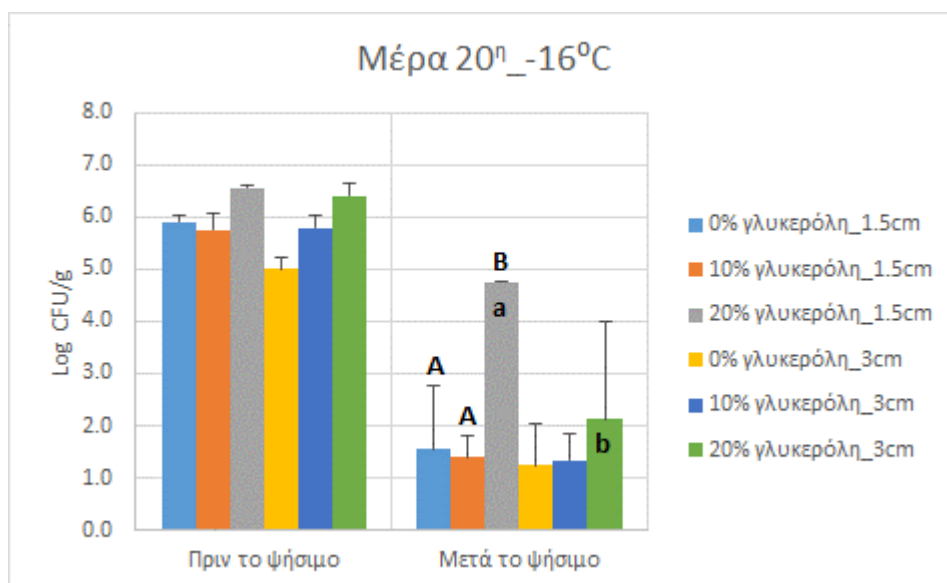
Γράφημα 4.2.3.2 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (σε γενικό υπόστρωμα TSA) κατά θερμική επεξεργασία των δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης στους 55 °C, την 1^η μέρα συντήρησης στους -16 °C. Οι μπάρες που μοιράζονται τουλάχιστον ένα γράμμα, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ($p > 0,05$).

Κατά τη θερμική επεξεργασία στους 55 °C, μετά από 20 μέρες συντήρησης στους -16 °C (Γράφημα 4.2.3.3), η επιβίωση του παθογόνου στα μικρά δείγματα που περιέχουν 20% γλυκερόλη αυξάνεται στατιστικώς σημαντικά, κατά 1,5 λογαριθμικούς κύκλους σε σχέση με την 1^η μέρα συντήρησης ($p < 0,05$).

Αναλυτικότερα, στατιστικώς σημαντική μεταβολή εμφανίζεται στα δείγματα των 1,5 και 3 cm που περιέχουν 20% γλυκερόλη ($p < 0,05$). Στα μικρά δείγματα ο πληθυσμός ανέρχεται στα 4,80 log CFU / g και είναι κατά 2,6 λογαριθμικούς κύκλους περισσότερος.

Όπως την πρώτη μέρα συντήρησης έτσι και την 20^η μέρα, η προσθήκη γλυκερόλης, δεσμεύει το νερό πλησίον της κυτταρικής επιφάνειας, με αποτέλεσμα να προστατεύει τον παθογόνο από την ψύξη, αλλά και από την θέρμανση κατά την θερμική επεξεργασία (Stead D, Park SF, 2000). Επίσης, τα δείγματα μικρότερου μεγέθους, παρουσιάζουν μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου *E.coli* O157:H7, σε σχέση με τα μεγαλύτερα. Αυτό το φαινόμενο σχετίζεται με μια έρευνα που είχε πραγματοποιηθεί σε τρυφεροποιημένο κρέας, το οποίο προσομοίαζε το μπιφτέκι. Η έρευνα αυτή έδειξε ακριβώς το ίδιο αποτέλεσμα, δηλαδή ότι τα δείγματα μικρότερου μεγέθους, παρουσιάζουν μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου *E.coli* O157:H7, σε σχέση με τα μεγαλύτερα (Shen et al., 2010).

Συμπερασματικά, το υψηλότερο ποσοστό γλυκερόλης, καθώς και το μικρότερο μέγεθος δρουν συνδυαστικά και έχουν σαν αποτέλεσμα την αυξημένη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου μετά από 20 μέρες συντήρησης στους -16°C , σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα.



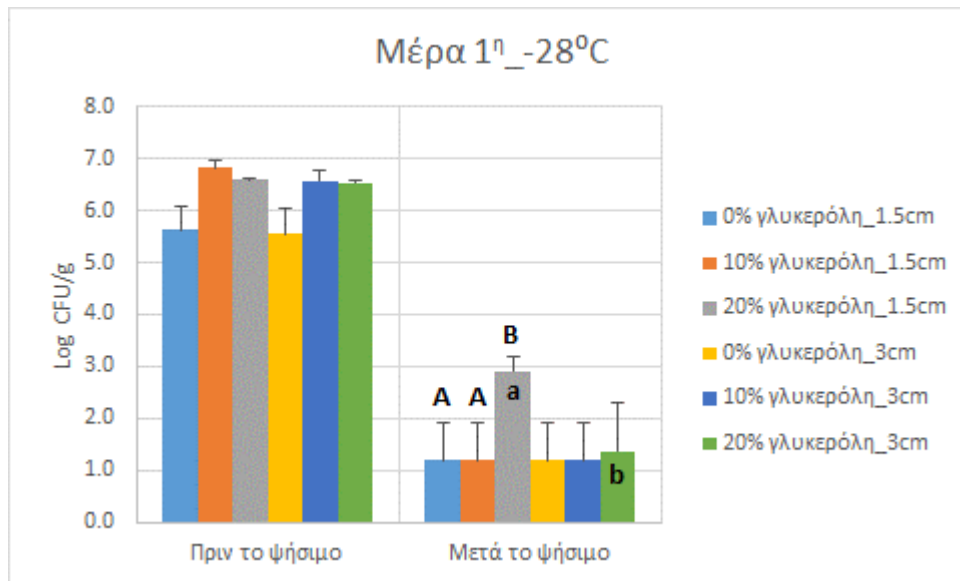
Γράφημα 4.2.3.3 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (σε γενικό υπόστρωμα TSA) κατά θερμική επεξεργασία των δειγμάτων meat broth των 1,5 και

3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης στους 55 °C, την 20^η μέρα συντήρησης στους -16 °C. Οι μπάρες που μοιράζονται τουλάχιστον ένα μικρό γράμμα, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ως προς το μέγεθος ($p>0,05$). Οι μπάρες που μοιράζονται τουλάχιστον ένα μεγάλο γράμμα, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ως προς το ποσοστό της προστιθέμενης γλυκερόλης ($p>0,05$).

Στο γράφημα 4.2.3.4 παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα δείγματα που περιέχουν 20% γλυκερόλη, με τα δείγματα που περιέχουν 10% και 0% γλυκερόλη. Στα μικρά δείγματα των 1,5 cm, με το υψηλότερο ποσοστό γλυκερόλης, ο πληθυσμός του παθογόνου ανέρχεται 2,90 log CFU / g και διαφέρει στατιστικώς σημαντικά ($p<0,05$) με τον πληθυσμό των δειγμάτων που εμπεριέχουν 10% και 0% γλυκερόλη κατά 1,8 λογαριθμικούς κύκλους.

Ωστόσο, παρατηρείται μεγαλύτερη επιβίωση στα μικρά δείγματα (2,90 log CFU / g) που εμπεριέχουν 20% γλυκερόλη και όχι τόσο στα μεγάλα (1,20 log CFU / g), όπως συνέβη την αντίστοιχη μέρα στους -16 °C συντήρηση, όπου ο πληθυσμός των μικρών δειγμάτων με 20% γλυκερόλη ανερχόταν στα 3,40 log CFU / g και των μεγάλων στα 2,50 log CFU / g. Επομένως, το διαφορετικό μέγεθος επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά τη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου.

Σε αυτό το φαινόμενο επηρεάζει η θερμοκρασία της συντήρησης. Τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους -28 °C, χρειάστηκαν παραπάνω χρόνο κατά τη θερμική επεξεργασία για να φτάσουν τη θερμοκρασία στόχο στο κέντρο τους, σε σχέση με αυτά που συντηρήθηκαν στους -16 °C. Επομένως, λιγότερο χρόνο θερμικής επεξεργασίας δέχτηκαν τα μικρά δείγματα και σε συνδυασμό με την κρυοπροστατευτική δράση του υψηλού ποσοστού της γλυκερόλης (20%), σημειώθηκε μεγαλύτερη επιβίωση.



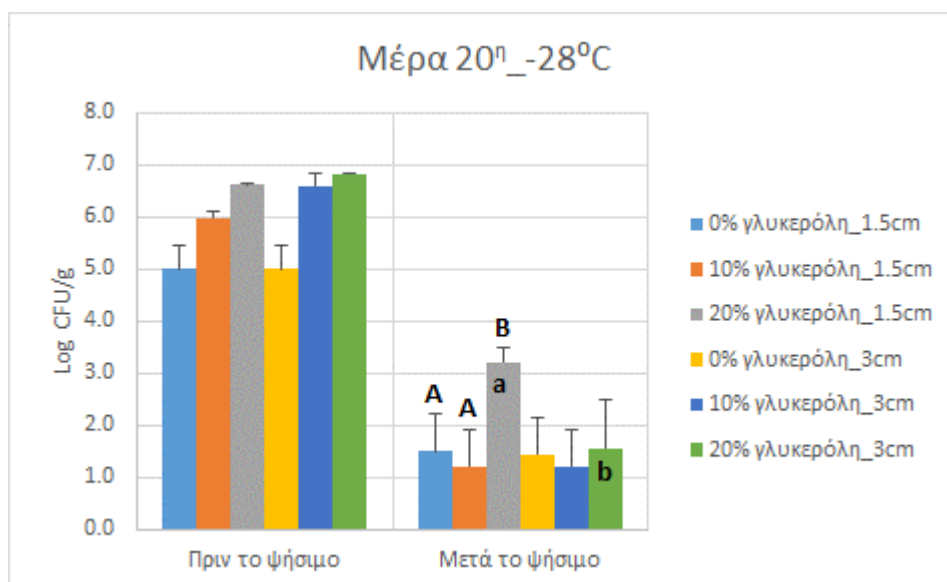
Γράφημα 4.2.3.4 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (σε γενικό υπόστρωμα TSA) κατά θερμική επεξεργασία των δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης στους 55 °C, την 1^η μέρα συντήρησης στους -28°C. Οι μπάρες που μοιράζονται τουλάχιστον ένα μικρό γράμμα, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ως προς το μέγεθος ($p>0,05$). Οι μπάρες που μοιράζονται τουλάχιστον ένα μεγάλο γράμμα, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ως προς το ποσοστό της προστιθέμενης γλυκερόλης ($p>0,05$).

Επιπρόσθετα, συγκρίνοντας τις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης την 20^η μέρα, ο πληθυσμός του παθογόνου στους -16 °C δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς το μέγεθος ή το ποσοστό της προστιθέμενης γλυκερόλης, με τον πληθυσμό των δειγμάτων που συντηρήθηκαν στους -28 °C (Γραφήματα 4.2.3.3 και 4.2.3.5), ($p=0,21$).

Στην περίπτωση της συντήρησης στους -28 °C, παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα δείγματα που περιέχουν 20% γλυκερόλη, με τα δείγματα που περιέχουν 10% και 0% γλυκερόλη. Στα μικρά δείγματα των 1,5 cm, με το υψηλότερο ποσοστό γλυκερόλης, ο πληθυσμός του παθογόνου ανέρχεται 3,10 log CFU / g και διαφέρει στατιστικώς σημαντικά ($p<0,05$) με τον πληθυσμό των δειγμάτων που εμπεριέχουν 10% και 0% γλυκερόλη.

Ομοίως με την πρώτη μέρα, παρατηρείται μεγαλύτερη επιβίωση του πληθυσμού στα μικρά δείγματα που εμπεριέχουν 20% γλυκερόλη (3,10 log CFU / g) και όχι τόσο στα μεγάλα (1,5 log CFU / g).

Λιγότερο χρόνο θερμικής επεξεργασίας δέχτηκαν τα μικρά δείγματα και σε συνδυασμό με την κρυοπροστατευτική δράση του υψηλού ποσοστού της γλυκερόλης (20%), σημειώθηκε μεγαλύτερη επιβίωση.



Γράφημα 4.2.3.5 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (σε γενικό υπόστρωμα TSA) κατά θερμική επεξεργασία των δειγμάτων meat broth των 1,5 και 3 cm με την προσθήκη 0%, 10% και 20% γλυκερόλης στους 55 °C, την 20^η μέρα συντήρησης στους -28°C. Οι μπάρες που μοιράζονται τουλάχιστον ένα μικρό γράμμα, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ως προς το μέγεθος ($p>0,05$). Οι μπάρες που μοιράζονται τουλάχιστον ένα μεγάλο γράμμα, δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ως προς το ποσοστό της προστιθέμενης γλυκερόλης ($p>0,05$).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η παρατεταμένη κατάψυξη σε συνδυασμό με την προσθήκη 20% γλυκερόλης επέδρασε στη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου *E. coli* O157:H7.
- Η υψηλή περιεκτικότητα γλυκερόλης (20%) έχει κρυοπροστατευτική δράση και προσδίδει αύξηση στη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου καθώς προστατεύει τα κύτταρα του παθογόνου από βλάβες που προκαλούνται από την κατάψυξη, συμβάλλοντας έτσι στην επιβίωσή του. Η γλυκερόλη έχει παρόμοια ανασταλτική δράση με το NaCl, χωρίς όμως να έχει την αντιμικροβιακή του δράση. Δεσμεύει το νερό πλησίον της κυτταρικής επιφάνειας, με αποτέλεσμα να προστατεύει τον παθογόνο από την ψύξη, αλλά και από την θέρμανση κατά την θερμική επεξεργασία. Από ανασταλτικός παράγοντας έχει τη δυνατότητα να προσδώσει θερμική αντίσταση στον παθογόνο.
- Η προσθήκη 20% γλυκερόλης, αντιστοιχεί στην προσθήκη 3,8% NaCl. Στη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρείται θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου με την προσθήκη μικρού ποσοστού γλυκερόλης, διότι το σύστημα είναι απλό (model food) και η παραμικρή προσθήκη το επηρεάζει.
- Το μέγεθος των δειγμάτων επιδρά στην επιβίωση του παθογόνου. Πιο συγκεκριμένα αυξημένη θερμοανθεκτικότητα παρατηρείται στα δείγματα των 1,5cm με την προσθήκη 20% γλυκερόλης, καθώς η θερμική επεξεργασία τους διήρκησε λιγότερο χρόνο.
- Το συγκεκριμένο μοντέλο τροφίμου προσομοιάζει την πραγματικότητα και μπορεί να αναδείξει το μηχανισμό και τη δράση συγκεκριμένων παραγόντων μέσα σε ένα σταθερό περιβάλλον. Ωστόσο, σε ένα πραγματικό τρόφιμο μπορεί να υπάρξει και συνδυαστική επίδραση των παραγόντων που μελετήθηκαν, με άλλους παράγοντες, όπως είναι οι πρωτεΐνες και η δομή του τροφίμου, παρουσιάζοντας ίσως ένα διαφορετικό αποτέλεσμα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abee, T., J. A. Wouters. (1999). Microbial stress response in minimal processing. *Int. J. Food Microbiol.* 50:65–91

Abram DD., Potter NN. (1984). Survival of *Campylobacter jejuni* at different temperatures in broth, beef, chicken and cod supplemented with sodium chloride. *J Food Prot*, 47:795800

Ackers, M. L., Mahon, B. E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P. S., Bibb, W. F., Rice, D. H., Barrett, T. J., Hutwagner, L., Griffin, P. M., & Slutsker, L. (1998). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *Journal of Infectious Diseases*, 177, 1588-1593.

Adams M.R., Moss M.O. (2008). *Food Microbiology* 3rd Ed. © The Royal Society of Chemistry, 2008, RSC Publishing.

American Meat Institute. (2010). Guideline document: product design, production and preparation of certain ground beef products. Available at: <http://www.meatami.com/ht/a/GetDocumentAction/i/63614>. Accessed 19 September 2011.

Armstrong, G. L., Hollingworth, J., Morris, J. G., (1996). Emerging Foodborne Pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a Model of Entry of a New Pathogen into the Food Supply of the Developed World. *Epidemiologic Reviews*, 18, (1): 29-49.

Banwart, G.J., (1981). *Basic Food Microbiology*. AVI Publishing Company, Inc. Westport, CT.

Bell, C. (2002). Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Int. J. Food Microbiol.* 78, 197–216.

Bettelheim, K. A. (2007). The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Crit. Rev. Microbiol.* 33, 67–87.

Bolton D., Byrne C., Catarane T., Sheridan J. (2001). Control of *Escherichia coli* O157:H7 in beefburgers. *Food Safety Department, The National Food Centre.*

Buchanan, R.L. Bagi, L.K. (1994). Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157:H7 to include sodium nitrite as a variable. *Intl. J. Food Microbiol.* 23: 317–322.

Buchanan, R. L., Michael P. D., (1997). Foodborne Disease Significance of *Escherichia coli* O157:H7 and Other Enterohemorrhagic *E. coli*. *Sci. Status Summ;* 51:69

Calcott PH., McLeod RA.(1974) Survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: A theoretical and practical study. *Can J Microbiol*, 20:671-681

Centres For Disease Control And Prevention. *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating a nationally distributed commercial brand of frozen ground beef patties and burgers. *Colorado Morbidity Mortality Weekly Report 1997*, 46:777-778

Chapman, P. A., Wright, D. J., Higgins, R. (1993). Untreated milk as a source of verotoxigenic *E. coli* O157. *Veterinary Record*, 133, 171-172.

Cheville, A.M., Arnold K.W., Buchrieser, C., Cheng C.M., Kaspar C.W., (1996). rpoS regulation of acid, heat and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*; 62: 1822–1824.

Clemens JD, Sack DA, Harris JR, Chakraborty J, Neogy PK, Stanton B, Huda N, Khan MU, Kay BA, Khan MR, Ansaruzzaman M, Yunus M, Rao MR, Svennerholm

AM, Holmgren J. (1988). Cross-protection by B subunit-whole cell cholera vaccine against diarrhea associated with heat-labile toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli*: results of a large-scale trial. *J Infect Dis* 158:372-377.

Cnang VP, Mills EW, Cutter CN. (2003). Comparison of recovery methods for freeze-injured *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter coli* in cell suspensions and associated with pork surfaces. *J Food Prot*, 66:798-803

Conner DE, Hall GS. (1994). Efficacy of selected media for recovery of *Escherichia coli* O157:H7 from frozen chicken meat containing sodium chloride, sodium lactate or polyphosphate. *Food Microbiol*, 11:337-344

Day NP, Scotland SM, Rowe B. (1981). Comparison of an HEp-2 tissue culture test with the Sereny test for detection of enteroinvasiveness in *Shigella spp.* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 13:596-597.

Demcnick PH, Palumbo SA, SMITH JL. (1982). Influence o pH on freeze-thaw lethality in *Staphylococcus aureus*. *J Food Safety*, 4:185-189

Donnenberg M. S., Kaper J. B., Finlay B. B., (1997). Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol* 5:109-114.

Dorsa, W. J., Cutter, C. N., Siragusa, G. R. (1997). Effects of steam vacuuming and hot water spray wash on the microflora of refrigerated beef carcass surface tissue inoculated with *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes*. *Journal of Food Protection*, 60, 114±119.

Enache, E., E. C. Mathusa, P. H. Elliot, D. G. Black, Y. Chen, V. N. Scott, D. W. Schaffner. (2011). Thermal resistance parameters for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in apple juice. *J. Food Prot.* 74:1231-1237.

Erickson MC, Nung Y. (1997). *Quality in frozen food*. New York, 174-183

Eslava CA, Villaseca J, Morales R, Navarro A, Cravioto A. (1993). Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*, abstr. B-105. In: Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington, DC: *American Society for Microbiology*, p. 44.

Fennema OR, Powerie WD, Marth EH. (1973). Freezing injury and cryoprotectants in low temperature preservation of foods and living matter. Marcel Dekker, New York, 476503

Food Safety Authority of Ireland (FSAI), (1999). The prevention of *E. coli* O157:H7 infection: A shared responsibility. Food Safety Authority of Ireland, Abbey Street, Dublin.

Garg, A. X., Suri, R. S., Barrowman, N., Rehman, F., Matsell, D., Rosas-Arellano, M. P., Salvadori, M., Haynes, R. B., Clark, W. F. (2003). Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *J. Am. Med. Assoc.* 290, 1360–1370.

Giuliodori, A. M., Di Pietro, F., Marzi, S., Masquida, B., Wagner, R., Romby, P., Gualerzi, C. O., Pon, C. L. (2010). The *cspA* mRNA is a thermosensor that modulates translation of the cold-shock protein CspA. *Mol Cell* 37, 21–33

Golden DA, Beuchat LR. (1992) Interactive effects of solutes, potassium sorbate and incubation temperature on growth, heat resistance and tolerance to freezing of *Zygosaccharomyces rouxi*. *J Appl Bacteriol*, 73:524-530

Goldstein, J. N., S. Pollitt, M. Inouye. (1990). Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:283–287

Greatorax JS, Thorne GM. (1994). Humoral immune response to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. *J Clin Microbiol* 32: 1172–1178.

Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 13, 60–85.

Griffith, J., Mullen, B., Price, P. E., (1994). Food safety: implications for food medical and behavioural scientists. *British Food Journal*, 97: 23- 28.

Hebraud M, Potier P. (1999). Cold shock response and low temperature adaptation in psychotropic bacteria. *J Mol Microbiol Biochem*, 1:211-219

Henderson IR, Czeczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. (1999). Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67:5587–5596.

Hicks S, Candy DC, Phillips AD. (1996). Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect Immun* 64:4751–4760.

Hudson JA. (1992). Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol*, 14:178-180

Inouye M, Phadtar S. (2004). Cold shock response and adaptation at near-freezing temperature in microorganisms. Science's STKE (electronic source: signal transduction knowledge environment).

Jackson, C. J., M. D. Hardin, and G. R. Acuff. (1996). Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in a nutrient medium and in ground beef patties as influenced by storage and holding temperatures. *J. Food Prot.* 59:230–237.

Jin, M., Ushioda, H., Arai, T., Kusunoki, K., Ishikami, T., Iwaya, M., Yamada, S., Ueki, T. (1997). Bacterial contamination of dish cloths and sponge brushes used at various restaurants and meat shops. *Annual Report of Tokyo Metropolitan Laboratory of Public Health*, 48, 201-205.

Jordan, D., McEwen, S. A., Lammerding, A. M., McNab, W. B., Wilson, J. B. (1999). Preslaughter control of *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle: a simulation study. *Preventive Veterinary Medicine*, 41, 55-74.

Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. (1983). Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet i*: 619–620.

Kaper, J. B. (2005). Pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 355-356.

Keusch, G. T., Grady, G. F., Mata, L. J., McIver, J. (1972). The pathogenesis of Shigella Diarrhea: I. Enterotoxin production by *Shigella dysenteriae* 1. *J. Clin. Investig.* 51, 1212–1217.

Konowalchuk J., Speirs J., Stavric S. (1977). Vero response to cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 18: 775–779.

Kubitschek, H. E. (1990). Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media. *J. Bacteriol.* 172 (1): 94–101.

Law, D. (2000). Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J. Appl. Microbiol.* 88, 729–745.

Liu, X., Yousef, A. E., Chism, G. W. (1997). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by the combination of organic acids and pulsed electric field. *Journal of Food Safety*, 16, 287±299.

Lund BM, Baird Parker Ti, Gould GW. (2000). *The microbiological safety and quality of food*. Aspen Publ, Gaithersburg, MB, 122-145

Madigan, M. T., Martinko, J. M. (2006). Brock Biology of microorganisms (11th Ed.). Pearson. ISBN 0-13-196893-9.

McEvoy, J. M., Doherty, A. M., Sheridan, J. J., Thompson-Carter, F. M., Garvey, P., McGuire, L., Blair, I. S. and McDowell, D. A., (2001). The incidence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* (in press).

McNabb, S., Jajosky, R. A., Hall-Baker, P., Adams, D., Sharp, P., Worshams, C., Anderson, W., Javier, A., Jones, G., Nitschke, D. (2008). Summary of notifiable Diseases - United States, 2006. *Morb. Mortal. Wkly Rep.* 55, 1–92.

Meng, J., Doyle, M. P., (1998). *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. In ‘*Microbiology of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in Foods*’, pp 92-108. Kaper, J. B. and O’Brien, A. D. eds. *American Society for Microbiology*, ashington, DC.

Moorhead SM, Dykes GA. (2002). Survival of *Campylobacter jejuni* on beef trimmings during freezing and frozen storage. *Lett Appl Microbiol*, 34:72-78

Mossel, D. A. A., Netten, P. V., (1984). Harmful effects of selective media on stressed micro-organisms: nature and remedies. *Society for Applied Bacteriology Symposium*, 12, 329-369.

Muntada-Carriga JM, Rodrigues-Jerez JJ, Lopez-Sabater EL, Mora Ventura M. (1995). Effect of chill and freezing on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenated of oyster meat. *Lett Appl Microbiol*, 2:225-227

Musarrat, J., Ahmad, M., (1988). pH induced damage and repair in *E. coli*. *Mutation Research*, 193, 219-252.

Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. (1987). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* 6:829–831.

O'Brien, A., LaVeck, G. (1983). Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 40, 675.

Paton, J. C., Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450–479.

Phadtare, S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr Issues Mol Biol* 6, 125–136

Polissi, A., De Laurentis, W., Zangrossi, S., Briani, F., Longhi, V., Pesole, G. & Deho G. (2003). Changes in *Escherichia coli* transcriptome during acclimatization at low temperature. *Res Microbiol* 154, 573–580

Potter NN. Cold preservation and processing (1986). In: Potter NN (ed) *Food science*. AVI Publ, Westport, CT, 201-205

Rajkowski, K.T., Marmer, B.S., (1995). Growth of *Escherichia coli* O157:H7 at fluctuating incubation temperatures. *J. Food Protect.* 58:1307–1313.

Ray, B., (1986). Impact of bacterial injury and repair in food microbiology: its past, present and future. *Journal of Food Protection*, 49, 651-655.

Riley, L., Remis, R., Helgerson, S., McGee, H., Wells, J., Davis, B., Hebert, R., Olcott, E., Johnson, L., Hargrett, N. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308, 681–685.

Sage, J. R., Ingham, S. C. (1998). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 after freezing and thawing in ground beef patties. *Journal of Food Protection*, 61, 1181-1183.

Shen Cangliang, Adler M. Jeremy, Geornaras Ifigenia, Belk E. Keith, Smith C. Gary and Sofos N. John (2010). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Nonintact Beefsteaks of Different Thicknesses Cooked by Pan Broiling, Double Pan Broiling, or Roasting by Using Five Types of Cooking Appliances, *Journal of Food Protection*, Vol. 73, No. 3, 2010, Pages 461–469

Shiga, K. (1898). Ueber den Dysenterie-bacillus (*Bacillus dysenteriae*). *Zentralbl, Bakteriol. Orig.* 913.

Sixma TK, Kalk KH, van Zanten BA, Dauter Z, Kingma J, Witholt B, Hol WG (1993). Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J Mol Biol* 230:890–918.

Souzou H, Bato M, Kojima T (1989). Changes in chemical structure and function in *Escherichia coli* cell membranes caused by freezing-thawing. II. Membrane lipid state and response of cells to dehydration. *Biochim Biophys Acta*, 978:11211

Stead D, Park SF (2000). Roles Fe superoxide dismutase and catalase in resistance of *Campylobacter coli* to freeze thaw-stress. *Appl Environ Microbiol*, 66:3110-112

Tarsitani, G., Gadliardi, C., Persiani, G., (1998). Microbiological analysis of health risks in university cafeterias. *Igiene-Moderna*, 110, (1), 3-12.

Tauschek M, Gorrell R, Robins-Browne RM, (2002). Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. PNAS 99: 7066-7071. doi:10.1073/pnas.092152899.

Tzipori S, Montanaro J, Robins-Browne RM, Vial P, Gibson R, Levine MM. (1992). Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. *Infect Immun* 60:5302–5306.

Welinder-Olsson, C., Kaijser, B. (2005). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Scand. J. Infect. Dis.* 37, 405–416.