



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Πτυχιακή εργασία

**Ψυχρότροφα Αλλοιογόνα Βακτήρια**  
**Psychrotrophic Spoilage Bacteria**

Φοιτήτριες

**Βαριαντζά Αντωνία**

**Variantza Antonia**

**Σταμπέλου Αθανασία**

**Stampelou Athanasia**

Υπεύθυνος καθηγητής:

**Σπηλιώτης Βασίλειος**

**ΑΘΗΝΑ 2023**



**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Εξεταστική επιτροπή

01	Σπηλιώτης Βασίλειος	
02	Κοντελής Σπύρος	
03	Μπατρίνου Ανθιμία	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένες Σταμπέλου Αθανασία του Κυριάκου, με αριθμό μητρώου 71616138 και Βαριαντζά Αντωνία του Παναγιώτη, με αριθμό μητρώου 71616152 φοιτήτριες του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

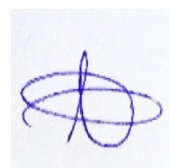
«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου»

Υπογραφή  
Σταμπέλου Αθανασία



Υπογραφή  
Βαριαντζά Αντωνία



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον καθηγητή κο. Σπηλιώτη Βασίλειο κυρίως για την εμπιστοσύνη που μας έδειξε, και την υπομονή που έκανε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής εργασίας μας. Όπως επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του.

Θα θέλαμε επίσης να απευθύνουμε τις ευχαριστίες μας στους γονείς μας, στα αδέρφια μας και σε όλους εκείνους όπου μας στήριξαν καθ'όλη την διάρκεια των σπουδών μας, φροντίζοντας για την καλύτερη δυνατή μόρφωση μας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>5</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>8</b>
<b>ΑΒΣΤΑΚΤ</b>	<b>9</b>
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>10</b>
<b>ΔΟΜΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>10</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>12</b>
<b>2. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΨΥΧΡΟΤΡΟΦΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ</b>	<b>15</b>
2.1 Τι είναι ψυχρότροφα βακτήρια	15
2.2 Συνθήκες ανάπτυξης ψυχροτρόφων βακτηρίων	15
2.3 Περιγραφή ορισμένων ομάδων ψυχροτρόφων βακτηρίων	15
2.3.1 <i>Pseudomonas</i> spp.	15
2.3.2 <i>Aeromonas</i> spp.	16
2.3.3 <i>Flavobacterium</i>	18
2.3.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	18
<b>3. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΨΥΧΟΤΡΟΦΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ</b>	<b>21</b>
3.1 Εισαγωγικά στοιχεία	21
3.2 Παραδείγματα τροφίμων και ψυχρότροφα βακτήρια	22
3.3 Γάλα	23
3.4 Κρέας σε ψύξη	24
3.5 Θαλάσσιοι οργανισμοί	25
<b>4. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ</b>	<b>28</b>
4.1 Εισαγωγικά στοιχεία	28
4.2 Άμεση τεχνική επιφθορίζοντος φίλτρου(DEFT)	28
4.3 Μέθοδος κυτταρομετρίας ροής (FCM)	30

4.4 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR	31
4.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (PCR-ELISA)	32
4.6 Τεχνική φθορίζοντος in situ υβριδισμού (FISH)	33
4.7 Ηλεκτροφόρηση γέλης προσωρινής κλίσης θερμοκρασίας (TTGE)	34
4.8 Ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (LAMP)	35
<b>5. ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΨΥΧΡΟΤΡΟΦΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ</b>	<b>38</b>
5.1 Εισαγωγικά στοιχεία	38
5.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
5.3 <i>Escherichia coli</i>	40
5.4 Λιστερίωση	40
5.5 <i>Aeromonas</i>	41
<b>6. ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΨΥΧΡΟΤΡΟΦΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ</b>	<b>44</b>
6.1 Εισαγωγικά στοιχεία	44
6.2 Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας	44
6.3 Ιοντίζουσα ακτινοβολία	46
6.4 Επεξεργασία υψηλής πίεσης (HPP)	47
6.5 Εδώδιμες μεμβράνες και επικαλύψεις	50
<b>7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>52</b>
<b>8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>55</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Διάκριση μικροοργανισμών σε κατηγορίες ανάλογα με τη θερμοκρασία ανάπτυξή τους.....	12
Πίνακας 2: Παραδείγματα μεθόδων ανίχνευσης ψυχροτρόφων μικροοργανισμών σε διάφορα τρόφιμα.....	52
Πίνακας 3: Ορισμένα παραδείγματα τρόπου πρόληψης και προστασίας από την ανάπτυξη ψυχροτρόφων μικροοργανισμών.....	53

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1:Γραφική αναπαράσταση βακτηριακού κυττάρου <i>Aeromonas</i> .....	17
Εικόνα 2: Αποικίες διαφόρων ειδών <i>Listeria</i> .....	20
Εικόνα 3: (a) Πλήρως μηχανοκίνητο μικροσκόπιο επιφθορισμού Olympus IX81 (b) Λεπτομερής όψη του βραχίονα επι-φωτισμού για το μικροσκόπιο IX81 που δείχνει στοιχεία της διαδρομής φωτός φθορισμού.....	29
Εικόνα 4: Συσκευή κυτταρομετρίας ροής.....	30
Εικόνα 5: Στάδια μεθόδου φθορίζοντος in situ υβριδισμού.....	34
Εικόνα 6: Ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (LAMB).....	36
Εικόνα 7: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης της επεξεργασίας υψηλής πίεσης στα βακτήρια.....	49
Εικόνα 9: Μετατροπή χιτίνης σε χιτοζάνη με αποακετυλίωση.....	50

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το θέμα της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι οι ψυχρότροφοι αλλοιογόνοι οργανισμοί και, συγκεκριμένα τα ψυχρότροφα βακτήρια, που προσβάλουν τα τρόφιμα και δυνητικά μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία. Τα ψυχρότροφα βακτήρια μπορεί κανείς να τα συναντήσει στη φύση, τόσο σε θαλάσσια όσο και σε χερσαία οικοσυστήματα, αλλά και σε τρόφιμα που φυλάσσονται σε συνθήκες ψύξης και έχουν ανιχνευθεί σε κρέας και κρεατοσκευάσματα, θαλασσινά, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, φρούτα και λαχανικά. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas*, τα οποία είναι κυρίως αλλοιογόνα για τα τρόφιμα σε ψύξη και παθογόνα αν καταναλωθούν από τον άνθρωπο, το βακτήριο *Listeria monocytogenes* που μπορεί να προκαλέσει τη λιστερίωση, βακτήρια του γένους *Flavobacterium* που είναι παθογόνα κυρίως για τα ψάρια τόσο στη φύση όσο και στις ιχθυοκαλλιέργειες, προκαλώντας οικολογική αλλά και οικονομική ζημία. Η ανίχνευση των ψυχροτρόφων μικροοργανισμών σε τρόφιμα που φυλάσσονται σε συνθήκες ψύξης περιλαμβάνουν μεθοδολογίες όπως η άμεση τεχνική επιφθορίζοντος φίλτρου (DEFT), η μέθοδος κυτταρομετρίας ροής (FCM), η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, PCR – ELISA), τεχνική φθορίζοντος in situ υβριδισμού (FISH), ηλεκτροφόρηση γέλης προσωρινής κλίσης θερμοκρασίας (TTGE), ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (LAMP). Η πρόληψη και η αντιμετώπιση της ανάπτυξης ψυχροτρόφων βακτηρίων στα τρόφιμα περιλαμβάνει διαδικασίες όπως συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP), εφαρμογή ιοντίζουσας ακτινοβολίας, επεξεργασία υψηλής πίεσης (HPP) ή εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών ή επικαλύψεων με την προσθήκη ή χωρίς φυσικών συντηρητικών και αντιβακτηριακών συστατικών.

**Λέξεις κλειδιά:** ψυχρότροφα, *Pseudomonas*, *Listeria monocytogenes*, μέθοδοι ανίχνευσης



## ABSTACT

The subject of this thesis is psychrotrophic microorganisms and, specifically, psychrotrophic bacteria, which spoil food and can potentially cause problems for human health. Psychrotrophic bacteria can be found in nature, both in marine and terrestrial ecosystems, but also in foods that are kept in refrigerated conditions and have been identified in meat and meat products, seafood, milk and dairy products, fruits and vegetables. Typical examples are bacteria belonging to the genus *Pseudomonas*, which are mainly spoilage for refrigerated foods and pathogenic if consumed by humans, the bacterium *Listeria monocytogenes* which can cause listeriosis, bacteria of the genus *Flavobacterium* which are mainly pathogenic for fish both in nature and in fish farms, causing ecological as well as economic damage. The detection of psychrotrophic microorganisms in food stored in refrigerated conditions includes methodologies such as the direct epifluorescent filter technique (DEFT), the flow cytometry method (FCM), the polymerase chain reaction method (PCR, PCR – ELISA), the fluorescent in situ hybridization technique (FISH), temperature transient gradient gel electrophoresis (TTGE), isothermal loop-mediated amplification (LAMP). Prevention and treatment of the growth of psychrotrophic bacteria in food includes processes such as modified atmosphere packaging (MAP), application of ionizing radiation, high pressure processing (HPP) or application of edible films or coatings with or without the addition of natural preservatives and antibacterial ingredients.

**Key words:** psychrotrophs, *Pseudomonas*, *Listeria monocytogenes*, detection methods

## ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης βιβλιογραφικής εργασίας είναι η κατανόηση των ιδιοτήτων και των χαρακτηριστικών των ψυχρότροφων βακτηρίων που επιτρέπει την ανάπτυξη τους στα τρόφιμα σε συνθήκες ψύξης. Πρόκειται για μικροοργανισμούς που συχνά είναι αλλοιογόνοι ή / και παθογόνοι για τον άνθρωπο και κατά συνέπεια μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά και στον καταναλωτή. Μέσα από τη βιβλιογραφική έρευνα αναζητούνται τρόποι ανίχνευσης, αλλά και σύγχρονες τεχνολογίες όπου με μικρή επιβάρυνση στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του τροφίμου και την ελάχιστη δυνατή επεξεργασία θα εξασφαλίσουν ποιοτικό και ασφαλές προϊόν.

## ΔΟΜΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η εργασία διακρίνεται σε πέντε κεφάλαια.

Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται μία αναφορά στα χαρακτηριστικά, τις ιδιότητες και τις συνθήκες ανάπτυξης ορισμένων ομάδων βακτηρίων που έχουν αρκετά ψυχρότροφα στελέχη και βρίσκονται ευρέως διαδεδομένα τόσο στη φύση όσο και στα τρόφιμα, όπως *Pseudomonas* spp., *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Listeria monocytogenes*.

Στο δεύτερο κεφάλαιο, παρουσιάζονται ορισμένες έρευνες που επιβεβαιώνουν την ύπαρξη των ψυχροτρόφων βακτηρίων στα τρόφιμα και συγκεκριμένα στο γάλα, στο κρέας, σε θαλάσσιους οργανισμούς που είτε βρίσκονται σε κρύα νερά είτε μετά την αλίευση φυλάσσονται σε συνθήκες ψύξης. Αναφέρονται χαρακτηριστικά είδη ψυχροτρόφων που έχουν ταυτοποιηθεί από τα προϊόντα αυτά.

Στο τρίτο κεφάλαιο αναφέρονται ορισμένες μέθοδοι ανίχνευσης των βακτηρίων, εκτός της καλλιέργειας σε άγαρ, άρα και των ψυχρότροφων βακτηρίων [άμεση τεχνική επιφθορίζοντος φίλτρου (DEFT), μέθοδος κυτταρομετρίας ροής (FCM), μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, PCR – ELISA), τεχνική φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH), ηλεκτροφόρηση γέλης προσωρινής κλίσης θερμοκρασίας (TTGE), ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (LAMP)].

Στο τέταρτο κεφάλαιο, ακολουθούν ορισμένες πληροφορίες για τις τροφιμογενείς ασθένειες που προκαλούνται από την κατανάλωση των ψυχροτρόφων βακτηρίων,

την συμπτωματολογία που παρουσιάζουν και τη σοβαρότητα των προβλημάτων που μπορούν να προκαλέσουν.

Στο πέμπτο κεφάλαιο δίνονται ορισμένες πληροφορίες για σύγχρονες τεχνολογίες με τις οποίες η βιομηχανία τροφίμων επιτυγχάνει να προστατεύει τα τρόφιμα και τον άνθρωπο από αυτούς τους μικροοργανισμούς. Ορισμένες από τις τεχνικές που εφαρμόζονται είναι η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρα (MAP), η εφαρμογή ιοντίζουσας ακτινοβολίας, η επεξεργασία υψηλής πίεσης (HPP) ή η εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών ή επικαλύψεων με την προσθήκη ή χωρίς φυσικών συντηρητικών και αντιβακτηριακών συστατικών. Οι μέθοδοι αυτοί μπορούν να εφαρμοσθούν μεμονωμένα ή συνδυαστικά.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλει στην ανάπτυξη, αλλά και στην επιβίωση των μικροοργανισμών είναι η θερμοκρασία. Το εύρος θερμοκρασιών που αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί είναι από  $-8^{\circ}\text{C}$  ως  $+90^{\circ}\text{C}$ . Στον πίνακα 1, εμφανίζεται η διάκριση των μικροοργανισμών σε θερμοφιλα, μεσόφιλα, ψυχρόφιλα και ψυχρότροφα.

Πίνακας 1: Διάκριση μικροοργανισμών σε κατηγορίες ανάλογα με τη θερμοκρασία ανάπτυξής τους

Κατηγορία μικροοργανισμών	Εύρος θερμοκρασιών ( $^{\circ}\text{C}$ )		
	Ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης	Άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης	Μεγίστη θερμοκρασία ανάπτυξης
Θερμόφιλα	35-45	45-65	60-90
Μεσόφιλα	5 – 10	25-45	35-47
Ψυχρόφιλα	-5 έως 0	12-15	15-20
Ψυχρότροφα	0 έως 7	25-30	30-35

Οι ψυχρόφιλοι και οι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα κατά τη συντήρηση του τροφίμου σε χαμηλές θερμοκρασίες. Συχνά, ο όρος ψυχρόφιλος και ψυχρότροφος συγχέονται ή χρησιμοποιούνται σαν μία ομάδα μικροοργανισμών. Όπως όμως φαίνεται από τον πίνακα 1, είναι δύο διαφορετικές κατηγορίες, καθώς τα ψυχρότροφα έχουν βέλτιστη ανάπτυξη σε υψηλότερο εύρος θερμοκρασιών ( $25-30^{\circ}\text{C}$ ), ενώ οι ψυχρόφιλοι σε μικρότερο ( $12-15^{\circ}\text{C}$ ). Επίσης, για τη βιομηχανία τροφίμων ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των ψυχρότροφων είναι  $0$  έως  $7^{\circ}\text{C}$ , το οποίο συμπίπτει με τις συνήθεις συνθήκες ψύξης των τροφίμων.

Οι Ingraham & Stokes (1959) ανέφεραν ότι ο όρος ψυχρόφιλο (psychropile) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1902 για να χαρακτηρίσει τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο, σχολίασαν ότι ο όρος αυτός μπορεί να μην είναι απόλυτα δόκιμος, καθώς για αυτούς τους μικροοργανισμούς υπήρξαν αρκετά επιστημονικά στοιχεία τα οποία έκαναν αναφορά ότι για βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης που διέφεραν σημαντικά από τις

συνθήκες ψύξης. Έτσι, αναφέρθηκαν ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 10 ως 20°C, τους 15 ως 25°C ή ακόμη και τους 20 ως 40°C (Ingraham & Stokes, 1959). Ο Eddy (1960), αλλά και οι Mossel & Zwart (1960) εισήγαγαν τον όρο ψυχρότροφος για κάθε οργανισμό που αναπτύσσεται από τους 5°C και κάτω, ανεξάρτητα από την άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης που παρουσιάζουν (Eddy, 1960, Mossel & Zwart, 1960). Από το 1968 ως σήμερα, ο όρος ψυχρότροφα (psychrotroph), χρησιμοποιείται για μικρόβια ικανά να αναπτυχθούν από 7°C και κάτω, ανεξάρτητα από την άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους και την ικανότητα τους να σχηματίσουν αποικίες ή να δώσουν θολερότητα, σύμφωνα με τη Διεθνή Γαλακτοκομική Ομοσπονδία (International Dairy Federation - IDF) (Thomas, 1969).

Κατά κανόνα, τα ψυχρότροφα μικρόβια είναι θερμοευαίσθητα και καταστρέφονται κατά τη παστερίωση. Έτσι, η παρουσία τους σε παστεριωμένα ή γενικά σε τρόφιμα που υπέστησαν θερμική επεξεργασία, υποδηλώνει μόλυνση μετά την επεξεργασία τους. Όμως, υπάρχουν και θερμοάντοχα ψυχρότροφα μικρόβια, κυρίως είδη των γενών *Bacillus* και *Clostridium*. Η ικανότητα συντήρησης των τροφίμων παρουσία των ψυχρότροφων μικροοργανισμών εξαρτάται από τον αρχικό πληθυσμό που περιέχουν. (Τυμπής, 2011).

Έχει παρατηρηθεί ότι οι ψυχρότροφοι οργανισμοί σε χαμηλές θερμοκρασίες μπορούν να τροποποιήσουν τη λειτουργία τους. Μπορούν να παρουσιάσουν:

- Αύξηση της αναλογίας των ακόρεστων λιπαρών οξέων στα λιπίδια των ψυχροτρόφων.
- Αύξηση της σύνθεσης των πολυσακχαριτών λόγω θερμοευαισθησίας που παρουσιάζουν τα ενζυμικά συστήματα σύνθεσης
- Αύξηση της παραγωγής των χρωστικών ουσιών από τους ψυχροτρόφους οργανισμούς που έχουν αυτή την ιδιότητα
- Τροποποίηση του ρυθμού διάσπασης βασικών μεταβολιτών. Οι χαμηλές θερμοκρασίες αναγκάζουν τους ψυχρότροφους οργανισμούς να αποκτήσουν βραδύτερο μεταβολισμό.

Η πλειοψηφία των ψυχρότροφων μικροοργανισμών ανήκει στα βακτήρια. Χαρακτηριστικά είδη ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas* και *Enterobacteriaceae* τα

οποία είναι Gram αρνητικά και στα γένη *Micrococcuss*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Arhrobacter* τα οποία ανήκουν στα Gram θετικά βακτήρια.

Είναι απαραίτητο να λαμβάνονται όλα εκείνα τα μέτρα ασφαλείας που θα προστατέψουν το τρόφιμο από την επιμόλυνση είτε λόγω επαφής με μολυσμένη επιφάνεια είτε λόγω περιβαλλοντικών συνθηκών είτε λόγω του χειρισμού της πρώτης ύλης.

## 2. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΨΥΧΡΟΤΡΟΦΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

### 2.1 Τι είναι ψυχρότροφα βακτήρια

Τα ψυχρότροφα μικρόβια είναι ένας γενικός όρος για μια κατηγορία μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν σε χαμηλές θερμοκρασίες. Γενικά, τα ψυχρότροφα βακτήρια μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: gram-θετικά βακτήρια συμπεριλαμβανομένων *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Paenibacillus* και *Microbacterium* και σε αρνητικά κατά gram βακτήρια όπως *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flarobacterium*, *A.* και *Chromobacterium*. Μεταξύ αυτών, το *Pseudomonas fluorescens* κυριαρχεί στη φθορά του νωπού ή παστεριωμένου γάλακτος το *Listeria monocytogens* είναι κοινό στο κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, ενώ στελέχη του γένους *Salmonella* spp. οδηγεί στην υποβάθμιση της ποιότητας των θαλασσινών. Εκτός από τα βακτήρια έχουν αναφερθεί και άλλοι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί, όπως ορισμένοι μύκητες οι οποίοι συνδέθηκαν με τα αλλοιωμένα λαχανικά (Wei et al, 2019).

### 2.2 Συνθήκες ανάπτυξης ψυχροτρόφων βακτηρίων

Η ανάπτυξη των ψυχροτρόφων βακτηρίων μπορεί να πραγματοποιηθεί από θερμοκρασίες από 0°C ως 15 έως 30 °C, ενώ η άριστη θερμοκρασία εντοπίζεται στους 15 έως 30 °C. Κατά συνέπεια, τα ψυχρότροφα είναι οι κυρίαρχοι αλλοιογόνοι οργανισμοί που μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα ψυγείο. Επίσης, έχουν βρεθεί ακόμη και σε οικοσυστήματα της Ανταρκτικής, σε νερό, έδαφος και φυτά. Η ευεργετική επίδραση των ψυχρότροφων βακτηρίων στο φυσικό περιβάλλον, συμπεριλαμβάνει την βιοαποικοδόμηση ανεπιθύμητων ουσιών και την ανάπτυξη ανταγωνιστικής δράσης έναντι πιθανών παθογόνων (Przemieniecki et al., 2014)

### 2.3 Περιγραφή ορισμένων ομάδων ψυχροτρόφων βακτηρίων

#### 2.3.1 *Pseudomonas* spp

Οι βασικοί μορφολογικοί χαρακτήρες που είναι κοινοί στις *Pseudomonas* spp είναι κύτταρα σε σχήμα ράβδου, τα οποία είναι είτε ίσια είτε ελαφρώς κυρτά σε ένα επίπεδο, παρουσία πολικών μαστιγίων, gram-αρνητική αντίδραση και απουσία σπορίων. Τα περισσότερα είδη είναι ψυχρότροφα και είναι γνωστό ότι ευθύνονται για την αλλοίωση των τροφίμων που βρίσκονται σε ψύξη. Ορισμένα από τα πιο σημαντικά είδη είναι (Raposo et al., 2016):

- *Pseudomonas fluorescens*
- *Pseudomonas aeruginosa* (παθογόνο είδος)
- *Pseudomonas putida*
- *Pseudomonas fragi*
- *Pseudomonas chlororaphis*
- *Pseudomonas syringae* (φυτοπαθογόνο είδος)
- *Pseudomonas chichorii* (φυτοπαθογόνο είδος)

Τα είδη *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* και *Pseudomonas fragi* είναι τα πιο συχνά απαντώμενα είδη (Raposo et al., 2016).

Χαρακτηρίζονται επίσης από καλή μεταβολική ευελιξία λόγω της παρουσίας ενός πολύπλοκου ενζυμικού συμπλόκου (Raposo et al., 2016).

Μερικά είδη έχουν ιατρική σημασία επειδή θεωρούνται ευκαιριακά παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα, ενώ άλλα, όπως τα φυτοπαθογόνα, είναι πολύ σημαντικά στον αγροτικό τομέα (Raposo et al., 2016).

### 2.3.2 *Aeromonas* spp.

Το γένος *Aeromonas* έχει μία ιστορία λίγο μεγαλύτερη από έναν αιώνα. Οι πρώτες αναφορές για νέα βακτήρια που απομονώθηκαν χρονολογούνται από το 1890. Τα βακτήρια αυτά κατά την διάρκεια των χρόνων δεν στάθηκε δυνατόν να ταξινομηθούν σε κάποιο άλλο γνωστό γένος βακτηρίων, αν και έχουν ορισμένα κοινά γνωρίσματα με άλλους μικροοργανισμούς που ανήκαν στις κατηγορίες των *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia* και *Proteus*. Το όνομα *Aeromonas* είναι μία σύνθετη λέξη που παράγεται από τις ελληνικές λέξεις αέρας (“aer”) + μονάδα (“monas”) και πρωτοχρησιμοποιήθηκε το 1936 από τους Kluuyver & Van Neil, για να συμπεριλάβει τα βακτήρια που παράγουν αέριο. Το 1943, ο Stanier, χρησιμοποίησε



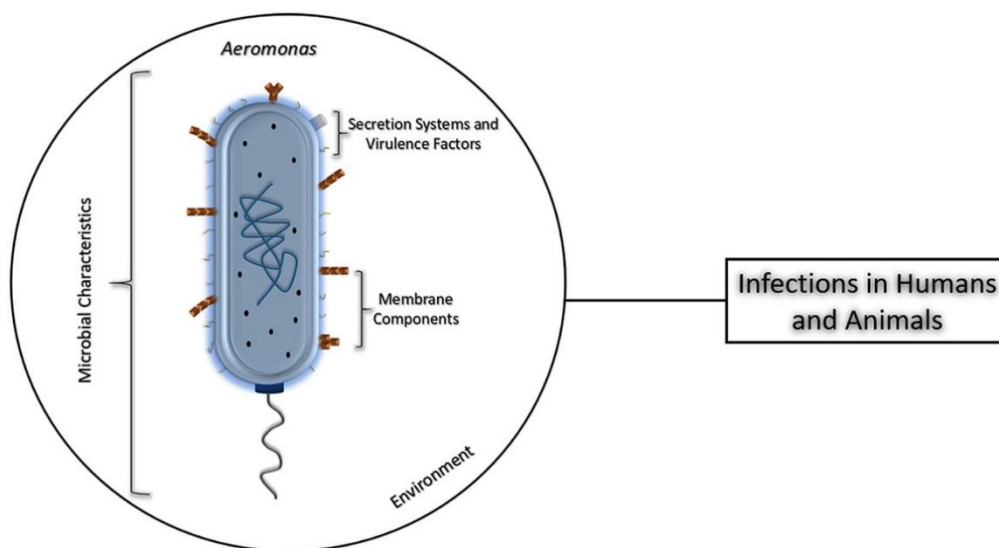
επίσημα την ονομασία «Aeromonas» για να δηλώσει ένα νέο γένος (Pessoa et al., 2019). Το 1980 αριθμούσε μόλις τέσσερα γνωστά είδη:

- *Aeromonas hydrophila*
- *Aeromonas punctata*
- *Aeromonas salmonicida*
- *Aeromonas sobria*

Το 2010, ο αριθμός των ειδών είχε φθάσει τα 24 είδη (Janda & Abbott, 2010) και το 2021, ο αριθμός τους είχε ανέλθει στα 36 είδη (Greiner et al., 2021).

Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Aeromonas* spp. είναι (Pessoa et al., 2019, Greiner et al., 2021):

- Gram-(-)-αρνητικά βακτήρια
- Προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί
- Είναι ραβδοειδή και ευθύγραμμα με μήκος 1-3μm (εικόνα 1).



Εικόνα 1:Γραφική αναπαράσταση βακτηριακού κυττάρου *Aeromonas*

Πηγή: Pessoa et al., 2019

- Δεν σχηματίζουν σπόρια
- Συνήθως θετικά στην οξειδάση
- Μεταβολίζουν τη γλυκόζη
- Αναπτύσσονται σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 10 έως 42 °C.

Το γένος *Aeromonas* χωρίζεται, σε σχέση με τις συνθήκες ανάπτυξης και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά, σε δύο κύριες ομάδες (Pessoa et al., 2019):

- Ψυχρόφιλα αλλά και ορισμένα ψυχρότροφα βακτήρια που έχουν καλή ανάπτυξη μεταξύ 22 και 25°C. Είναι ακίνητα βακτήρια. Εκπρόσωπος αυτής της ομάδας είναι το *A. salmonicida*, το οποίο προσβάλλει ψάρια και ερπετά.
- Μεσόφιλα. Αναπτύσσονται καλά στους 35-37°C και έχουν την ικανότητα της κίνησης λόγω ενός μόνο πολικού μαστιγίου.

### 2.3.3 Flavobacterium

Το γένος *Flavobacterium*, ανήκει στην οικογένεια *Flavobacteriaceae* στη φυλή *Bacteroidetes*. Τα βακτήρια του γένους *Flavobacterium* έχουν τα εξής χαρακτηριστικά (Kralova et al., 2019):

- Είναι Gram (-) αρνητικά βακτήρια.
- Έχουν ραβδοειδές σχήμα.
- Είναι αερόβια.
- Τα μέλη αυτού του γένους χαρακτηρίζονται από την παραγωγή κιτρινωπών χρωστικών.

Στελέχη βακτηρίων που ανήκουν στα *Flavobacterium* έχουν ανιχνευθεί σε πολλές διαφορετικές πηγές όπου επικρατούν αρκετά διαφορετικές συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας, όπως έδαφος, διάφοροι τύποι νερού (π.χ. γλυκό νερό, θαλάσσιο νερό, αλμυρό ή υφάλμυρο νερό), σε θερμές και συχνότερα σε πολικές περιοχές. σε τρόφιμα και γαλακτοκομικά προϊόντα, ενώ ορισμένα είδη αποτελούν καλά αναγνωρισμένα παθογόνα ψαριών. Η πλειονότητα των μελών του γένους *Flavobacterium* είναι ευρέως γνωστά για τις οικολογικές προσαρμογές τους στο ψυχρό ή/και πολικό κλίμα, γεγονός που τα καθιστά ελκυστικό αντικείμενο μελετών που επικεντρώνονται σε ένζυμα προσαρμογής στο κρύο ή σε μηχανισμούς προσαρμογής στο κρύο (Kralova et al., 2019).

### 2.3.4 *Listeria monocytogenes*

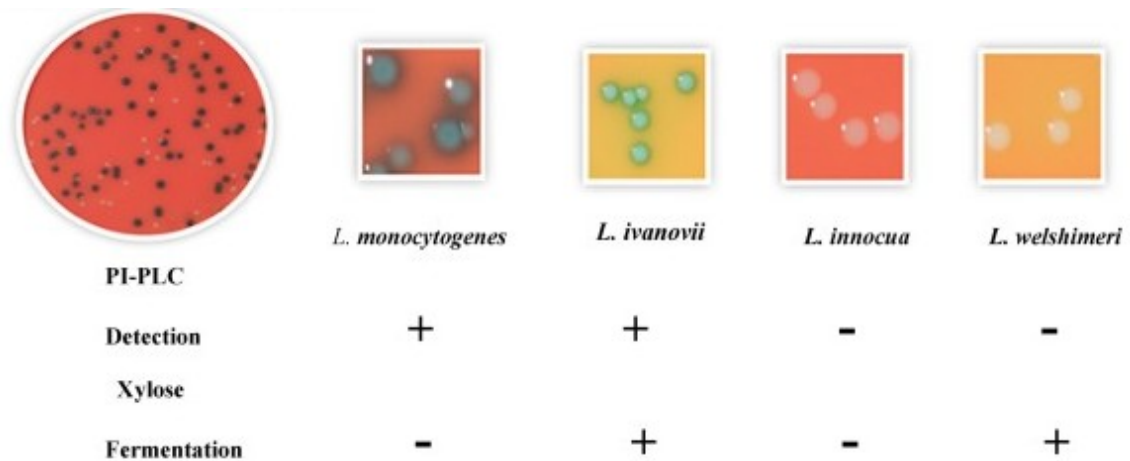
Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα βακτήριο που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς έχει αναγνωριστεί από τις αρχές του 1980 ως ο αιτιολογικός παράγοντας για την ανάπτυξη σοβαρών τροφιμογενών λοιμώξεων. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά του είναι ότι (Wang & Orsi, 2013):

- Είναι Gram (+) θετικό βακτήριο
- Δεν σχηματίζει σπόρια
- Έχει ραβδοειδές σχήμα με διάμετρο 0,4 - 0,5 μm και μήκος 0,5 μm - 2,0 μm σε μήκος.
- Φέρει μαστίγια περιμετρικά στο κύτταρο, με κινητικότητα η οποία εκδηλώνεται τυπικά στους ≤30 °C αλλά όχι στους 37 °C
- Προαιρετικά αναερόβιο
- Είναι θετικό στην καταλάση
- Μεταβολίζει σάκχαρα προς οξύ

Σύμφωνα με τους Wang & Orsi (2013) τα είδη που έχουν αναγνωρισθεί και ανήκουν στο γένος *Listeria* είναι οκτώ: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. marthii* και *L. rocourtiae*. Από τα είδη αυτά ως παθογόνα θερμόαιμων θηλαστικών έχουν αναγνωρισθεί τα *L. monocytogenes* και *L. ivanovii*, με το πρώτο να προκαλεί στον άνθρωπο μία σοβαρή λοίμωξη, η οποία μπορεί να αποφέρει ακόμη και θάνατο, τη λιστερίωση. Έχουν αναγνωρισθεί 13 ορότυποι *L. monocytogenes*, οι περισσότερες περιπτώσεις ανθρώπινης νόσου περιλαμβάνουν στελέχη τριών ορότυπων, δηλαδή ορότυπους 1/2a, 1/2b και 4b (Wang & Orsi, 2013)

Τα είδη *Listeria* περιέχουν τείχοϊκό και λιποτείχοϊκό οξύ στα κυτταρικά τους τοιχώματα και οι αποικίες ορισμένων σχηματίζουν μια γαλαζοπράσινη λάμψη όταν παρατηρούνται λοξά από το εκπεμπόμενο φως. Η δοκιμαστική διαφοροποίηση των ειδών *Listeria* βασίζεται εν μέρει στη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (δηλαδή, αιμόλυση) η οποία διαφοροποιεί μεταξύ *L. monocytogenes* και *L. innocua* (εικόνα 2).

Στην εικόνα αυτή διακρίνονται αποικίες που αναπτύχθηκαν σε άγαρ και ανήκουν σε παθογόνα και μη παθογόνα είδη λιστέρια. Διακρίνονται οι αποικίες της *L. monocytogenes* και της *L. innocua* από τις αποικίες των *L. ivanovii* και *L. welshimeri*, καθώς η δεύτερη ομάδα μικροοργανισμών ζυμώνει την ξυλόζη (αλλαγή χρώματος υποστρώματος ανάπτυξης σε πορτοκαλι- κίτρινο) και διακρίνονται μεταξύ τους λόγω της γαλαζοπράσινης λάμψης των αποικιών της *L. monocytogenes*



Εικόνα 2: Αποικίες διαφόρων ειδών Listeria

Πηγή: Chen et al., 2017

Είναι ψυχρότροφος μικροοργανισμός ο οποίος έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών από 1°C - 45°C, με βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης από 30°C - 37°C. Αναπτύσσεται σε pH που κυμαίνεται από 5,0 -9,0 και αναπτύσσεται σε ενεργότητα ύδατος μεγαλύτερη από 0,93, με βέλτιστη ανάπτυξη όταν  $a_w \geq 0,97$ . Αντέχει σε αλατότητα ως και 12% χλωριούχου νατρίου (NaCl) και μπορεί να αναπτυχθεί εύκολα όταν η αλατότητα είναι μικρότερη του 6% (Chen et al., 2017).

### 3. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΨΥΧΟΤΡΟΦΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

#### 3.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Η θερμοκρασία αποτελεί έναν από του πιο σημαντικούς παράγοντες που συμμετέχει στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Ευπαθή τρόφιμα για να διατηρηθούν αναλλοίωτα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα οδηγούνται σε ψύξη ή κατάψυξη. Ωστόσο οι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες, δηλαδή σε θερμοκρασίες που επικρατούν στον χώρο του ψυγείου. Συχνά, οι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί αναπαράγονται γρήγορα, παράγοντας λιπάσες και πρωτεάσες υψηλής θερμικής σταθερότητας σε τρόφιμα που βρίσκονται στο ψυγείο, οι οποίες έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην ποιότητα των τροφίμων (Wei et al., 2019).

Οι Altunatmaz et al., (2012) σε έρευνα που πραγματοποίησαν μελέτησαν τον αέρα σε 48 ψυγεία με έτοιμα τρόφιμα προς κατανάλωση που βρίσκονταν σε καταστήματα λιανικής πώλησης. Για την ακρίβεια, τοποθέτησαν τρυβλία Petri με κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξη ψυχροτρόφων οργανισμών σε 12 ψυγεία με προϊόντα κρέατος όπως αλλαντικά ή έτοιμα κεφτεδάκια, 26 ψυγεία με μικτά τρόφιμα, όπως ορεκτικά, γαλακτοκομικά, λαχανικά, προϊόντα κρέατος, 6 ψυγεία με λαχανικά και 4 ψυγεία με επιδόρπια όπως μπακλαβάς, προφιτερόλ. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο υπό συνθήκες ψύξης (4-6°C) και μετά από 10 μέρες επώασης σε αερόβιες συνθήκες στους 7°C προσδιορίστηκε ο αριθμός των αποικιών των ψυχροτρόφων βακτηρίων. Ανιχνεύθηκαν στο 87,5% των ψυγείων ψυχρότροφα βακτήρια (42 από τα 48). Τα ψυχρότροφα βακτήρια ήταν οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί στα ψυγεία που περιείχαν κρέας και κρεατοσκευάσματα. Τα ψυχρότροφα βακτήρια που ταυτοποιήθηκαν ανήκαν κυρίως στα είδη *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Esherichia*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Morexella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptococcus* κ.λπ. Παρατηρήθηκε ότι ενώ από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας συστήνεται η θερμοκρασία αποθήκευσης των τροφίμων είναι πολύ στους 5 °C στο ψυγείο, ώστε να αποτραπεί η ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροοργανισμών, η μέση θερμοκρασία των εξεταζόμενων ψυγείων

ήταν πάνω από τη συνιστώμενη. (Altunatmaz et al., 2012). Κατά συνέπεια, η ρύθμιση της θερμοκρασίας είναι ιδιαίτερα σημαντική και ακόμη και μικρές αποκλίσεις και διακυμάνσεις μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα στη μικροβιακή σταθερότητα των τροφίμων.

### 3.2 Παραδείγματα τροφίμων και ψυχρότροφα βακτήρια

Οι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί έχουν ανιχνευθεί και ταυτοποιηθεί σε διάφορα τρόφιμα που συντηρούνται σε συνθήκες ψύξης, όπως κρέας, γάλα και θαλασσινά, αλλά και μπορούν να ανιχνευθούν και σε φρούτα, λαχανικά και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Altunatmaz et al., 2012). Στον πίνακα παρουσιάζονται ορισμένα παραδείγματα που επιβεβαιώνουν την παρουσία των ψυχροτρόφων μικροοργανισμών σε ορισμένα τρόφιμα.

Είδος τροφίμου	Είδος ή είδη ψυχροτρόφων μικροοργανισμών	Μέθοδος ανίχνευσης	Αναφορά
Κρέας (βόειο, ελάφι και αρνί) ωμό σε συσκευασία υπό κενό	<i>Clostridium tagluense</i> και ανθεκτικά στις συνθήκες ψύξης βακτήρια ( <i>Clostridium putrefaciens</i> , <i>Clostridium algidicarnis</i> , <i>Clostridium frigidum/estertheticum</i> , <i>Clostridium gasigenes</i> )	PCR σε πραγματικό χρόνο και επιβεβαίωση με RFLP	Cavill et al., 2011
Φρέσκο και αλλοιωμένο βόειο κρέας	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Real-Time PCR	Pennacchia et al., 2009
Γάλα αγελάδας	12 στελέχη <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Hafnia alve</i>	RAPD-PCR	Ercolini et al., 2009
Νωπό γάλα	<i>Enterobacter kobei</i> , <i>Serratia ureilytica</i> , <i>Aerococcus urinaeequi</i>		Junior et al., 2018
<b>Σκουμπρί (μέγιστη ποσότητα ψυχροτρόφων), Sau</b>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Achromobacter</i>		Salem et al., 2018

<b>rus, Mugil Cephalu s, Horse Mackerel και σαρδέλα</b>			
---	--	--	--

Τα πιο κοινά ψυχρότροφα βακτήρια στο νωπό γάλα είναι θετικοί κατά Gram μικροοργανισμοί όπως τα *Enterobacter kobei*, *Serratia ureilytica*, *Aerococcus urinaeequi*, ενώ η *Listeria monocytogenes*, όπως αναφέρθηκε, είναι ένας Gram θετικός μικροοργανισμός με δυνατότητα να ανάπτυξης σε πολλά υποστρώματα, ενώ σε συνθήκες ψύξης, προσβάλλει συνήθως τα γαλακτοκομικά, το κρέας και τα προϊόντα τους. Επιπλέον, το ψυχρότροφο *Brochothrix thermosphacta* αποτελεί σημαντική πηγή αλλοίωσης του κρέατος κατά την αερόβια αποθήκευση, ενώ το *Clostridium estertheticum* είναι ένα σπορογόνο βακτήριο που προκαλεί αλλοίωση σε τρόφιμα που βρίσκονται σε συνθήκες ψύξης, αλλά θεωρείται ψυχρόφιλο (Wei et al., 2019).

### 3.3 Γάλα

Το νωπό γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα του νωπού γάλακτος φιλοξενούν διάφορους μικροοργανισμούς, οι οποίοι συνθέτουν τη μικροχλωρίδα των προϊόντων αυτών. Η σύνθεση όμως αυτής της μικροχλωρίδας δεν είναι σταθερή και εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως το είδος του ζώου που παράγει το γάλα, την εποχή, τη γεωγραφική προέλευση, τη διατροφή και την υγεία των γαλακτοπαραγωγικών ζώων, αλλά και από τον χειρισμό που το γάλα υφίσταται στην γαλακτοπαραγωγική μονάδα, τις συνθήκες υγιεινής που επικρατούν στο χώρο, τον χρόνο αλλά και τις συνθήκες στις οποίες αποθηκεύονται το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Ercolini et al., 2009).

Οι μικροοργανισμοί που μπορούν να εντοπισθούν στο γάλα μπορεί να είναι ωφέλιμοι για την τυροκομία, όπως είναι τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, αλλά μπορούν να αναπτυχθούν και αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί. Οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί υποβαθμίζουν την ποιότητα και την θρεπτική αξία των γαλακτοκομικών προϊόντων, αλλά ταυτόχρονα είναι αρκετά συχνά επικίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία. Στην κατηγορία των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών ανήκουν και τα ψυχρότροφα βακτήρια (Ercolini et al., 2009).

Στα ψυχρότροφα βακτήρια ανήκουν τόσο Gram θετικοί όσο και Gram αρνητικοί μικροοργανισμοί. Οι σημαντικότεροι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι:

- Μικροοργανισμοί που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas*. Μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στη σύνθεση του γάλακτος και των αντίστοιχων γαλακτοκομικών προϊόντων, κυρίως με τη βοήθεια πρωτεολυτικών και λιπολυτικών ενζύμων που παράγουν. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να υδρολύσουν μέρος από τις πρωτεΐνες και τα λίπη που περιέχονται στο γάλα, οδηγώντας έτσι στην παραγωγή ενώσεων με δυσάρεστο οργανοληπτικό χαρακτήρα. Είναι ανθεκτικά ένζυμα ακόμη και αν εκτεθούν σε υψηλές θερμοκρασίες όπως είναι η παστερίωση ή και η επεξεργασία υπερυψηλής θερμοκρασίας (UHT) (Ercolini et al., 2009)
  - *Listeria monocytogenes* (Munsch-Alatossava et al., 2010)
  - *Bacillus cereus* (Munsch-Alatossava et al., 2010)
  - Μικροοργανισμοί που ανήκουν στα γένη *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, τα οποία συχνά εμφανίζουν αντοχή στα αντιβιοτικά (Munsch-Alatossava et al., 2010)

### 3.4 Κρέας σε ψύξη

Τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά που διαθέτει το κρέας επιτρέπουν σε μία μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών να το χρησιμοποιήσουν ως υπόστρωμα, να δημιουργήσουν αποικίες και να πολλαπλασιαστούν με ταχείς ρυθμούς. Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό να μελετήσουν και να ταυτοποιήσουν τα στελέχη των μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις στο κρέας και στα προϊόντα κρέατος. Ορισμένα στελέχη που έχουν ανιχνευθεί και ταυτοποιηθεί είναι τα *Brochothrix (B.) thermosphacta*, *Pseudomonas spp.*, *Carnobacterium spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.* και *Shewanella putrefaciens*. Θεωρούνται ότι αποτελούν κυρίαρχα μέλη της αλλοιογόνου μικροχλωρίδας στο βοδινό και χοιρινό κρέας και στα αντίστοιχα κρεατοσκευάσματα που αποθηκεύονται σε συνθήκες ψύξης (Ercolini et al., 2009, Pennacchia et al., 2009).

Το *Brochothrix thermosphacta* είναι ένα ψυχρότροφο είδος που συνήθως εμπλέκεται στην αλλοίωση του κρέατος και συχνά αναγνωρίζεται ως ο κυρίαρχος οργανισμός που προκαλεί δυσάρεστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως οσμή τυριού. Το *B. Thermosphacta* αναπτύσσεται στο κρέας τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες και η παρουσία του συσχετίζεται με την παραγωγή



ακετοΐνης/διακετυλίου και 3-μεθυλοβουτανόλης. Η γνώση των γενών/ειδών που επηρεάζουν την αλλοίωση του κρέατος είναι απαραίτητη για τον καθορισμό μιας επιτυχημένης μεθόδου συντήρησης τροφίμων (Pennacchia et al., 2009).

Τα πουλερικά, ιδιαίτερα όσα αποθηκεύονται με το δέρμα, έχουν υψηλά αρχικά επίπεδα μικροοργανισμών, γεγονός που τα καθιστά εξαιρετικά ευπαθή. Συνήθως 4-10 ημέρες μετά τη σφαγή σε ψυχρή αποθήκευση το κρέας των πουλερικών συχνά είναι ακατάλληλο για κατανάλωση λόγω αύξησης του πληθυσμού των μικροβίων. Για να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής του κρέατος πουλερικών συχνά συσκευάζονται σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> με χαμηλά επίπεδα υπολειμματικού O<sub>2</sub> καθώς στις συνθήκες αυτές αναστέλλεται η δράση των βακτηρίων που μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση στο κρέας. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί στοιχεία για την ανάπτυξη ψυχρότροφων βακτηρίων γαλακτικού οξέος στο τέλος της διάρκειας της ζωής του πουλερικού που συσκευάζεται σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Τα βακτήρια αυτά ανήκουν στα γένη *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* και *Weissella* και μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση, αποχρωματισμό, παραγωγή άοσμων ενώσεων. Έχει αναφερθεί επίσης η παρουσία *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Lactococcus*, *Pseudomonas* spp (Samarundo et al., 2019).

Πηγή των ψυχροτρόφων βακτηρίων μπορεί να είναι οι επιφάνειες του σφαγείου και της μονάδας επεξεργασίας με τις οποίες το κρέας των πουλερικών έρχεται σε επαφή, αλλά και τα φτερά και τα πόδια των πτηνών, η παροχή νερού και γενικότερα ο βιομηχανικός εξοπλισμός. Ένας από τους κυριότερους παράγοντες μόλυνσης των κρεάτων θεωρείται ο αέρας, καθώς συχνά αρκετοί μικροοργανισμοί ανιχνεύονται εκεί (Samarundo et al., 2019).

### 3.5 Θαλάσσιοι οργανισμοί

Τα ψάρια θεωρούνται η κύρια πηγή πρωτεΐνης υψηλής ποιότητας που μπορούμε να αφομοιώσουμε εύκολα και πλήρως. Είναι πολύ πλούσια πηγή βιταμινών όπως βιταμίνη B6, B12 και πλούσια σε μέταλλα όπως ιώδιο, Ca, Ph που είναι ζωτικής σημασίας για την υγεία μας. Επίσης, είναι εξαιρετική πηγή μη κορεσμένων λιπαρών οξέων που προστατεύουν τους καταναλωτές ιχθύων από καρδιακές παθήσεις, παχυσαρκία και υπέρταση (Salem et al., 2018).

Η παρουσία ψυχροτροφικών οργανισμών μπορεί να αποδοθεί σε περιβαλλοντική μόλυνση γύρω από τα ψάρια. Επίσης, η χρήση μολυσμένου νερού

κατά τη μεταφορά παίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση του βακτηριακού φορτίου των ψυχροτροφικών βακτηρίων, η καθυστέρηση της ψύξης μετά τη συγκομιδή και άλλα σφάλματα χειρισμού μεταξύ της συγκομιδής και της επεξεργασίας οδηγούν σε αποσύνθεση των θαλάσσιων ψαριών και επιτρέπουν στα μικρόβια να αναπτυχθούν γρήγορα (Salem et al., 2018).

Η μικροβιακή αλλοίωση των ψαριών συνήθως περιγράφεται ως πρωτεολυτική διαδικασία, ο *Pseudomonas* spp. θεωρείται ο πιο σημαντικός ψυχροτροφικός μικροοργανισμός που προκαλεί αλλοίωση των ψαριών και ως εκ τούτου, μπορεί να εμφανιστεί ασθένεια από την κατανάλωση τέτοιων ψαριών ή των προϊόντων του, αν και τα σημάδια αλλοίωσης μπορεί να μην είναι εμφανή. *Pseudomonas* spp. είναι ευρέως διαδεδομένα στο έδαφος και στο νερό. Συνήθως αναγνωρίζονται ως παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα και άλλα είδη μπορεί να προκαλέσουν αλλοίωση των τροφίμων. Συνεπώς, τα είδη *Pseudomonas* είναι σημαντικοί αλλοιογόνοι οργανισμοί σε πολλά προϊόντα διατροφής με απλή ψύξη, ιδιαίτερα στα ψάρια, στα οποία γίνονται η κυρίαρχη μικροχλωρίδα κατά την αποθήκευση σε ψύξη. Επιπλέον, η παρουσία τους στα ψάρια δημιουργεί μεγάλο κίνδυνο καθώς οδηγούν σε δηλητηρίαση και/ ή αλλοίωση των ψαριών (Salem et al., 2018).

Τα ψάρια απειλούνται από τους ψυχρότροφους μικροοργανισμούς όχι μόνο μετά την αλίευση, αλλά και μέσα στο νερό. Οι ασθένειες που οφείλονται στα βακτήρια του *Flavobacterium* αναφέρθηκαν για πρώτη φορά από τον Davis το 1922 και έκτοτε έχουν αναγνωρισθεί ως σοβαρή απειλή τόσο για τα άγρια όσο και για τα πολλαπλασιαζόμενα σε εκτροφεία αποθέματα ψαριών. Αρχικά, αυτές οι ασθένειες αποδίδονταν σε τρία βακτήρια της οικογένειας *Flavobacteriaceae* (Loch & Faisal, 2015). Συγκεκριμένα:

- *Flavobacterium psychrophilum*, ο αιτιολογικός παράγοντας της βακτηριακής νόσου του κρύου νερού και του συνδρόμου της ιχθύος της ιριδίζουσας πέστροφας
- *Flavobacterium columnare*, ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου του *columnaris*
- *Flavobacterium branchiophilum*, ο πιθανολογούμενος παράγοντας της βακτηριακής νόσου των βραγχίων

Επίσης έχουν υπάρξει αναφορές για τη δράση και άλλων στελεχών. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι στελέχη του *Flavobacterium* spp. όπως

*Flavobacterium johnsoniae*, *Flavobacterium succinicans*, *Flavobacterium hydatis*, σχετίζονται με άρρωστα ψάρια.

Στην οξεία λοίμωξη των ψαριών, η θνησιμότητα μπορεί να ξεπεράσει το 70% των προσβεβλημένων ψαριών, ενώ οι επιζώντες μπορεί να υποφέρουν από κακή ανάπτυξη και ανωμαλίες της σπονδυλικής στήλης. Σε υποξείες και χρόνιες λοιμώξεις, η φλαβοβακτηρίωση προκαλεί παρατεταμένη θνησιμότητα που μπορεί να οδηγήσει σε συνεχείς οικονομικές απώλειες (Loch & Faisal, 2015).

## 4. ANΙΧΝΕΥΣΗ

### 4.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Για τη διασφάλιση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων για τα τρόφιμα ψυχρής αποθήκευσης, είναι σημαντικό να αναπτυχθούν τεχνικές και μέθοδοι ταχείας ανίχνευσης και ελέγχου για αυτούς τους ψυχροτρόφους μικροοργανισμούς (Ercolini et al., 2009). Εξετάζεται η ανάπτυξη μεθόδων ταχείας ανίχνευσης ψυχροτρόφων μικροοργανισμών σε τρόφιμα ψυχρής αποθήκευσης, συμπεριλαμβανομένης των (Wei et al., 2019):

- Της άμεσης τεχνικής επιφθορίζοντος φίλτρου (direct epi-fluorescent filter)
- της μεθόδου κυτταρομετρίας ροής (flow cytometry method)
- της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time polymerase chain reaction)
- του υβριδισμού in situ φθορισμού (fluorescence in situ hybridization)
- την ηλεκτροφόρησης πηκτής με διαβάθμιση χρονικής θερμοκρασίας (temporal temperature gradient gel electrophoresis) και
- ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (and loop-mediated isothermal amplification.)

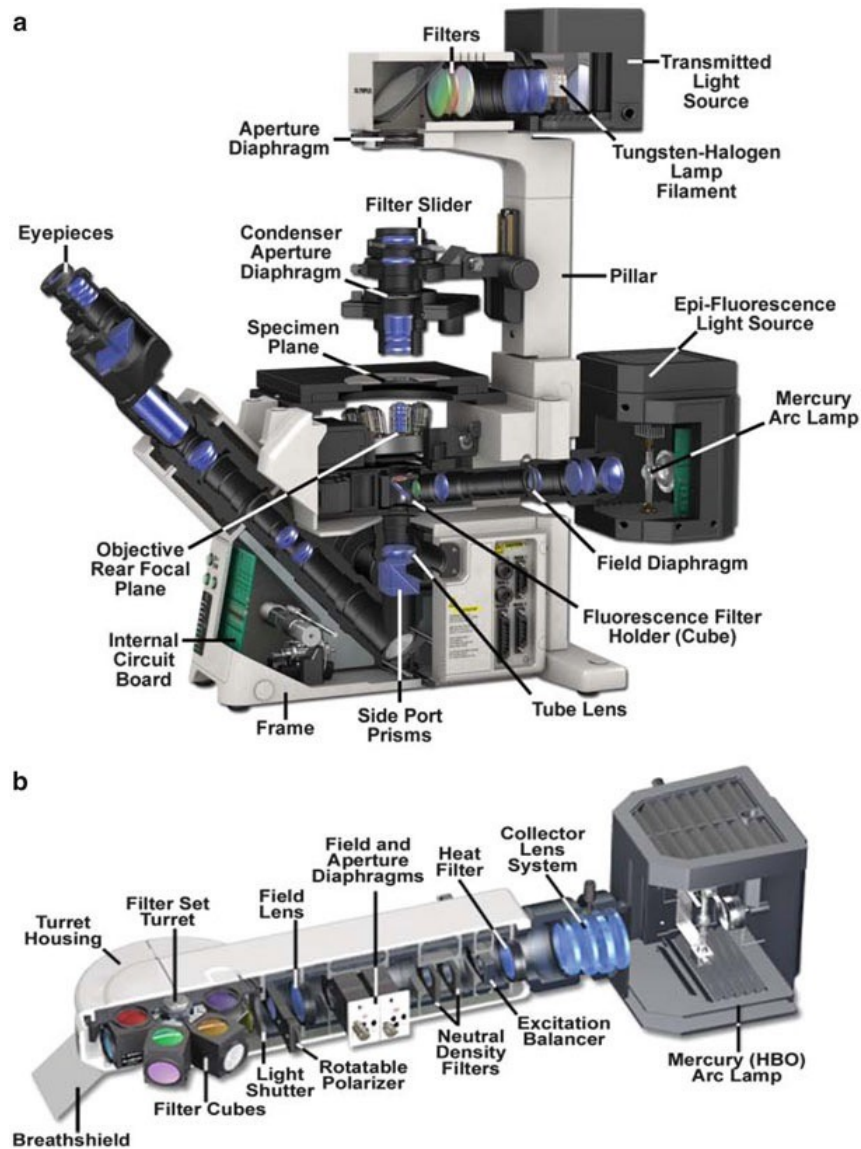
Οι κοινές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση, την απαρίθμηση και/ή την ταυτοποίηση μικροοργανισμών στα τρόφιμα βασίζονται γενικά σε συμβατικές μικροβιακές τεχνικές. Συχνά είναι χρονοβόρες διαδικασίες και μπορεί να επηρεάσουν την πραγματική σύνθεση του βακτηριακού πληθυσμού που αλλοιώνει τα τρόφιμα (Pennacchia et al., 2009).

### 4.2 Άμεση τεχνική επιφθορίζοντος φίλτρου(DEFT)

Η άμεση τεχνική επιφθορίζοντος φίλτρου (Direct epi-fluorescent – DEFT) είναι μια σχετικά απλή μέθοδος που βασίζεται στις βιολογικές αντιδράσεις για την ανίχνευση βακτηρίων-στόχων. Στην τεχνική αυτή, τα βακτήρια-στόχοι χρωματίζονται με πορτοκαλί ακριδίνης (AO) ή 4', 6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (DAPI) και μετρώνται σε μαύρα πολυανθρακικά φίλτρα χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο επιφθορισμού. Το

AO/DAPI είναι μια φθορίζουσα χρωστική που συνδέεται ισχυρά με το DNA και χρησιμοποιείται για τη βαφή ζωντανών κυττάρων. Αυτή η μέθοδος είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη διαδικασία για άμεση καταμέτρηση (Wei et al., 2019).

Στην εικόνα 3, παρουσιάζεται ένα μικροσκόπιο επιφθορισμού.



Εικόνα 3: (a) Πλήρως μηχανοκίνητο μικροσκόπιο επιφθορισμού Olympus IX81 (b) Λεπτομερής όψη του βραχίονα επι-φωτισμού για το μικροσκόπιο IX81 που δείχνει στοιχεία της διαδρομής φωτός φθορισμού.

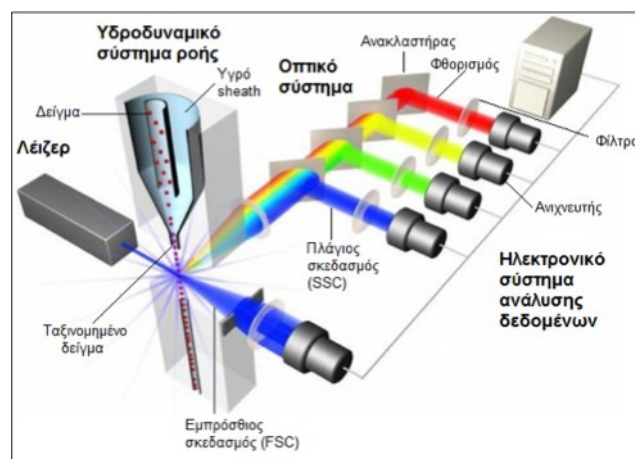
Πηγή: Webb & Brown, 2012

Οι Olszewska et al. (2015) μελέτησαν την πιθανότητα της καταμέτρησης της *Listeria monocytogenes* με τη μέθοδο της άμεσης τεχνικής επιφθορίζοντος φίλτρου. Το δείγμα ήταν σκληρό τυρί που είχε μολυνθεί με το συγκεκριμένο παθογόνο και

αλλοιογόνο μικροοργανισμό και στη συνέχεια είχε αποθηκευτεί σε συνθήκες ψύξης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η *L.monocytogenes* στο τυρί παρέμειναν ζωντανά κύτταρα του μικροοργανισμού, ανεξάρτητα από τις συνθήκες ψύξης που επικρατούσαν. Η άμεση τεχνική επιφθορίζοντος φίλτρου (DEFT) έδειξε ότι μπορεί να είναι αποδοτικότερη και αποτελεσματικότερη από τη συμβατική μέθοδο μέτρησης των καλλιεργειών για την ανίχνευση της βιωσιμότητας των ψυχρότροφων βακτηρίων (Olszewska et al., 2015).

### 4.3 Μέθοδος κυτταρομετρίας ροής (FCM)

Αρχή της μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής (Flow cytometry method - FCM) είναι ότι σημασμένα κύτταρα (αντισώματα κάνουν σύζευξη με φθορίζουσες χρωστικές ουσίες και προσδένονται σε πρωτεϊνικά μόρια που βρίσκονται είτε στην κυτταρική μεμβράνη είτε εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου) είναι διαλυμένα και αιωρούνται σε ένα υγρό που ρέει. Καθώς εκτίθενται σε μία πηγή φωτός, διεγείρονται και κατά την αποδιέγερση εκπέμπεται ακτινοβολία η οποία ανιχνεύεται και μετρείται από μία ηλεκτρονική συσκευή ανίχνευσης (εικόνα 4). Πολλοί μικροοργανισμοί αλλοίωσης, όπως οι ψυχρότροφοι, έχουν ανιχνευθεί με τη μέθοδο αυτή. Αν οι φθορίζουσες χρωστικές ουσίες με τις οποίες έχουν σηματοδοτηθεί τα κύτταρα περισσότερες από μία τότε η έκθεση στην ίδια ακτινοβολία προκαλεί την εκπομπή ακτινοβολιών με διάφορα μήκη κύματος, γεγονός που επιτρέπει τη λήψη δεδομένων και για ένα συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών ιδιοτήτων (Wei et al., 2019).



Εικόνα 4: Συσκευή κυτταρομετρίας ροής

Πηγή: [https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/BIO286/Rosmaraki/MEAB%202020\\_rosmaraki.pdf](https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/BIO286/Rosmaraki/MEAB%202020_rosmaraki.pdf) [12/01/2023]

Οι Cronin & Wilkinson (2009) κατάφεραν να ανιχνεύσουν με τη μέθοδο κυτταρομετρίας ροής (FCM) το *Bacillus cereus* σε μαγειρεμένο ρύζι το οποίο παρέμεινε μετά το μαγείρεμα σε θερμοκρασία 10°C για διάστημα 6 ημερών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ανάπτυξη  $1,0 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> του μικροοργανισμού. Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι εκτός από την κυτταρική καταμέτρηση λαμβάνονται δεδομένα για την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης, τις οξειδοαναγωγικές ή ενδοκυτταρικές δραστηριότητες που τα κύτταρα των μικροοργανισμών πραγματοποιούν με την πάροδο του χρόνου καθώς επωάζονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Cronin & Wilkinson, 2009). Οι Williams et al. (2017) εφάρμοσαν την μέθοδο κυτταρομετρίας ροής σε δείγματα ωμού σπανακιού για τον προσδιορισμό του *Escherichia coli* O157 : H7. Σκοπός ήταν ο έλεγχος της ευαισθησίας και της ακρίβειας της μεθόδου, καθώς η κατανάλωση 10 κυττάρων *Escherichia coli* αποτελεί την ελάχιστη μολυσματική δόση για τον άνθρωπο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος κυτταρομετρίας ροής (FCM) που εφαρμόστηκε είχε μεγαλύτερη ευαισθησία από την παραδοσιακή τεχνική μέτρησης των πλακών και ήταν πιο γρήγορη. Μέσα σε χρονικό διάστημα 9 ωρών πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε 25 δείγματα για την ανίχνευση ενός κυττάρου στόχου (Williams et al., 2017).

#### 4.4 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain Reaction -PCR) είναι ένα μοριακό διαγνωστικό εργαλείο ικανό να μειώσει σημαντικά τον χρόνο που απαιτείται για την ανίχνευση και τον έλεγχο των τροφίμων για αλλοιογόνα ή/και παθογόνα βακτήρια (Pennacchia et al., 2009).

Μία πιο καινοτόμος εφαρμογή είναι η PCR πραγματικού χρόνου αντιπροσωπεύει μια καινοτόμο τεχνική ικανή να επιτρέπει την ακριβή και ξεκάθαρη ταυτοποίηση των μικροοργανισμών και τον ποσοτικό προσδιορισμό των νουκλεϊκών οξέων τους, αποφεύγοντας τα βήματα μετά την PCR με κινδύνους διασταυρούμενης μόλυνσης. Η PCR πραγματικού χρόνου (RTi-PCR) θα μπορούσε να προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα για την απαρίθμηση βακτηρίων απευθείας από δείγματα

τροφίμων και χρησιμοποιείται ευρέως στη μικροβιολογία τροφίμων (Pennacchia et al., 2009).

Η RTi-PCR έχει χρησιμοποιηθεί σε τρόφιμα για την ανίχνευση και μερικές φορές για τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλών παθογόνων βακτηρίων όπως *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium tyrobutyricum* και *Yersinia enterocolerseaica*. Δεν λαμβάνει υπόψη τη σύνθετη μικροχλωρίδα που συχνά μολύνει τις ωμές τροφές που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν την ανίχνευση του βακτηρίου-στόχου (Pennacchia et al., 2009).

Οι Ranieri et al. (2012) εφάρμοσαν τη μέθοδο RTi-PCR σε δείγματα νωπού γάλακτος εμβολιασμένα με *Paenibacillus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πρόκειται για μία μέθοδο ταχεία που παρουσιάζει ακρίβεια, εξειδίκευση και όριο ανίχνευσης, ίσο με  $3,25 \times 10^1$  CFU / mL, κατάλληλη για την ανίχνευση ψυχροτρόφων βακτηρίων σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα (Ranieri et al., 2012).

Οι Wang et al. (2018) ανέπτυξαν μία νέα τεχνική για την ανίχνευση των κυττάρων της *Salmonella*, η οποία συνδυάζει την ποσοτική PCR με τη μέθοδο των ανοσομαγνητικών σφαιριδίων (IMBs-qPCR). Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα γάλακτος και χοιρινού κρέατος. Αποδείχτηκε μία τεχνική με καλή εξειδίκευση, ακρίβεια και ευαισθησία όπου το όριο ανίχνευσης ήταν 18 CFU / mL. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα θεωρείται μία μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί στην ανίχνευση των ψυχρότροφων βακτηρίων (Wang et al., 2018).

#### 4.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (PCR-ELISA)

Η PCR μπορεί να συνδυαστεί με ELISA για να επιτευχθεί η ανίχνευση βακτηρίων στα τρόφιμα. Αυτή η πολύπλοκη τεχνική είναι πιο ευαίσθητη από τη δοκιμασία PCR μόνη της. Η PCR-ELISA περιλαμβάνει άμεση ανάμιξη σημασμένων νουκλεοτιδίων (labeled nucleotides) στον ενισχυτή (amplifier) κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης PCR. Γενικά, η μέθοδος PCR-ELISA χρησιμοποιεί δύο επισημασμένους εκκινητές (labeled primers): ο ένας είναι επισημασμένος με βιοτίνη και ο άλλος με διγοξigenίνη (Wei et al., 2019). Επί του παρόντος, η PCR-ELISA χρησιμοποιείται

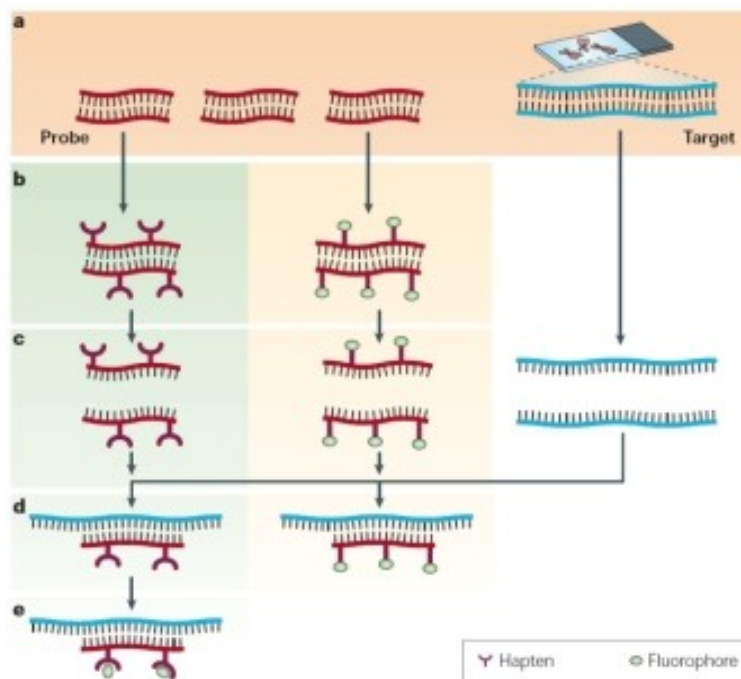


ευρέως στη μικροβιολογία και πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στους ψυχροτρόφους μικροοργανισμούς (Delhalle et al., 2016)

Οι Hu et al. (2018) ανέπτυξαν μια μέθοδο διπλού προσδιορισμού (duplex) PCR-ELISA με σκοπό να μπορέσουν να επιτύχουν την ταυτόχρονη ανίχνευση της *Salmonella spp.* και του *Escherichia coli* O157: H7 σε τρόφιμα (γάλα, χυμό, λάχανο, γαρίδες, κοτόπουλο, χοιρινό και βοδινό). Παρατήρησαν ότι πρόκειται για μία τεχνική που είναι βολικότερη από την PCR-ELISA η οποία έχει χρησιμοποιηθεί στην ανίχνευση μεμονωμένων παθογόνων μικροοργανισμών όπως η *Salmonella spp.* Επίσης, η διπλού προσδιορισμού (duplex) PCR-ELISA παρουσίασε εξειδίκευση και μεγαλύτερη ευαισθησία της διπλής PCR περίπου  $10^3$  φορές. Πρόκειται για μία διαδικασία ανίχνευσης που φαίνεται ότι μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία στη βιομηχανία τροφίμων για την ανίχνευση βακτηρίων και την παρακολούθηση της υγιεινής των τροφίμων, αλλά και σε κλινική διάγνωση τροφιμογενών νοσημάτων (Hu et al., 2018)

#### 4.6 Τεχνική φθορίζοντος in situ υβριδισμού (FISH)

Η μέθοδος φθορίζοντος in situ υβριδισμού (Fluorescence in situ hybridization - FISH) χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση βακτηρίων και ουσιαστικά αποτελεί έναν επιτυχή συνδυασμό της απλότητας της παρατήρησης με μικροσκόπιο και της εξειδίκευσης του υβριδισμού DNA/rRNA. Η τεχνική FISH χρησιμοποιεί ορισμένες φθορίζουσες χρωστικές ουσίες που ενσωματώνονται με ορισμένα ολιγονουκλεοτίδια και τα οποία λειτουργούν ως ανιχνευτές. Στη συνέχεια, τα σημασμένα αυτά ολιγονουκλεοτίδια συνδέονται ειδικά με την αλληλουχία-στόχο στο τμήμα, σε συγκεκριμένες περιοχές των ριβοσωμάτων των βακτηριακών κυττάρων. Από την ανίχνευση του σήματος φθορισμού μπορούν να προσδιορισθούν ποιοτικά και ποσοτικά συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Δεν είναι απαραίτητο για τη μεθοδολογία αυτή να πραγματοποιηθεί εκχύλιση ή ενίσχυση του μορίου του νουκλεϊκού οξέος (Machado et al., 2013).



Εικόνα 5: Στάδια μεθόδου φθορίζοντος in situ υβριδισμού

Πηγή: O'Connor, 2008

Οι Zadernowska et al. (2014) ανίχνευσαν *Salmonella* spp. σε δείγματα βοείου και χοιρινού κρέατος καθώς και σε κρέας πουλερικών ακολουθώντας τη μέθοδο υβριδισμού in situ φθορισμού (FISH). Η σχετική ευαισθησία της μεθόδου για τα τρία είδη κρέατος έφθασε τα 100%, 100% και 99,4%, αντίστοιχα. Με σκοπό να ανιχνεύσουν ορισμένα εξαιρετικά παθογόνα βακτήρια (*Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* και *Y. Pestis*) οι Rohde et al. (2017) ανέπτυξαν μία μέθοδο φθορίζοντος in situ υβριδισμού (FISH) η οποία αποτέλεσε μία γρήγορη, ευαίσθητη και άμεση εναλλακτική ανάλυση των βιώσιμων κυττάρων των μικροοργανισμών. Η ευαισθησία της συγκεκριμένης μεθόδου έφθασε για την ανίχνευση *Yersinia* spp., το 1 CFU/g σε χοιρινό κρέας μέσα σε μια μέρα (Rohde et al., 2017).

Είναι μία γρήγορη και εξειδικευμένη δοκιμή που μπορεί να ολοκληρωθεί σε λίγες ώρες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ελέγξει την παρουσία ή την απουσία συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA ή/και RNA, άρα να ελέγξει την παρουσία ή την απουσία συγκεκριμένων βακτηρίων (Machado et al., 2013).

#### 4.7 Ηλεκτροφόρηση γέλης προσωρινής κλίσης θερμοκρασίας (TTGE)

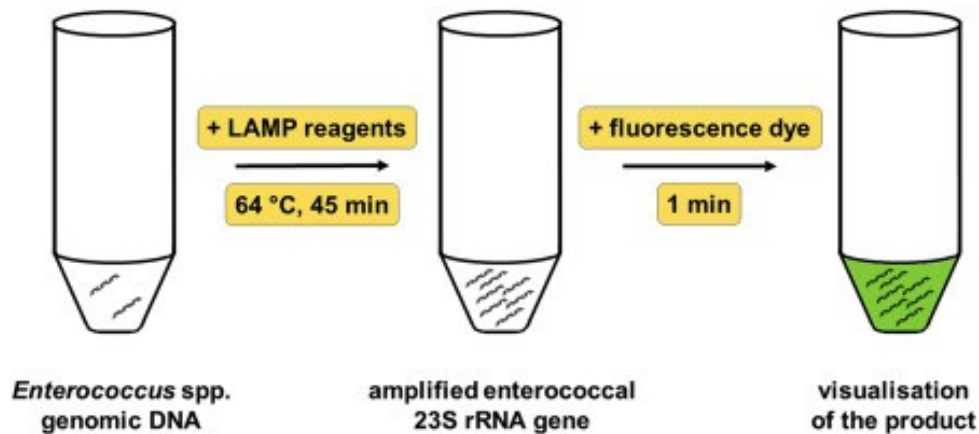
Η ηλεκτροφόρηση γέλης με διαβάθμιση θερμοκρασίας (Temporal temperature gradient gel electrophoresis - TTGE) διαχωρίζει και διακρίνει τη λεπτότητα των θραυσμάτων DNA. Αυτή η προσέγγιση τυπικά περιλαμβάνει την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA), την ενίσχυση γονιδίων που κωδικοποιούν το 16S rRNA και την ανάλυση προϊόντων PCR χρησιμοποιώντας τη μέθοδο γενετικής δακτυλικών αποτυπωμάτων. Εφόσον το δίκλωνο DNA στο τροποποιημένο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου λιώνει σταδιακά καθώς αλλάζει το περιβάλλον μετουσίωσης, όταν επιτευχθεί η ελάχιστη θερμοκρασία τήξης, το δίκλωνο DNA τήκεται μερικώς και η τήξη μειώνεται λόγω της αύξησης της αντίστασης κατά την ηλεκτροφόρηση. Η θερμοκρασία τήξης ποικίλλει ανάλογα με την αλληλουχία του DNA και η θερμοκρασία τήξης αλλάζει όταν υπάρχει μία αλλαγή βάσης στην αλληλουχία. Επομένως, ο χρόνος τήξης του DNA και η ταχύτητα μετανάστευσης είναι διαφορετικοί. Επιπλέον, ως ένας αποτελεσματικός τρόπος για την απομόνωση DNA, RNA ή πρωτεϊνών, το TTGE είναι επίσης μια μέθοδος ανίχνευσης ψυχρόφιλων μικροοργανισμών (Wei et al., 2019).

Οι Ogier et al. (2002) εφάρμοσαν την ηλεκτροφόρηση γέλης με διαβάθμιση θερμοκρασίας (TTGE) ώστε να ανιχνεύσουν διαφορετικά είδη βακτηρίων που βρίσκονται σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως περιλαμβάνει *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* και *Staphylococcus*. Με τη μέθοδο αυτή διαχωρίζονται θραύσματα ριβοσωμικού DNA (16S rDNA) με τη βοήθεια διαβαθμισμένης θερμοκρασίας. Αρχικά δημιουργήθηκε μία βάση δεδομένων των ειδών με τη βοήθεια πολλαπλών στελεχών ελέγχου, τα οποία λειτούργησαν ως δακτυλικά αποτυπώματα για κάθε στέλεχος. Η δημιουργία της βάσης των δεδομένων είναι και το μεγαλύτερο μειονέκτημα της μεθόδου (Ogier et al., 2002).

#### 4.8 Ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (LAMP)

Η ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (Loop-mediated isothermal amplification - LAMP) είναι μια μοριακή μέθοδο η οποία βασίζεται στην ενίσχυση του νουκλεϊκού οξέος υπό ισοθερμικές συνθήκες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της παρουσίας μικροοργανισμών, όπως *Escherichia coli*, *Salmonella* και *Vibrio parahaemolyticus*. Το LAMP ενισχύει την αλληλουχία DNA-στόχο στη θερμοκρασία 60 - 65°C με τη βοήθεια δύο ή τριών ομάδων εκκινητών και πολυμεράσης με υψηλή δραστηριότητα μετατόπισης κλώνου. Τυπικά, το LAMP έχει

υψηλή ειδικότητα επειδή χρησιμοποιούνται 4 διαφορετικοί εκκινητές για τον εντοπισμό 6 διακριτών περιοχών στο γονίδιο-στόχο (Niessen et al., 2013). Με τη βοήθεια μίας χρωστικής ουσίας φθορισμού η παρουσία των μικροοργανισμών μπορεί να οπτικοποιηθεί μέσα σε 1 min (εικόνα 6) (Martzy et al., 2017).



Εικόνα 6: Ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (LAMB)

Πηγή: Martzy et al., 2017

Οι Tirloni et al., (2017), εφάρμοσαν την ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (LAMB) για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes*, με ιδιαίτερη έμφαση στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν 42 συνολικά δείγματα από παστεριωμένο γάλα, γαλακτοκομικά προϊόντα (φρέσκια ρικότα, κρεσέντζα, μασκαρπόνε, μοτσαρέλα, τυρί cottage, τυρί κρέμα, ταλέγιο, γκοργκοντζόλα) και θαλασσινά, εκ των οποίων τα 32 ήταν μολυσμένα. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο ανιχνεύθηκαν 32 στα 32 μολυσμένα δείγματα. Τα όρια ανίχνευσης της συσκευής κυμαίνονται από 10-400 CFU. g<sup>-1</sup> (Tironi et al., 2017). Το 2010, οι Wang et al., χρησιμοποίησαν επίσης τη μέθοδο LAMP για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* στο νωπό γάλα. Το κατώτερο όριο ανίχνευσης ήταν 186 CFU / mL. Πρόκειται για μία τιμή σημαντικά χαμηλότερη από το κατώτερο όριο ανίχνευση συμβατικής PCR το οποίο έχει διαμορφωθεί στα 1,86 × 10<sup>5</sup> CFU / mL (Wang et al., 2010). Η ευαισθησία, η ακρίβεια και η ειδικότητα της τεχνικής LAMP σε πραγματικό χρόνο προσδιορίστηκε 94,02, 90,83 και 86,79, αντίστοιχα (Arunrut et al., 2018).

Η ανάλυση LAMP θεωρείται ότι μπορεί να εφαρμοστεί για την ανίχνευση ψυχρότροφων βακτηρίων με επιτυχία, καθώς τα μέχρι τώρα επιστημονικά δεδομένα δείχνουν μία μέθοδο απλή στον χειρισμό, με ταχύτητα και ευαισθησία. Επίσης, συγκριτικά με άλλες μεθόδους ανάλυσης, όπως για παράδειγμα με την τεχνική PCR,

πλεονεκτεί καθώς δεν έχει απαιτήσεις για ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό (Wei et al., 2019).

## 5. ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΨΥΧΡΟΤΡΟΦΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

### 5.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Γενικά, τα ψυχρότροφα βακτήρια μπορεί να προκαλέσουν επιβλαβείς καταστάσεις για την υγεία, όπως σήψη, διάρροια, μηνιγγίτιδα, δυσεντερία, τροφική δηλητηρίαση, ουρολοιμώξεις και γαστρεντερικές λοιμώξεις. Σύμφωνα με μελέτες, τα άτομα που έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να εκτεθούν σε αυτά τα επιβλαβή βακτήρια είναι έγκυες, νεογέννητα, ανοσοκατεσταλμένα και έχουν προϋπάρχουσα υγεία. Έτσι, η παρουσία τους στα τρόφιμα δημιουργεί μεγάλο κίνδυνο καθώς οδηγούν σε τροφική δηλητηρίαση και αλλοίωση των τροφίμων (Salem et al., 2018).

Το γένος *Pseudomonas* περιλαμβάνει περισσότερα από 140 είδη, αλλά μόνο ένα από αυτά τα είδη το *Pseudomonas aeruginosa* είναι παθογόνο για τον άνθρωπο, ιδιαίτερα για τα νεογέννητα. Προκαλεί γαστρεντερικές διαταραχές καθώς και ουρολοιμώξεις, εγκαύματα και οφθαλμικές λοιμώξεις. Οι λοιμώξεις από το είδος *Pseudomonas* γενικεύονται σε ανοσοκατασταλτικά άτομα (Salem et al., 2018).

Στον άνθρωπο, τα είδη *Aeromonas* συμπεριλαμβανομένων των *A. hydrophila*, *A. caviae* και *A. veronii* βιοτύπου *sobria* προκάλεσαν γαστρεντερικές και εξωεντερικές λοιμώξεις. Ειδικά, το *A. hydrophila* προκαλεί σηψαιμία, αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, μηνιγγίτιδα, περιτονίτιδα, πληγές και αναπνευστικές παθήσεις (Salem et al., 2018).

### 5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* spp. μπορούν να εντοπισθούν στο έδαφος, το νερό ακόμη και τη θάλασσα. Εκτός από τρόφιμα μπορούν να ανιχνευθούν ακόμη και πάνω σε κλινικά εργαλεία, σε καλλυντικά, ασηπτικά διαλύματα ή ιατρικά σκευάσματα. Έχουν αλλοιογόνο δράση και προκαλούν προβλήματα στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά και στο σύνολο της τροφικής αλυσίδας. Τα νωπά προϊόντα μπορούν να προσβληθούν οποιαδήποτε στιγμή από *Pseudomonas* spp, ακόμη και αν βρίσκονται αποθηκευμένα σε συνθήκες ψύξης, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται σημαντική μείωση της διάρκειας ζωής του τροφίμου και οι βιομηχανίες να επιβαρύνονται οικονομικά (Quintieri et al., 2020).

Παραδείγματα τροφίμων που μπορούν να αλλοιωθούν από την παρουσία των *Pseudomonas* spp είναι γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, κρέας, ψάρι, νερό, φρούτα και λαχανικά. Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp. αν και είναι από τους πιο συνηθισμένους ψυχροτρόφους μικροοργανισμούς που προκαλούν αλλοίωση στα τρόφιμα, δεν αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Ωστόσο, το πιο παθογόνο *Pseudomonas aeruginosa* ανήκει στην ομάδα κινδύνου II και είναι ευκαιριακό παθογόνο και ένα από τα κύρια βακτήρια που προκαλούν νοσοκομειακές λοιμώξεις στα νοσοκομεία που προσβάλλουν άτομα με ανοσοκαταστολή (Raposo et al., 2016).

Πρόκειται για ένα Gram – αρνητικό βακτήριο, ραβδόμορφο (0,5–0,8 × 1,5–8 μm), το οποίο φέρει πολικά μαστίγια που επιτρέπουν την κίνηση του (εικόνα 7) και μπορεί να εμφανιστεί μεμονωμένα, σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες (Wu et al., 2015)



Εικόνα 7: *Pseudomonas aeruginosa*

Πηγή: CDC, 2019

Ορισμένες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια, **στο** *Pseudomonas aeruginosa* έχουν εντοπίσει ένα νέο κίνδυνο, που αφορά την υγεία των καταναλωτών. Παρατηρήθηκε ότι τα βακτήρια το *Pseudomonas aeruginosa* μπορούν να αποικίσουν ιστούς των οργάνων ανοσοκατεσταλμένων ασθενών και να σχηματίσουν ένα βιοφίλμ που είναι ανθεκτικό, καθώς ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός παρουσιάζει αντοχή και έναντι των αντιβιοτικών (Quintieri et al., 2020).

Το 2017, το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* εκτιμάται ότι είναι υπεύθυνο για περίπου 32.600 λοιμώξεις σε νοσηλευόμενους ασθενείς και εκτιμάται ότι οι θάνατοι που οφείλονταν σε αυτό το βακτήριο έφθασαν τους 2.700 στις Ηνωμένες Πολιτείες. Τα άτομα που κινδυνεύουν περισσότερο είναι ασθενείς που φιλοξενούνται ήδη σε νοσοκομείο και είτε είναι συνδεδεμένοι με σύστημα υποστήριξης αναπνοής είτε έχουν καθετήρα είτε φέρουν πληγές από χειρουργική επέμβαση εγκαύματα (CDC. 2019).

### 5.3 *Escherichia coli*

Πολλές τροφιμογενείς επιδημίες που προκαλούνται από το *Escherichia coli* O157:H7 σχετίζονται με λαχανικά και φρούτα ως αποτέλεσμα μόλυνσης με κόπρανα από οικόσιτα ή άγρια ζώα σε κάποια φάση κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας ή του χειρισμού. Η μετάδοση στον άνθρωπο μπορεί να συμβεί μέσω της επαφής ή της κατανάλωσης μολυσμένων ωμών τροφών, γάλακτος ή νερού. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, οι ρυθμιστικές αρχές, οι παραγωγοί τροφίμων, οι έμποροι λιανικής και οι διανομείς χρειάζονται αποτελεσματικές μικροβιολογικές δοκιμές για σκοπούς ποιοτικού ελέγχου. Οι κύριες απαιτήσεις είναι για ευαίσθητα, συγκεκριμένα και γρήγορα αποτελέσματα (Williams et al., 2017).

Τα περισσότερα στελέχη *E. coli* είναι αβλαβή για τον ξενιστή, αλλά αυτά που παράγουν τοξίνες τύπου Shiga προκαλούν διάρροια και άλλες σημαντικές ασθένειες στον άνθρωπο. Το *E. coli* O157:H7, σχεδόν όλα τα στελέχη του οποίου παράγουν τοξίνες τύπου Shiga, είναι ο ορότυπος που σχετίζεται συχνότερα με παθογένεια και εμπλέκεται σε πολλές περιπτώσεις τροφιμογενών ασθενειών στις Ηνωμένες Πολιτείες. Αυτός ο οργανισμός μπορεί να προκαλέσει έως και 50% θνησιμότητα στους ηλικιωμένους και νεφρική ανεπάρκεια στα παιδιά. Υπολογίζεται ότι η κατάποση μόνο 10-100 κυττάρων *E. coli* O157:H7 μπορεί να προκαλέσει τροφιμογενείς ασθένειες και άτομα με ανώριμο ή εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να είναι πιο ευαίσθητα σε χαμηλού επιπέδου μόλυνση. Επομένως, η ανίχνευση μολυσματικών ουσιών πολύ χαμηλού επιπέδου είναι σημαντική (Williams et al., 2017).

### 5.4 Λιστερίωση



Η λιστερίωση είναι μια σχετικά σπάνια τροφιμογενής νόσος με περισσότερα από 2536 επιβεβαιωμένα κρούσματα στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 2016, εκ των οποίων τα 962 νοσηλεύτηκαν, ενώ αναφέρθηκαν και 247 θάνατοι. Η *L. monocytogenes* είναι ένας μικροοργανισμός που προκαλεί ιδιαίτερη ανησυχία λόγω της υψηλής θνησιμότητας (15-18%) και των ποσοστών νοσηλείας (97-99%), σε σύγκριση με άλλα μικροβιακά παθογόνα. Επιπλέον, ο μικροοργανισμός είναι ευρέως κατανομημένος στις μονάδες επεξεργασίας τροφίμων και έχει την ιδιαιτερότητα να αναπτύσσεται σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών (από 0 έως 45°C) και να ανθίσταται σε πολλές περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως υψηλή αλατότητα ή οξύτητα. Η RTE (συμπεριλαμβανομένων των γαλακτοκομικών προϊόντων) αποδείχθηκε ότι τα τελευταία χρόνια συχνά σχετίζεται με κρούσματα και σποραδικές περιπτώσεις λιστερίωσης (EFSA, 2017).

Μεταξύ των γαλακτοκομικών προϊόντων, τα φρέσκα τυριά αποτελούν κατάλληλα μέσα ανάπτυξης για αρκετά αλλοιωμένα και παθογόνα βακτήρια και έχουν συσχετιστεί παγκοσμίως με τροφιμογενή μικροβιακά ξεσπάσματα, με σημαντικό ρόλο του *L. monocytogenes*. Οι λοιμώξεις μπορεί να είναι σοβαρές ή θανατηφόρες για τους καταναλωτές. Επιπλέον, η παρουσία του παθογόνου θα μπορούσε να έχει σοβαρό αρνητικό αντίκτυπο στον κύκλο εργασιών της γαλακτοβιομηχανίας όσον αφορά τις οικονομικές απώλειες και την αρνητική διαφήμιση. Το *L. monocytogenes* μπορεί να υπάρχει πιθανότατα στις πρώτες ύλες (όπως το νωπό γάλα), αλλά μπορεί να εισέλθει στην αλυσίδα παραγωγής κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ή να μολύνει το τελικό προϊόν κατά την ωρίμανση, λόγω μεταμόλυνσεων ή συμβάντων διασταυρούμενης μόλυνσης. Επιπλέον, το *L. monocytogenes* συχνά απομονώνεται από περιβάλλον τυροκομίας όπως δάπεδα, αποχετεύσεις και εξοπλισμός. Επιπλέον, αυτό το παθογόνο επιμένει για πολλά χρόνια σε αρκετές θέσεις στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας γαλακτοκομικών προϊόντων (Tirloni et al., 2017).

## 5.5 *Aeromonas*

Το γένος βακτηρίων *Aeromonas* spp. και ιδιαίτερα τα στελέχη *Aeromonas sobria* και το *Aeromonas hydrophila* έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση γαστρεντερίτιδας, η οποία επηρεάζει βρέφη (0-2 ετών) και ηλικιωμένα άτομα (άνω των 60) κατά την καλοκαιρινή περίοδο (Kirov et al., 1990).

Ο παροδικός αποικισμός του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα από *Aeromonas* είναι πιθανότατα έμμεσο αποτέλεσμα της κατανάλωσης τροφίμων και πόσιμου νερού που περιέχουν *Aeromonas* spp. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα βακτήρια *Aeromonas*, εντοπίζονται στα περισσότερα τρόφιμα, ανεξάρτητα τη γεωγραφική προέλευση. Σε μία παλιότερη έρευνα των Palumbo et al. (1985) διαπιστώθηκε η ύπαρξη βακτηρίων *Aeromonas* σε παγκόσμια επίπεδο σε όσα τρόφιμα υποβλήθηκαν σε δοκιμές όπως είναι τα θαλασσινά, το νωπό γάλα, το νωπό κρέας κοτόπουλου, αλλά και τα κρέατα αρνιού, μοσχαριού, χοιρινού αλλά και κιμάς. Αρχικά, ο πληθυσμός των βακτηρίων κυμαινόταν από  $10^2$  έως  $10^5$  CFU/g στους  $5^\circ\text{C}$ , αλλά μετά από μία εβδομάδα παραμονής των δειγμάτων σε συνθήκες ψύξη ( $5^\circ\text{C}$ ), παρατηρήθηκε ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Palumbo et al., 1985). Ακολούθησαν πολυάριθμες μελέτες τις τελευταίες δεκαετίες που επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας.

Τα βακτήρια του γένους *Aeromonas* είναι υπεύθυνα για ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων λοιμώξεων. Περιλαμβάνουν εντερικές ασθένειες, αλλά και άλλες λοιμώξεις και σύνδρομα, τα οποία μπορεί να έχουν από ήπια συμπτωματολογία, όπως μία οξεία γαστρεντερίτιδα, μέχρι ακραίες, απειλητικές για τη ζωή καταστάσεις που είναι απειλητικές για την ανθρώπινη ζωή, όπως σηψαιμία, νεκρωτική απονευρωσίτιδα και μυνέκρωση. Μία διάκριση των κλινικών λοιμώξεων που σχετίζονται με *Aeromonas* είναι (Janda & Abbott, 2010):

- Σύνδρομα γαστρεντερικού σωλήνα
- Λοιμώξεις τραυμάτων και μαλακών ιστών
- Πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες
- Διάφορες παθήσεις που εμφανίζονται σπανιότερα, όπως ορισμένες οφθαλμικές παθήσεις, λοιμώξεις των οστών και των αρθρώσεων, αναπνευστικές και ουρογεννητικές λοιμώξεις.

Το γένος *Aeromonas* αποτελείται σήμερα από 36 είδη, εκ των οποίων το *Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas dhakensis*, *Aeromonas veronii biovar sobria* (πρώην *Aeromonas sobria*) και *Aeromonas trota* είναι κλινικά πιο σημαντικά και έχουν απομονωθεί συχνά από ανθρώπινα κόπρανα. Τα στελέχη του *Aeromonas* διαθέτουν ένα ποικίλο και ετερογενές φάσμα λοιμογόνων παραγόντων, οι οποίοι ενισχύουν την ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλώνται, να αποικίζουν και να εισβάλουν στα κύτταρα των ξενιστών (Greiner et al., 2021). Για

τη διάδοση των παραγόντων λοιμογόνου δράσης, τα *Aeromonas* έχουν τέσσερις τύπους συστημάτων έκκρισης, υπεύθυνα για την απελευθέρωση αυτών των κυτταρικών προϊόντων στο εξωκυτταρικό περιβάλλον ή ακόμα και απευθείας στο κύτταρο ξενιστή (Pessoa et al., 2019). Παράδειγμα λοιμογόνου παράγοντα αποτελεί η κυτταροτοξική εντεροτοξίνη (πρωτεΐνη Act), η οποία έχει αιμολυτική, κυτταροτοξική και εντεροτοξική δράση. Οι εντεροτοξίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της διάρροιας και η επίδρασή τους είναι αναπαραγώγιμη σε ζωικά μοντέλα Έχουν περιγραφεί επίσης δύο κυτταροτονικές εντεροτοξίνες, μια θερμοσταθερή (πρωτεΐνη Ast) και μια ασταθής στη θερμότητα εντεροτοξίνη (πρωτεΐνη Alt). Η παρουσία κυτταροτονικών εντεροτοξινών Ast και Alt στο *Aeromonas* spp. συσχετίστηκαν με σοβαρή διάρροια στα παιδιά, ωστόσο, αυτές οι τοξίνες βρέθηκαν επίσης σε περιβαλλοντικά στελέχη (Greiner et al., 2021).

## 6. ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΨΥΧΡΟΤΡΟΦΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

### 6.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Οι καταναλωτές τα τελευταία χρόνια έχουν υψηλές απαιτήσεις από τη βιομηχανία τροφίμων. Απαιτούν και αναζητούν τρόφιμα ασφαλή και ποιοτικά, τα οποία όμως έχουν υποβληθεί στην ελάχιστη απαιτούμενη επεξεργασία. Αναζητούν τρόφιμα που έχουν μικροβιακή σταθερότητα χωρίς όμως την έκθεση του τροφίμου σε ακραίες συνθήκες, όπως υψηλή θερμοκρασία ή εφαρμογή χημικών πρόσθετων συστατικών (Silva et al., 2018). Έχουν, λοιπόν, αναζητηθεί και εφαρμοστεί πολυάριθμες τεχνολογίες που στοχεύουν στη συντήρηση των τροφίμων, δηλαδή στην παράταση της διάρκειας ζωής τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στην αποθήκη, στο ράφι ή/και στο σπίτι του καταναλωτή. Μπορούν να εφαρμοστούν είτε μεμονωμένα είτε συνδυαστικά. Παραδείγματα των καινοτόμων τεχνολογιών είναι η επεξεργασία υψηλής πίεσης, η εφαρμογή ιοντίζουσας ακτινοβολίας, η εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών με ή και χωρίς ενσωμάτωση ορισμένων φυσικών συντηρητικών και αντιοξειδωτικών ουσιών. Οι συνθήκες συντήρησης των τροφίμων και ο τύπος του προϊόντος επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης και τη σύνθεση της αλλοιογόνου μικροχλωρίδας κατά την αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες (Pennacchia et al., 2009)

### 6.2 Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Η συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Modified atmosphere packaging - MAP) είναι μια μέθοδος συντήρησης των τροφίμων που έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον της βιομηχανίας τροφίμων, καθώς δεν απαιτεί την έκθεση του τροφίμου σε υψηλές θερμοκρασίες. Η τροποποιημένη ατμόσφαιρα της συσκευασίας αποτελείται από μίγματα κυρίως οξυγόνου, αζώτου, διοξειδίου του άνθρακα, χωρίς να αποκλείεται η χρήση άλλων αερίων όπως το αργό. Το άζωτο, αποτρέπει η οξειδωση και το τάγγισμα, ενώ προκαλείται αναστολή στην ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών λόγω έλλειψης οξυγόνου, ενώ το διοξείδιο του άνθρακα προστίθεται ως ο κύριος αντιμικροβιακός παράγοντας (Silva et al., 2018).

Οι Silva et al. (2018) σε βιβλιογραφική ανασκόπηση που πραγματοποίησαν διαπίστωσαν η αυξημένη συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) επηρεάζει τη ανάπτυξη των μικροοργανισμών που βρίσκονται στη σάρκα των πουλερικών, αυξάνοντας τον χρόνο που διαρκεί η φάση υστέρησης (lag phase), άρα καθυστερώντας ουσιαστικά την έναρξη της εκθετικής φάσης, όπου είναι το στάδιο με την ταχύτερη αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού. Η διάρκεια της καταλληλότητας της κατανάλωσης του κοτόπουλου, σύμφωνα με τα επιστημονικά δεδομένα που εντόπισαν, αυξήθηκε από 5 σε 14 ημέρες, δηλαδή σχεδόν τριπλασιάστηκε (Silva et al., 2018).

Οι Munsch-Alatossava et al. (2010) αξιολόγησαν την επίδραση του αερίου αζώτου (N<sub>2</sub>) στην ανάπτυξη των ψυχροτρόφων βακτηρίων σε γάλα το οποίο αποθηκεύεται σε συνθήκες ψύξης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ανασταλτική επίδραση του N<sub>2</sub> στην ανάπτυξη των ψυχροτροφικών βακτηρίων και των αντίστοιχων μεταβολικών τους ενζύμων στο νωπό γάλα, αποδεικνύοντας ότι η ανάπτυξη των ψυχροτροφικών βακτηρίων στο γάλα θα μπορούσε να ανασταλεί αποτελεσματικά στους 6°C σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Munsch-Alatossava et al., 2010).

Οι Sanchís et al. (2016) σε μελέτη που πραγματοποίησαν αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα δύο μεθόδων συντήρησης των τροφίμων που εφαρμόστηκαν ταυτόχρονα σε φρέσκο κομμένο λωτό. Έτσι, προχώρησαν στην εφαρμογή εδώδιμης μεμβράνης πηκτίνης, η οποία ενισχύθηκε με νιασίνη (αντιμικροβιακός παράγοντας), αλλά και στη συσκευασία του κομμένου λωτού σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) με χαμηλή συγκέντρωση σε οξυγόνο. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της εκπομπής CO<sub>2</sub> και της κατανάλωσης O<sub>2</sub> στη συσκευασία, ενώ η ενισχυμένη με αντιμικροβιακό παράγοντα επίστρωση οδήγησε σε μείωση των βακτηριακών πληθυσμών *E. coli*, *Salmonella enteritidis* και *Listeria monocytogenes*. Οργανοληπτικά, οι φέτες λωτού έμειναν ποιοτικά σταθεροί για περισσότερες από 9 ημέρες (Sanchís et al., 2016).

Οι Fraqueza & Barreto (2009) αξιολόγησαν την επίδραση ενός μίγματος αερίου με αργό (Ar), το οποίο ανήκει στα αδρανή ή ευγενή αέρια, στην ανάπτυξη της μικροχλωρίδας κρέας γαλοπούλας χωρίς οστά ή δέρμα, αποθηκευμένο στους 0°C. Συσκέυασαν τα δείγματα σε αερόβιες συνθήκες, και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (100% N<sub>2</sub>, 50% Ar-50% N<sub>2</sub>, 50% Ar -50% CO<sub>2</sub>, και 50% N<sub>2</sub>-50% CO<sub>2</sub>) τα οποία παρέμειναν στο σκοτάδι για 12 – 25 ημέρες. Παρατηρήθηκε ότι η ανάπτυξη

των ψυχοτροφικών οργανισμών καθυστέρησε στις συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας και η προσθήκη του αργού (Ar) στο μείγμα των αερίων προκάλεσε μικρή προστατευτική επίδραση ειδικά μαζί με το διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) (Fraqueza & Barreto, 2009)

Αν και η συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα είναι μία αποτελεσματική μέθοδος για την αποφυγή ανάπτυξης ψυχοτρόφων βακτηρίων απαιτούνται περαιτέρω μελέτες ώστε να βελτιστοποιηθούν οι αναλογίες των διαφόρων αερίων και να μειωθεί το αρνητικό αντίκτυπο σε ορισμένα τρόφιμα. Θα πρέπει κάθε φορά να λαμβάνεται υπόψη η φύση και η αρχική μικροχλωρίδα του τροφίμου, η θερμοκρασία αποθήκευσης και η ποιότητα και αποτελεσματικότητα του μηχανολογικού εξοπλισμού (Wei et al., 2019).

### 6.3 Ιονίζουσα ακτινοβολία

Η ιονίζουσα ακτινοβολία (ionizing radiation ) είναι μια σχετικά σύγχρονη τεχνική για τη διασφάλιση της μικροβιακής ασφάλειας και σταθερότητας των τροφίμων σε συνθήκες ψυχρής αποθήκευσης. Η τεχνική αυτή στις αρχές τις δεκαετίας του 80 (1981) δέχθηκε την κοινή έγκριση του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization - FAO), του Διεθνή Οργανισμού Ατομικής Ενέργειας (International Atomic Energy Agency - IAEA) και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization - WHO) (Silva et al., 2016). Είναι μία τεχνική σχεδόν εξίσου αποτελεσματική με τη θέρμανση και η αρχή της αποστείρωσης με ακτινοβολία είναι ότι μπορεί να προκαλέσει σημαντική βλάβη σε μοριακό επίπεδο στα κύτταρα των μικροοργανισμών, όπως στο DNA, να καταστρέψει χρωστικές, λιπαρά οξέα και λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης (Wei et al., 2019).

Η ιονίζουσα ακτινοβολία διακρίνεται σε τρεις τύπους (Silva et al., 2016):

- Ακτίνες γάμμα
- Ακτίνες με δέσμη ηλεκτρονίων με υψηλή ενέργεια
- Ακτίνες X

Η ιονίζουσα ακτινοβολία με δέσμη ηλεκτρονίου με δόσεις 1,0 και 1,8 kGy<sup>1</sup> έχει αποδειχθεί αποτελεσματική για την καταστροφή πολλών βακτηρίων αλλοίωσης όπως

---

<sup>1</sup> 1kGy =1000 Gy (gray). Πρόκειται για τη μονάδα μέτρησης της ενέργειας ιονίζουσας ακτινοβολίας που απορροφά η ύλη. Ισχύει ότι 1 Gy= 1j/kg

*Campylobacter spp.*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* και *Bacillus cereus* σε κρέας πουλερικών το οποίο είχε απαλλαγεί από κόκαλα και πέτσα (Lewis et al., 2002). Σημειώνεται ότι οι δόσεις ακτινοβολίας χαρακτηρίζονται σε χαμηλή (έως 1kGy), μεσαία (1-10 kGy) και υψηλή δόση ακτινοβολίας (10-50 kGy).

Ωστόσο, η ιοντίζουσα ακτινοβολία, ιδιαίτερα σε υψηλές δόσεις, είναι μία τεχνολογία που μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στον οργανοληπτικό χαρακτήρα και αλλοιώσεις στη χημική σύσταση των τροφίμων, ενώ δρα αρνητικά και στις χημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων. Έτσι, υπάρχει η πιθανότητα ανάπτυξης δύσοσμων ουσιών, μεταβολής του χρώματος του προϊόντος, οξειδωση λιπαρών ενώσεων και μείωση της θρεπτικής του αξίας. Οπότε, πριν την εφαρμογή της μεθόδου αυτής σε ένα τρόφιμο απαιτείται να έχουν πραγματοποιηθεί δοκιμές ώστε να προσδιορισθεί η σωστή δόση και ο κατάλληλος χρόνος επεξεργασίας ώστε να συνδυαστεί η μικροβιακή σταθερότητα με τη διατήρηση του οργανοληπτικού χαρακτήρα του τροφίμου (Kudra et al., 2012).

#### 6.4 Επεξεργασία υψηλής πίεσης (HPP)

Η επεξεργασία υψηλής πίεσης (High Pressure Processing - HPP) είναι μία εναλλακτική μέθοδο που φαίνεται ότι μπορεί να αντικαταστήσει με ασφάλεια τη θερμική επεξεργασία στη βιομηχανία τροφίμων, ώστε να επιτευχθεί μικροβιακή σταθερότητα και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής των τροφίμων. Η επεξεργασία υψηλής πίεσης αναφέρεται συνήθως σε συνθήκες όπου η θερμοκρασία διατηρείται μικρότερη από 60°C και η πίεση κυμαίνεται μεταξύ 300 ως 600 MPa. Συνηθίζεται να εφαρμόζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στο κρέας, αλλά και σε λαχανικά, χυμούς ή ποτά (Silva et al., 2018).

Οι συνθήκες υψηλής πίεσης επηρεάζουν ταυτόχρονα την αρχιτεκτονική των κυττάρων των μικροοργανισμών σε περισσότερα από ένα σημεία αλλά και ορισμένες από τις κρίσιμες κυτταρικές λειτουργίες (εικόνα 8). Έχει παρατηρηθεί ότι η επεξεργασία υψηλής πίεσης (HPP) οδηγεί στην αναστολή της ανάπτυξης και στη θανάτωση των μικροοργανισμών, καθώς (Sehrawat et al., 2020):

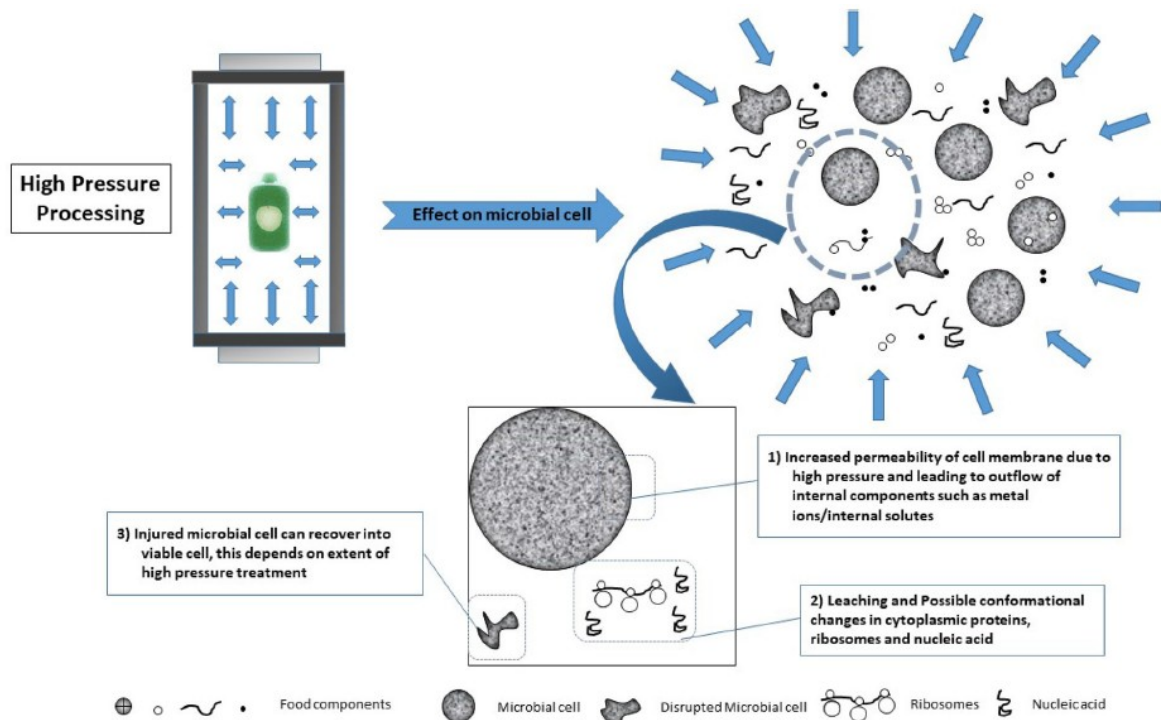
- Επιδράει και αλλάζει την διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών των μικροοργανισμών. Η βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη είναι μια ρευστή δομή που αποτελείται από πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια, που σχηματίζει διπλοστοιβάδα, η οποία διαχωρίζει τα εσωτερικά κύτταρα από το

εξωτερικό περιβάλλον. Η επεξεργασία με υψηλή πίεση οδηγεί σε διαταραχή της μικροβιακής κυτταρικής μεμβράνης που οδηγεί περαιτέρω στην αυξημένη διαπερατότητά της

- Διαταράσσει τη μορφολογία του βακτηριακού κυττάρου, όπως αύξηση του μήκους του κυττάρου, συστολή του μεγέθους των κενотоπιών των αερίων, συμπύκνωση του πυρηνικού υλικού και συστολή του κυτταρικού τοιχώματος. Αν οι πιέσεις είναι μικρές μπορεί να παρατηρηθεί αντιστροφή των βλαβών μετά από διάστημα ορισμένων ωρών, ακόμη και βδομάδων. Σε γάλα, χοιρινό και ζωμό έχουν αναφέρει παρόμοια αποτελέσματα όπου η υποθανατηφόρα βλάβη που προκλήθηκε στα κύτταρα μπόρεσε να ανακάμψει μέσα σε 6 ώρες έως 4 εβδομάδες από την αποθήκευση
- Αλλοιώνει βασικές βιοχημικές αντιδράσεις. Αρκετές βιοχημικές αντιδράσεις απαιτούνται για την εκτέλεση διαφορετικών λειτουργιών για τη διατήρηση των διαδικασιών ζωής. Αυτές οι αντιδράσεις οδηγούν σε αλλαγή όγκου και το HPP ευνοεί αντιδράσεις που έχουν ως αποτέλεσμα μείωση όγκου του διαλύματος. Εκτός από την κυτταρική μεμβράνη, η πρωτεΐνη και τα ένζυμα θεωρούνται επίσης ως κύριος στόχος της θεραπείας υψηλής πίεσης για την αδρανοποίηση μικροοργανισμών. Βασικά ένζυμα όπως το ATP που υπάρχουν στις κυτταρικές μεμβράνες είτε μετουσιώνονται είτε αποσπώνται από τη μεμβράνη με επεξεργασία υψηλής πίεσης.
- Παρεμβάλεται στον γενετικό μηχανισμό των βακτηρίων. Η λειτουργικότητα του γενετικού υλικού εξαρτάται από τα ένζυμα του και η πίεση διαταράσσει τη δραστηριότητα των ενζύμων. Λόγω της αδρανοποίησης της ενζυμικής δραστηριότητας, στα ριβοσώματα μειώνεται η σύνθεση, η οποία απαιτείται για την αντιγραφή και τη μεταγραφή του γενετικού υλικού. Επιπλέον, ακόμη και μικρές αλλαγές στα αμινοξέα μπορεί να προκαλέσουν αλλαγή στο σχήμα της πρωτεΐνης. Οι ομοιοπολικοί δεσμοί και οι δεσμοί υδρογόνου επηρεάζονται λιγότερο από την πίεση σε σύγκριση με τις ηλεκτροστατικές, υδρόφοβες και ιοντικές αλληλεπιδράσεις. Καθώς οι δεσμοί υδρογόνου εμπλέκονται στο σχηματισμό της δομής της έλικας του DNA, έτσι τα νουκλειικά οξέα είναι συγκριτικά ανθεκτικά στην υψηλή πίεση. Όμως, σε υψηλότερη πίεση, όταν η ενδονουκλεάση έρχεται σε επαφή με το DNA, διασπά το DNA και οδηγεί σε συμπύκνωση του DNA. Διαπιστώθηκε



επίσης ότι σε πολλές περιπτώσεις, αυτό το φαινόμενο της συμπύκνωσης είναι αναστρέψιμο, αλλά εάν το ένζυμο μπορεί να απενεργοποιηθεί στη θεραπεία, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μπορεί να αποφευχθεί



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης της επεξεργασίας υψηλής πίεσης στα βακτήρια

Πηγή: Sehrawat et al., 2021

Ο κυτταρικός θάνατος των βακτηρίων μπορεί να οφείλεται σε έναν από τους παραπάνω παράγοντες, αλλά και στην ταυτόχρονη επίδραση της μεθόδου σε πρωτεΐνες, ριβοσώματα και γενετικό υλικό.

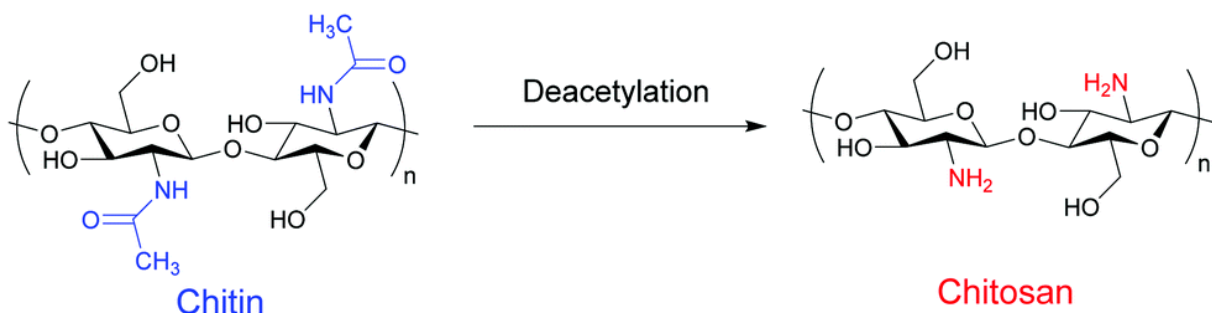
Η τεχνική υψηλής υδροστατικής πίεσης (HHP) συγκριτικά με τις επεξεργασίες θέρμανσης πλεονεκτεί στο γεγονός ότι δεν υποβαθμίζει τις βιταμίνες, τα φυτοχημικά και τις αρωματικές ενώσεις των τροφίμων. Μάλιστα, αν το τρόφιμο αποθηκευθεί σε θερμοκρασίες ψύξης, η αλλαγή της υφής, στο χρώμα και στη γεύση είναι ελάχιστη. Οι τρεις παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι: το stress, ο χρόνος παραμονής και αν η διαδικασία είναι παλμική ή συνεχής (Silva et al., 2018).

Επιπλέον, το HPP χρησιμοποιείται συνήθως στην αποστείρωση γάλακτος, η οποία μπορεί να είναι υποκατάστατο ή συμπλήρωμα της παραδοσιακής θερμικής

παστερίωσης. Επιπλέον, σε σύγκριση με την παστερίωση με θέρμανση, η ομογενοποίηση υπερυψηλής πίεσης έχει το πλεονέκτημα της μείωσης της θερμικής αποδόμησης των θρεπτικών συστατικών και των μορίων διατήρησης της γεύσης. Ως εκ τούτου, η HPP έχει ένα πολλά υποσχόμενο μέλλον στον έλεγχο των ψυχοτρόφων (Wei et al., 2019).

## 6.5 Εδώδιμες μεμβράνες και επικαλύψεις

Οι εδώδιμες μεμβράνες και επικαλύψεις είναι φυσικά εδώδιμα συστατικά που ανήκουν στους πολυσακχαρίτες, τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα ώστε να αυξήσουν τη διατηρησιμότητά τους. Στοχεύουν να αυξήσουν την αντοχή του τροφίμου έναντι ενός ή περισσότερων παραγόντων αλλοίωσης. Συχνά, εμπλουτίζονται με φυτικά εκχυλίσματα που λειτουργούν ως φυσικά αντιοξειδωτικά και αντιμικροβιακά συστατικά. Για παράδειγμα, δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα πολυσακχαριτών που χρησιμοποιούνται για να σχηματίσουν εδώδιμες μεμβράνες είναι η χιτίνη και η χιτοζάνη που θεωρούνται ότι έχουν αντιβακτηριδιακή δράση. Η χιτοζάνη σχηματίζεται από την αποακετυλίωση της χιτίνης και έχει την ικανότητα να μορφοποιείται και να γίνεται μεμβράνη, ίνα, γέλη ή ακόμη και νανοσωματίδια (Fang et al., 2018).



Εικόνα 9: Μετατροπή χιτίνης σε χιτοζάνη με αποακετυλίωση

Πηγή: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/nh/d0nh00696c> [12/01/2023]

Η αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης θεωρείται ότι στηρίζεται σε δύο βασικούς μηχανισμούς, οι οποίοι δρουν εναντίον του βακτηρίου παράλληλα και αθροιστικά (Na et al., 2018):

- Η χιτοζάνη έχει κατιονική φύση με αποτέλεσμα να επηρεάζει τις μεταβολικές διαδικασίες του βακτηρίου λόγω αντιδράσεων

ηλεκτροστατικής φύσεως που αναπτύσσονται στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου

- Η χιτοζάνη απορροφάται από μόρια DNA και εμποδίζει τη μεταγραφή του RNA άρα και την παραγωγή ορισμένων πρωτεϊνών.

Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Na et al. (2018) αξιολόγησαν την αντιμικροβιακή δράση επικαλύψεων από ε-πολυλυσίνη (πολυμερές του αμινοξέος λυσίνης), από χιτοζάνη και από τον συνδυασμό τους ε-πολυλυσίνη + χιτοζάνη σε λευκές γαρίδες του Ειρηνικού που διατηρήθηκαν σε συνθήκες ψύξης στους 4 °C για 15 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο συνδυασμός ε-πολυλυσίνη + χιτοζάνη ήταν πιο αποτελεσματικός έναντι της ανάπτυξης μεσόφιλων και ψυχροτρόφων βακτηρίων, *Pseudomonas* spp., και βακτηρίων που παράγουν H<sub>2</sub>S (Na et al., 2018).

Σε παρόμοιο θετικό αποτέλεσμα για την αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης κατέληξαν και οι Jafari et al. (2017). Πραγματοποίησαν μελέτη όπου ενίσχυσαν της δράση της χιτοζάνης με προσθήκη αιθανολικού εκχυλίσματος προπόλης σε συγκεντρώσεις 1% και 2%. Η πρόπολη είναι μία φυσική ουσία που παράγεται από τη μελισσοκομία και που χρησιμοποιείται για λοιμώξεις που προκλήθηκαν από τη δράση βακτηρίων, ιών, μυκήτων και πρωτόζωων. Το δείγμα ήταν φιλέτο κοτόπουλο και έλεγξαν τη δράση της συγκεκριμένης μεμβράνης εναντίον μεσόφιλων αερόβιων, ψυχρότροφων, βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, κολοβακτηριδίων και *Staphylococcus aureus*. Παρατηρήθηκε μείωση της ανάπτυξης των βακτηρίων όλων των κατηγοριών κατά τη διάρκεια 12 ημερών στους 4°C (Jafari et al., 2017).

Οι Thamnoroulos et al (2018) αξιολόγησαν τη δυνατότητα να δημιουργηθεί ένα πρωτόκολλο που θα επιτρέπει την προσθήκη αιθανικού εκχυλίσματος πρόπολης σε γλυκερίνη τα οποία μπορούν να διασπαρθούν σε γάλα μολυσμένο με *Listeria monocytogenes* και να ασκήσουν αντιβακτηριακή δράση. Τα αποτελέσματα έδειξαν πλήρη αναστολή της ανάπτυξης του *L. monocytogenes* μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης σε συγκέντρωση 4 mg ξηρής προπόλης ανά mL γάλακτος (Thamnoroulos et al., 2018).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η χρήση εδώδιμων μεμβρανών ή εδώδιμων επικαλύψεων ή χρήση φυσικών πρόσθετων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της ανάπτυξης των ψυχροτρόφων βακτηρίων. Αν και οι δυνατότητες που παρουσιάζονται είναι πολλές, είναι απαραίτητο κάθε φορά να ελέγχεται η ασφάλεια των τροφίμων και οι παρενέργειες στην ανθρώπινη υγεία.



## 7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα ψυχρότροφα βακτήρια είναι διαδεδομένα στη φύση και μπορούν να προσβάλουν τα περισσότερα από τα περισσότερα τρόφιμα που φυλάσσονται σε συνθήκες ψύξης. Η παρουσία τους σημαίνει ότι το τρόφιμο κινδυνεύει να αλλοιωθεί και να καταστεί ακατάλληλο για κατανάλωση, άρα η βιομηχανία να υποστεί οικονομική ζημία, αλλά παράλληλα μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα υγείας για τον καταναλωτή. Μία τροφιμογενής λοίμωξη μπορεί να έχει από ήπια ως εξαιρετικά σοβαρή συμπτωματολογία και να καταστεί επικίνδυνη για την ανθρώπινη ζωή.

Στον πίνακα 2, αναφέρονται ορισμένοι μέθοδοι ανίχνευσης ψυχροτρόφων μικροοργανισμών και το τρόφιμο στο οποίο εφαρμόστηκαν.

Πίνακας 2: Παραδείγματα μεθόδων ανίχνευσης ψυχροτρόφων μικροοργανισμών σε διάφορα τρόφιμα

Μέθοδος ανίχνευσης/ δείγμα	Ψυχρότροφος μικροοργανισμός	Συμπεράσματα	Αναφορά
RTi-PCR / γάλα	<i>Paenibacillus</i>	Ταχεία, ακριβής, εξειδικευμένη με όριο ανίχνευσης $3,25 \times 10^1$ CFU / mL	Ranieri et al., 2012
FCM/σπανάκι	<i>Escherichia coli</i> O157 : H7	Ταχεία και με μεγάλη ευαισθησία (ανάλυση 25 δειγμάτων σε 9 ώρες για την ανίχνευση 1 κυττάρου)	Williams et al., 2017
DEFT/σκληρό τυρί	<i>Listeria monocytogenes</i>	Αποδοτική και αποτελεσματική μέθοδος	Olszewska et al., 2015
duplex PCR-ELISA/ γάλα, χυμό, λάχανο, γαρίδες, κοτόπουλο, χοιρινό και βοδινό	<i>Salmonella spp.</i> και <i>Escherichia coli</i> O157: H7	Εξειδίκευση και μεγαλύτερη ευαισθησία της διπλής PCR περίπου $10^3$ φορές	Hu et al., 2018
LAMB/ γάλα, γαλακτοκομικά προϊόντα και θαλασσινά προϊόντα	<i>Listeria monocytogenes</i>	Ακρίβεια μεθόδου: 32 στα 32 μολυσμένα δείγματα (100%)	Tirloni et al., 2017

<b>LAMB/ γάλα</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Μικρό όριο ανίχνευση: 186 CFU / mL έναντι $1,86 \times 10^5$ CFU / mL	Wang et al., 2010
<b>TTGE/ γαλακτοκομικά προϊόντα</b>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> και <i>Staphylococcus</i>	Μειονέκτημα: απαιτείται η δημιουργία βάσης δεδομένων με πολλαπλά στελέχη ελέγχου	Ogier et al., 2002

Ορισμένες από τις σημαντικότερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων για την προστασία από την ανάπτυξη των ψυχροτρόφων μικροοργανισμών παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Ορισμένα παραδείγματα τρόπου πρόληψης και προστασίας από την ανάπτυξη ψυχροτρόφων μικροοργανισμών

Μέθοδος πρόληψης/ δείγμα	Συμπεράσματα	Αναφορά
Ιοντίζουσα ακτινοβολία/ κρέας πουλερικών χωρίς πέτσα ή κόκαλα	Θανάτωση βακτηρίων αλλοίωσης, ανάμεσα τους και ψυχρότροφα ( <i>Campylobacter s</i> <i>pp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> και <i>Bacillus ce</i> <i>reus</i> )	Lewis et al., 2002
Εδώδιμη μεμβράνη πηκτίνης + νιασίνη (αντιμικροβιακό)+ συσσκευασία MAP/ φέτες φρέσκου λωτού	Μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> <i>enteritidis</i> και <i>Listeria monocyt</i> <i>ogenes</i> . Σταθερή οργανοληπτική ποιότητα για 9 ημέρες	Sanchis et al., 2016
<b>MAP (N<sub>2</sub>) / γάλα</b>	Ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης των ψυχρότροφων βακτηρίων σε συνθήκες ψύξης	Munsch- Alatossava et al., 2010
<b>MAP (100% N<sub>2</sub>, 50% Ar- 50% N<sub>2</sub>, 50% Ar -50% C O<sub>2</sub>, και 50% N<sub>2</sub>-50% CO<sub>2</sub>) / κρέας γαλοπούλας</b>	Καθυστέρηση στην ανάπτυξη ψυχροτρόφων. Η προσθήκη αργού μικρή προστατευτική επίδραση (50% Ar -50% CO <sub>2</sub> )	Fraqueza & Barreto, 2009
ε-πολυλυσίνη + χιτοζάνη/ λευκές γαρίδες Ειρηνικού	Αναστολής της ανάπτυξης μεσόφιλων και ψυχροτρόφων βακτηρίων, <i>Pseudomonas</i> <i>spp.</i> , και βακτηρίων που παράγουν H <sub>2</sub> S	Na et al., 2018
Χιτοζάνη+ αιθανόλη / φιλέτο κοτόπουλου	Αντιβακτηριακή δράση	Jafari et al., 2017
Αλκοολικό εκχύλισμα προπόλης σε γλυκερίνη/	Αναστολή ανάπτυξης <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> για 30	Thamnopoulos et al., 2018

Η πρόληψη είναι η αποτελεσματικότερη λύση για την αντιμετώπιση των ψυχρότροφων μικροοργανισμών.

Είναι απαραίτητο ο επιστημονικός τομέας να στραφεί στην δημιουργία μεθόδων που θα ανιχνεύουν με ταχύ τρόπο την παρουσία των ψυχροτρόφων βακτηρίων στα τρόφιμα, ώστε να λαμβάνονται εγκαίρως τα απαραίτητα μέτρα αντιμετώπισης. Επίσης, επιθυμητή είναι η αναζήτηση και εφαρμογή τεχνολογιών που θα προστατεύουν την υγιεινή και την ποιότητα του τροφίμου χωρίς να το εκθέτουν σε ακραίες θερμικές επεξεργασίες ή χωρίς την εντατική χρήση συντηρητικών και αντιμικροβιακών ουσιών.

## 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Altunatmaz, S.S., Issa, G., Aydin, A.** (2012). Detection of airborne psychrotrophic bacteria and fungi in food storage refrigerators. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43 (4): 1436-1443: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/Sbz3Z8gQz859tsf5D5t7xFw/?format=pdf&lang=en>
2. **Arunrut, N., Kiatpathomchai, W., Ananchaipattana, C.** (2018). Development and evaluation of real time loop mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of Salmonella spp. in chicken meat products. *Journal of Food Safety*, 38 (6): e12564: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfs.12564>
3. **Batra, P, Mathur, P., Misra, M.C.** (2016). Aeromonas spp. An Emerging Nosocomial Pathogen. *Journal of Laboratory Physicians*, 8 (1): 1-4: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4785759/>
4. **Cavill, L., Renteria-Monterrubio, A.L., Helps, C.R., Corry, J.E.L.** (2011). Detection of cold-tolerant clostridia other than Clostridium estertheticum in raw vacuum-packed chill-stored meat. *Food Microbiology*, 28 (5): 957-963: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21569939/>
5. **CDC** (Centers for Disease Control and Prevention). (2019). Pseudomonas aeruginosa in Healthcare Settings. Available online [15/01/2023]: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>
6. **Chen, J.-Q., Regan, P., Laksanalamai, P., Healey, S., Hu, Z.** (2017). Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L.ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Willness*, 6 (3): 97- 120: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453017300113>
7. **Cronin, U.P.& Wilkinson, M.G.** (2009). The growth, physiology and toxigenic potential of Bacillus cereus in cooked rice during storage temperature abuse. *Food Control*, 20 (9): 822-828: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713508003083>
8. **De Oliveira, G.B., Favarin, L., Luchese, R.H., McIntosh, D.** (2015). Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? *Brazilian Journal*



- of *Microbiology*, 46 (2): 313-321:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507522/>
9. **Eddy, B.P.** (1960). The use and meaning of the term 'psychrophilic'. *Journal of Applied Microbiology*, 23 (2): 189-190: <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00195.x>
  10. **EFSA.** (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15 (12): e05077: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7009962/>
  11. **Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I. Villani, F.** (2009). Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology*, 26 (2): 228-231: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002008001925>
  12. **Fang, Z., Lin, D., Warner, R.D., Ha, M.** (2018). Effect of gallic acid/chitosan coating on fresh pork quality in modified atmosphere packaging. *Food Chemistry*, 260: 90-96: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814618306101>
  13. **Fraqueza, M.J. & Barreto, A.S.** (2009). The effect on turkey meat shelf life of modified-atmosphere packaging with an argon mixture. *Poultry Science*, 88 (9): 1991-1998: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119401491>
  14. **Greiner, M., Anagnostopoulos, A., Pohl, D., Zbinden, R., Zbinden, A.** (2021). A rare case of severe gastroenteritis caused by *Aeromonas hydrophila* after colectomy in a patient with anti-Hu syndrome: a case report. *BMC Infectious Diseases*, 21: 1097: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-021-06784-3>
  15. **Hassan, M.A., Shaltout, F.A., Maarouf, A.A., El-Shafey, W.S.** (2014). Psychrotrophic bacteria in frozen fish with special reference to pseudomonas species. *Benha Veterinary Medical Journal*, 27 (1): 78-83: [https://www.bu.edu.eg/portal/uploads/Veterinary%20Medicine/Food%20control/1029/publications/Mohamed%20Ahmed%20Mohamed%20Hassan\\_5.pdf](https://www.bu.edu.eg/portal/uploads/Veterinary%20Medicine/Food%20control/1029/publications/Mohamed%20Ahmed%20Mohamed%20Hassan_5.pdf)
  16. **Hu, J., Huang, R., Wang, Y., Wei, X., Wang, Z., Geng, Y., Jing, J., Gao, H., Sun, X., Dong, C., Jiang, C.** (2018). Development of duplex PCR-ELISA for simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in

- food. *Journal of Microbiological Methods*: 127-133:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701218308443>
17. **Ibrahim, S., Hassan, M., Amin, R., Idris, S.** (2019). Antibacterial effect of lactic acid bacteria against psychrotrophic microorganisms in chilled beef meat during storage at 4°C. *Benha Veterinary Medical Journal*, 37 (2): 238-246:  
[https://bvmj.journals.ekb.eg/article\\_71216\\_ad64dbe6ad9c5c0ccc47acb1968a2436.pdf](https://bvmj.journals.ekb.eg/article_71216_ad64dbe6ad9c5c0ccc47acb1968a2436.pdf)
  18. **Ingraham, J.L. & Stokes, J.L.** (1959). Psychrophilic Bacteria. *Bacteriology Reviews*, 23 (3): 97-108:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC181025/?page=2>
  19. **Jafari, N.J., Kargozari, M., Ranjbar, R., Rostami, H., Hamed, H.** (2017). The effect of chitosan coating incorporated with ethanolic extract of propolis on the quality of refrigerated chicken fillet. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42 (1): e13336:  
<https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.13336>
  20. **Janda, J.M., & Abbott, S.L.** (2010). The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23 (1): 35-73:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2806660/>
  21. **Junior, J.C.R., De Oliveira, A.M., Silva, F.de G., Tamanini, R., De Oliveira, A.L.M., Beloti, V.** (2018). The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*, 101 (1): 75-83:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29102138/>
  22. **Jordan, K. & McAuliffe, O.** (2018). Chapter Seven- *Listeria monocytogenes* in Food. *Advances in Food and Nutrition Research*, 86: 181-213:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043452618300226>
  23. **Kirov, S.M. Anderson, M.J., McMeekin, T.A.** (1990). A note on *Aeromonas* spp. from chickens as possible food-borne pathogens. *Journal of Applied Bacteriology*, 68 (4): 327-334:  
<https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02882.x>
  24. **Kralova, S., Busse, H.-J., Svec, P., Maslanova, I., Stankova, E., Bartak, M., Sedlacek, I.** (2019). *Flavobacterium circumlabens* sp. nov. and *Flavobacterium cupreum* sp. nov., two psychrotrophic species isolated from Antarctic

- environmental samples. *Systematic and Applied Microbiology*, 42 (3): 291-301: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0723202018303771>
25. **Kudra, L.L., Sebranek, J.G., Dickson, J.S., Mendonca, A.F., Zhang, Q., Jackson-Davis, A., Prusa, K.J.** (2012). Control of *Campylobacter jejuni* in Chicken Breast Meat by Irradiation Combined with Modified Atmosphere Packagin Including Carbon Monoxide. *Journal of Food Protection*, 75 (10): 1728-1733: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X23040012>
26. **Lewis, S.J., Velasquez, A., Cuppett, S.L., McKee, S.R.** (2002). Effect of electron beam irradiation on poultry meat safety and quality. *Poultry Science*, 81 (6): 896-903: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12079059/>
- 27.
28. **Loch, T.P. & Faisal, M.** (2015). Emerging flavobacterial infections in fish: A review. *Journal of Advanced Research*, 6 (3): 283-300: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123214001325>
29. **Machado, A., Almeida, C. Carvalho, A., Boyen, F., Haesebrouck, F., Rodrigues, L., Cerca, N., Azevedo, N.F.** (2013). Fluorescence in situ hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Lactobacillus* spp. in milk samples. *International Journal of Food Microbiology*, 162 (1): 64-70: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23357093/>
30. **Martzy, R., Kolm, C., Brunner, K., Mach, R.L., Krska, R., Sinkovec, H., Sommer, R., Farnleitner, A.H., Reischer, G.H.** (2017). A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of *Enterococcus* spp. in water. *Water Research*, 122: 62-69: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135417303603>
31. **Mossel, D.A.A & Zwart, H.** (1960). The rapid tentative regognition of psychrotrophic types among Enterobacteriaceae isolated from foods. *Journal of Applied Bacteriology*, 23 (2): 185-188: <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00194.x>
32. **Morandi, S., Pica, V., Masotti, f., Cattaneo, S., Brasca, M., De Noni, I., Silvetti, T.** (2021). Proteolytic Traits of Psychrotrophic Bacteria Potentially Causative of Sterilized Milk Instability: Genotypic, Phenotypic and Peptidomic Insight. *Foods*, 10 (5): 934: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/5/934>

33. **Moyer, C.L., Collins, E., Morita, R.Y.** (2017). Psychrophiles and Psychrotrophs. *Reference Module in Life Sciences*: 1-6: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128096338022822>
34. **Munsch-Alatossava, P., Gursoy, O., Alatossava, T.** (2010). Exclusion of phospholipases (PLs)-producing bacteria in raw milk flushed with nitrogen gas (N<sub>2</sub>). *Microbiological Research*, 165 (1): 61-65: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501308000438>
35. **Na, S., Kim, J.-H., Jang, H.-J., Park, H.J., Oh, S.-W.** (2018). Shelf life extension of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using chitosan and ε-polylysine during cold storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115: 1103-1108: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29727649/>
36. **Niessen, L., Luo, J., Denschlag, C., Vogel, R.F.** (2013). The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants. *Food Microbiology*, 36 (2): 191-206: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24010598/>
37. **O'Connor, C.** (2008). Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). *Nature Education*, 1 (1): 171: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327/#>
38. **Ogier, J.-C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A.** (2002). Identification of the Bacterial Microflora in Dairy Products by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (8): 3691-3701: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC124045/>
39. **Olszewska, M.A., Panfil-Kuncewicz, H., Laniewska-Trokenheim, L.** (2014). Detection of Viable but Nonculturable Cells of *Listeria monocytogenes* with the Use of Direct Epifluorescent Filter Technique. *Journal of Food Safety*, 35 (1): 86-90: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfs.12130>
40. **Pennacchia, C., Ercolini, D., Villani, F.** (2009). Development of a Real-Time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh raw meat. *International Journal of Food Microbiology*, 134 (3): 230 -236: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19651454/>
41. **Przemieniecki, S.W., Kurowski, T.P., Korzekwa, K., Karwowska, A.** (2014). The effect of psychrotrophic bacteria isolated from the root zone of winter wheat on selected biotic and abiotic factors. *Journal of Plant Protection Research*, 54

- (4): 407-413:  
[https://www.researchgate.net/publication/273258460\\_The\\_effect\\_of\\_psychrotrophic\\_bacteria\\_isolated\\_from\\_the\\_root\\_zone\\_of\\_winter\\_wheat\\_on\\_selected\\_biotic\\_and\\_abiotic\\_factors](https://www.researchgate.net/publication/273258460_The_effect_of_psychrotrophic_bacteria_isolated_from_the_root_zone_of_winter_wheat_on_selected_biotic_and_abiotic_factors)
42. **Quintieri, L., Fanelli, F., Zuhlke, D., Caputo, L., Logrieco, A.F., Albrecht, D., Riedel, K.** (2020). Biofilm and Pathogenesis-Related Proteins in the Foodborne *P.fluorescens* ITEM 17298 With Distinctive Phenotypes During Cold Storage. *Frontiers in Microbiology*, 11: 991:  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00991/full>
  43. **Palumbo, S.A., Maxino, F., Williams, A., Buchanan, R.L., Thayer, D.W.** (1985). Starch-Ampicillin Agar for the Quantitative Detection of *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (4):  
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.50.4.1027-1030.1985>
  44. **Pessoa, R.B.G., De Oliveira, W.F., Marques, D.S.C., Correia, M.T.S., De Carvalho, E.V.M.M., Coelho, L.C.B.B.** (2019). The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microbial Pathogenesis*, 130: 81-94:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401018312518>
  45. **Ranieri, M.L., Ivy, R.A., Mitchell, W.R., Call, E., Masiello, S.N., Wiedmann, M., Boor, K.J.** (2012). Real- Time PCR Detection of *Paenibacillus spp.* in Raw Milk to Predict Shelf Life Performance of Pasteurized Fluid Milk Products. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (16): 5877-5863:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3406147/>
  46. **Raposo, A., Perez, E., De Faria, C.T., Ferrus, M.A., Carrascosa, C.** (2016). Chapter 3 - Food Spoilage by *Pseudomonas spp.*- An Overview. In: Singh, O.V. (ed). *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance*: 41-71:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119139188.ch3>
  47. **Rohde, A., Hammerl, J.A., Appel, B., Dieckmann, R., Sascha, A.D.** (2017). Differential detection of pathogenic *Yersinia spp.* by fluorescence in situ hybridization. *Food Microbiology*, 62: 39-45:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27889163/>
  48. **Samapundo, S., De Baenst, I., Aerts, M., Cnockaert, M., Devlieghere, F., Van Damme, P.** (2019). Tracking the sources of psychrotrophic bacteria contaminating chicken cuts during processing. *Food Microbiology*, 81: 40-50:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002017310432>

49. **Samarzija, D., Zamberlin, S., Pogacic, T.** (2012). Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*, 62 (2): 77-95: <https://hrcak.srce.hr/file/124020>
50. **Sanchis, E., Ghidelli, C., Sheth, C.C., Mateos, M., Palou, L., Perez-Gago, M.B.** (2017). Integration of antimicrobial pectin-based edible coating and active modified atmosphere packaging to preserve the quality and microbial safety of fresh-cut persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Rojo Brillante). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97 (1): 252-260: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26997097/>
51. **Salem, A.M., Osman, I.M., Shehata, M.** (2018). Assessment of Psychrotrophic Bacteria in frozen fish with special reference to *Pseudomonas* Species. *Benha Veterinary Medical Journal*, 34 (2): 140-148: [https://bvmj.journals.ekb.eg/article\\_29423\\_6039d4b3ed6d763185ade8d391b06124.pdf](https://bvmj.journals.ekb.eg/article_29423_6039d4b3ed6d763185ade8d391b06124.pdf)
52. **Sehrawat, R., Kaur, B.P., Nema, P.K., Tewari, S., Kumar, L.** (2020). Microbial inactivation by high pressure processing: principle, mechanism and factors responsible. *Food Science and Biotechnology*. 30: 19-35: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10068-020-00831-6>
53. **Silva, F., Domingues, F.C., Nerin, C.** (2018). Trends in microbial control techniques for poultry products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (4): 591-609: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2016.1206845?journalCode=bfsn20>
54. **Thamnopoulos, I.-A., Michailidis, G.F., Fletouris, D.J., Badeka, A., Kontominas, M.G., Angelidis, A.S.** (2018). Inhibitory activity of propolis against *Listeria monocytogenes* in milk stored under refrigeration. *Food Microbiology*, 73: 168-176: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29526202/>
55. **Thomas, S.B.** (1969). Methods of Assessing the Psychrotrophic Bacterial Content of Milk. *Journal of Applied Bacteriology*, 32 (3): 269-296: <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.1969.tb00974.x>
56. **Tirloni, E., Bernardi, C., Drago, S., Stampone, G., Pomilio, F., Cattaneo, P., Stella, S.** (2017). Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of *Listeria monocytogenes* in dairy food. *Italian Journal of Food Safety*, 6 (4): 6890: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5850052/>

57. **Yadav, A.N., Yadav, N., Sachan, S.G., Saxena, A.K.** (2019). Biodiversity of psychrotrophic microbes and their biotechnological applications. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 7 (04): 99-108: [https://www.researchgate.net/publication/330661385\\_Biodiversity\\_of\\_psychrotrophic\\_microbes\\_and\\_their\\_biotechnological\\_applications](https://www.researchgate.net/publication/330661385_Biodiversity_of_psychrotrophic_microbes_and_their_biotechnological_applications)
58. **Wang, J., Li, Y., Chen, J., Hua, D., Li, Y., Liang, Z., Huang, J.** (2018). Rapid detection of food-borne Salmonella contamination using IMBs-qPCR method based on *pagC* gene. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49 (2): 320-328: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838217301302>
59. **Wang, D., Huo, G., Ren, D., Li, Y.** (2010). Development and evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Detecting *Listeria Monocytogenes* in raw milk. *Journal of Food Safety*, 30 (2): 251-262: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-4565.2009.00196.x>
60. **Wang, S. & Orsi, R.H.** (2013). Chapter 11 – Listeria. In: Morris, J.G. & Potter, M.E. (eds). *Foodborne Infections and Intoxications* (Fourth Edition): 199 -216: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124160415000111>
61. **Webb, D.J. & Brown, C.M.** (2012). Epi-Fluorescence Microscopy. In: Taatjes, D., Roth, J. (eds). *Cell Imaging Techniques. Methods in Molecular Biology*, 931: 29-59: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-056-4\\_2](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-056-4_2)
62. **Wei, Q., Wang, X., Sun, D.-W., Pu, H.** (2019). Rapid detection and control of psychrotrophic microorganisms in cold storage foods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 86: 453-464: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224418306800>
63. **Williams, A.J., Cooper, W.M., Ramsaroop, S., Alusta, P., Buzatu, D.A., Wilkes, J.G.** (2017). Rapid Flow Cytometry Detection of a Single Viable Escherichia coli O157:H7 Cell in Raw Spinach Using a Simplified Sample Preparation Technique. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1493: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01493/full>
64. **Wu, W., Jin, Y., Bai, F., Jin, S.** (2015). Chapter 41 – Pseudomonas aeruginosa. *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*, 2: 753-767: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012397169200041X>
65. **Zadernowska, A., Chajeka-Wierzchowska, W., Klebukowska, L.** (2014). Vidas UP-enzyme-linked fluorescent immunoassay based on recombinant phage protein and fluorescence in situ hybridization as alternative methods for

detection of *Salmonella enterica* serovars in meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11 (9): 747-752: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24971928/>