



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μελέτη της μεταβολής της
μικροβιακής χλωρίδας του μανουριού
κατά την διάρκεια της συντήρησής του
στην ψύξη

ΜΠΑΖΑΚΟΣ ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΗΣ

ΨΩΜΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2013

Μελέτη της μεταβολής της μικροβιακής χλωρίδας του μανουριού κατά την διάρκεια της συντήρησής του στην ψύξη

ΜΠΑΖΑΚΟΣ ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΗΣ
ΨΩΜΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης (ΑΤΕΙ),

Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη ΤΘ 141

Υποβολή Πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή Πτυχίου του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Θεσσαλονίκης.

Ημερομηνία Παρουσίασης

03/04/2013

Εισηγητής

Δημήτριος Παπαντωνίου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η μεταβολή του μικροβιακού φορτίου του μανουριού κατά τη διάρκεια της συντήρησής του στους 5°C για 30 ημέρες. Αναλύθηκαν δείγματα από δύο (2) διαδοχικές τυροκομήσεις μανουριού ενός τυροκομείου. Από κάθε τυροκόμηση οι μικροβιολογικές αναλύσεις έγιναν εις διπλούν την 1^η, 10^η, 20^η και 30^η ημέρα συντήρησης. Συνολικά εξετάσθηκαν 16 δείγματα, που υποβλήθηκαν στις παρακάτω μικροβιολογικές αναλύσεις: 1) Αρίθμηση της O.M.X., 2) Αρίθμηση ψυχρότροφων μικροοργανισμών, 3) Αρίθμηση των coliforms, 4) Αρίθμηση της *Escherichia coli*, 5) Αρίθμηση *Listeria* spp., 6) Αρίθμηση *Staphylococcus aureus* και 7) Αρίθμηση μυκήτων-ζυμών.

Όλες οι ομάδες των μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν την ημέρα παρασκευής του μανουριού βρέθηκαν σε επίπεδα 1-2 λογαρίθμους υψηλότερα των μικροβιολογικών προτύπων που ισχύουν. Ο σημαντικότερος δείκτης δυνητικής αλλοίωσης του μανουριού ήταν τα ψυχρότροφα μικρόβια. Ο αριθμός τους (~10⁴cfu/g) παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση τη 10^η ημέρα συντήρησης (ημέρα λήξης του προϊόντος), χωρίς όμως να φθάσει στο επίπεδο αρχόμενης αλλοίωσης (10⁷cfu/g). Οι μύκητες αποτέλεσαν τη δεύτερη πολυπληθέστερη ομάδα μικροβίων (~10⁴cfu/g). Εν τούτοις μέχρι και την 20^η ημέρα συντήρησης δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση. Στην εργασία συζητήθηκαν ενδιαφέροντα συμπεράσματα για τη μεταβολή του πληθυσμού και άλλων μικροβιολογικών δεικτών και παθογόνων βακτηρίων (coliforms, *E. coli*, *Listeria* spp., *S. aureus*).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	1
1.1.Ιστορικά στοιχεία.....	1
1.2.Ταξινόμηση των τυριών.....	1
2. Παρασκευή των τυριών	4
2.1.Υλικά για την παρασκευή των τυριών.....	4
2.2.Είδη τυριών.....	5
2.3.Τυριά τυρογάλακτος.....	6
2.3.1. Παρασκευή τυριών τυρογάλακτος.....	6
3. Μικροβιολογία τυριών	12
3.1.Ομάδες σημαντικών μικροοργανισμών στα τυριά.....	12
3.2.Παθογόνα βακτήρια στα τυριά.....	14
3.3.Μικροβιολογικός έλεγχος γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων.....	18
4. Σκοπός της εργασίας	20
5. Σημασία των χρησιμοποιηθέντων μικροβιολογικών δεικτών	21
5.1.Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα.....	21
5.2.Ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί.....	22
5.3.Οικ. Enterobacteriaceae.....	23
5.3.1. Κολοβακτηριοειδή (coliforms).....	24
5.3.2. <i>Escherichia coli</i>	24
5.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	26
5.5.Γένος <i>Listeria</i>	28
5.6.Μύκητες – Ζύμες.....	29
6. Υλικά και μέθοδοι	30
6.1.Δείγματα-Δειγματοληψία.....	30
6.2.Ομογενοποίηση – Παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων.....	31
6.3.Προσδιορισμός των μικροβιολογικών δεικτών.....	33
6.3.1. OMX (ή ΣΑΜ).....	33
6.3.2. Ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί.....	34
6.3.3. Coliforms.....	34
6.3.4. <i>E. coli</i>	35
6.3.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	35
6.3.6. γ. <i>Listeria</i>	36
6.3.7. Μύκητες-Ζύμες.....	37

7. Αποτελέσματα-συζήτηση.....	38
8. Συμπεράσματα.....	49
9. Βιβλιογραφία.....	50

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ιστορικά στοιχεία

Μέχρι τα μέσα του 19^{ου} αιώνα η τυροκομία ήταν χωρικής μορφής. Το 1851 αναφέρεται ότι δημιουργήθηκε η πρώτη βιομηχανία τυριού στις ΗΠΑ και φαίνεται πως από τότε άρχισε η αλματώδης πρόοδος της τυροκομίας. Στην αρχή η διάδοση της τεχνολογίας των τυριών γινόταν από τον έναν πολιτισμό στον άλλο με μικρές παραλλαγές για να ικανοποιήσει τις τοπικές ανάγκες και απαιτήσεις αλλά γινόταν και παραλλαγές που σκοπό είχαν τις βελτιώσεις. Η πρόοδος όμως της τυροκομίας οφείλεται κυρίως στις προόδους της επιστήμης και της τεχνολογίας. Τη σημαντικότερη ώθηση έδωσε η εξέλιξη της επιστήμης η οποία αφενός αύξησε τη γαλακτοπαραγωγή και αφετέρου προώθησε την τυροκομία από το επίπεδο της ‘τέχνης’ στο επίπεδο της ‘τέχνης και της επιστήμης’ (Ζερφυρίδης, 2001).

1.2. Ταξινόμηση των τυριών

Οι πολλές ονομασίες και οι παραλλαγές κάνουν την ταξινόμηση των τυριών δύσκολη, αν όχι αδύνατη. Για να γίνει η ταξινόμηση χρειάζονται ορισμένα κριτήρια διαχωρισμού τους. Τα πιο απλά από αυτά είναι η υγρασία του τυριού και οι μικροοργανισμοί ωριμάσεως του τυριού με η χωρίς συσχετισμό προς την υφή και δομή του τυριού.

Συνδυασμός των δυο παραπάνω ταξινομήσεων θα μπορούσε να είναι ο εξής:

1. Πολύ σκληρά:

Παρμεζάνα

2. Σκληρά :

(α) Ωριμάζουν με βακτήρια, χωρίς οπές: Cheddar

(β) Ωριμάζουν με βακτήρια, με οπές : Γραβιέρα, Έμμενταλ.

3. Ημίσκληρα :

(α) Ωριμάζουν με βακτήρια : Brick.

(β) Ωριμάζουν με βακτήρια και μικροοργανισμούς επιφάνειας: Trappist

(γ) Ωριμάζουν με μύκητες στο εσωτερικό τους: Roquefort

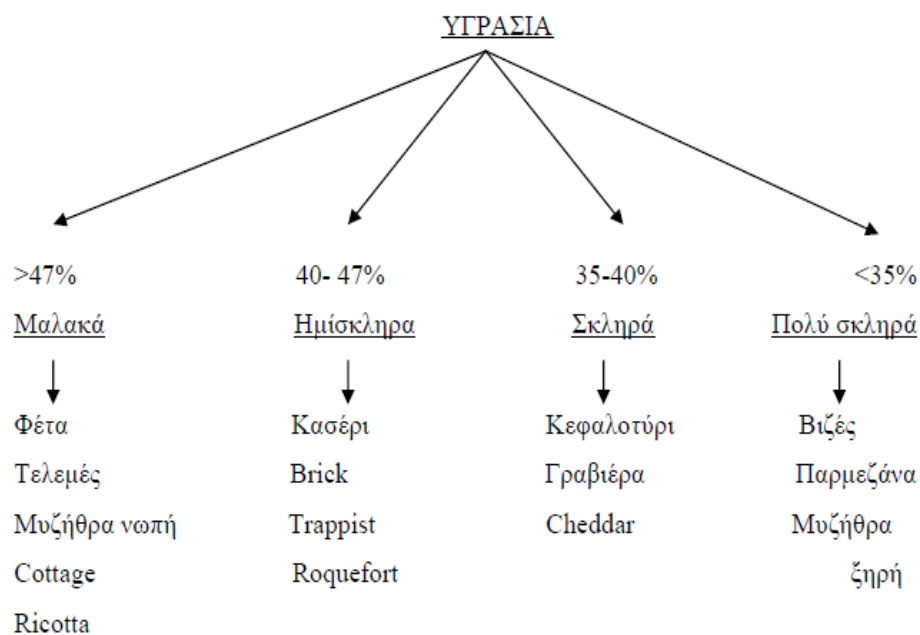
4. Μαλακά:

(α) Ωριμάζουν με βακτήρια : Τελεμές.

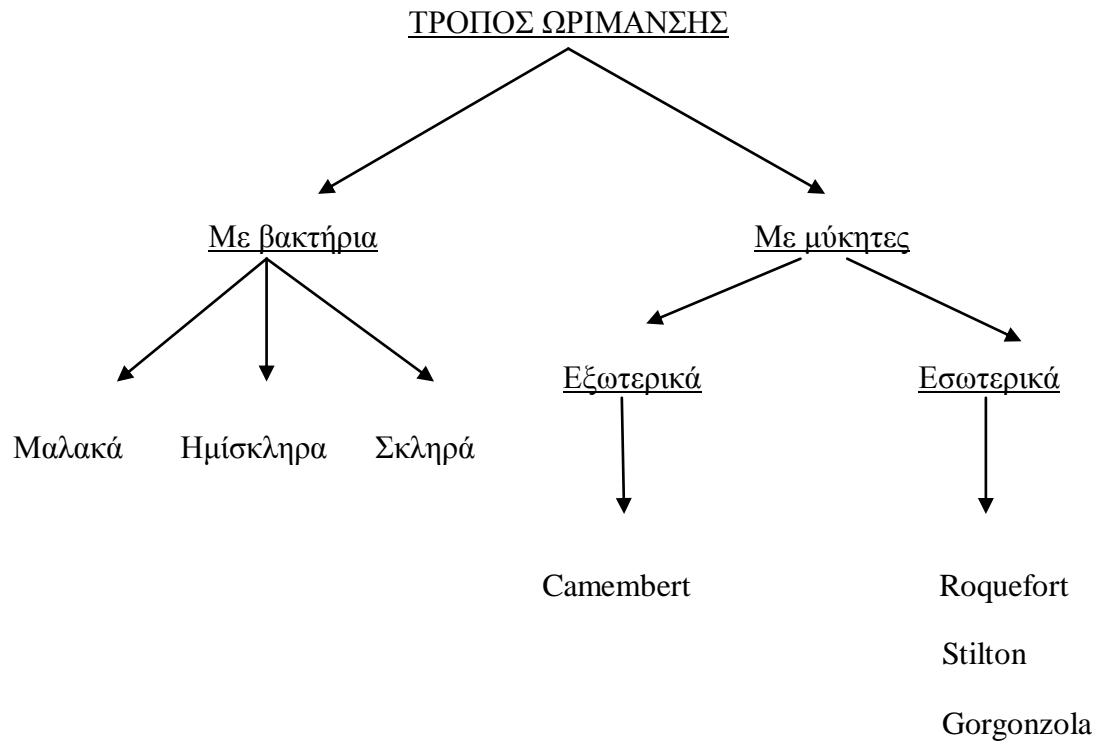
(β) Ωριμάζουν με βακτήρια και μικροοργανισμούς επιφάνειας: Φέτα.

(γ) Ωριμάζουν με μύκητες στο εξωτερικό τους: Camembert.

(δ) Νωπά: Μυζήθρα, Μανούρι, Cottage, Τυριά κρέμας.



Σχ.1 Κατάταξη τυριών με βάση την υγρασία (Ζερφυρίδης, 2001).



Σχ.2: Κατάταξη τυριών με βάση των τρόπο ωριμάνσεώς τους (Ζερφυρίδης, 2001).

2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΤΥΡΙΩΝ

2.1. Υλικά για την παρασκευή των τυριών

Τυρί για να γίνει χρειάζεται η βασική πρώτη ύλη, δηλαδή το γάλα και κατόπιν η πυτιά, η καλλιέργεια και το αλάτι. Άλλες ύλες όπως χρωστικές, χλωριούχο ασβέστιο και διάφορα πρόσθετα είναι δευτερεύουσες καθόσον δεν είναι πάντοτε απαραίτητη η χρησιμοποίησή τους.

Γάλα

Η ποιότητα του γάλακτος είναι ο πρωταρχικός παράγοντας από τον οποίο εξαρτάται η ποιότητα του τυριού οποιουδήποτε είδους. Σαν ποιότητα του γάλακτος πριν από την τυροκόμησή του νοείται κάθε τι που έχει σχέση με τη μικροβιολογική και τη χημική του κατάσταση.

Πυτιά

Η χαρακτηριστική φάση στην τεχνολογία παραγωγής όλων των τυριών είναι η πήξη της πρωτεΐνης και η παγίδευση του λίπους μέσα στο πήγμα.

Καλλιέργεια

Η χρησιμοποίηση καλλιέργειας αποτελεί το επίκεντρο της τυροκομίας και σ' αυτήν αποδίδεται το 90% της επιτυχίας ενός τυριού. Έτσι δίκαια η καλλιέργεια θεωρείται σαν η καρδιά της τυροκομίας

Αλάτι

Το αλάτι της τυροκομίας πρέπει να είναι καθαρό. Ακάθαρο αλάτι σημαίνει προσθήκης άγνωστης μικροχλωρίδας στο τυρί αλλά είναι δυνατόν σε ακραίες περιπτώσεις να αλλάξει ακόμη και το φυσιολογικό χρώμα του τυριού προς το σκούρο χρώμα εάν περιέχει υπολείμματα χρώματος από τις αλυκές όπου παράγεται (Ζερφυρίδης, 2001).

2.2. Είδη τυριών

- **Πλαθόμενα τυριά** . (pasta filata – ορολογία και τεχνολογία συνδεδεμένη με αρκετά ιταλικά τυριά) . Πριν σχηματοποιηθούν , η τυρομάζα τους ζυμώνεται σε ζεστό νερό ή άλμη (Mozzarella, Provolone, Κασέρι) .
- **Τυριά τυρογάλακτος**. Τα τυριά αυτά παρασκευάζονται από τυρόγαλα (είναι δυνατή η προσθήκη γάλακτος ή κρέμας ως πρόσγαλα) με θέρμανση και οξίνιση (Μυζήθρα, Ανθότυρος, Μανούρι, Ricotta) ή συμπύκνωση (Σκανδιναβικά τυριά όπως το Brunost).
- **Τυριά άλμης**. Είναι συνήθως μαλακά τυριά που ωριμάζουν και διατηρούνται σε άλμη (Φέτα, Τελεμές, Domiati).
- **Τυριά τύπου Emmental με οπές**. Τα τυριά αυτά, μετά από προσθήκη ειδικών καλλιέργειών υφίστανται προπιονική ζύμωση, με αποτέλεσμα την εμφάνιση οπών στη μάζα τους (Emmental, Γραβιέρα) .
- **Τυριά με εμφανή ανάπτυξη μικροοργανισμών**. Σε ορισμένα τυριά δημιουργούνται κατάλληλες συνθήκες για ανάπτυξη μυκήτων ή βακτηρίων στην επιφάνεια (Camembert, Brie, Limburger) ή στο εσωτερικό (Roquefort, Μπλε, Stilton, Gorgonzola).
- **Ανακατεργασμένα τυριά** . Ανακατεργασμένα τυριά (processed cheeses) ή τηγμένα τυριά (fromages fondus) και ανακατεργασμένα τυριά με αλοιφώδη υφή (spreadable processed cheeses) χαρακτηρίζονται τα προϊόντα που παρασκευάζονται με άλεση, ανάμιξη, τήξη, και γαλακτοματοποίηση διαφόρων ειδών τυριών με θέρμανση και προσθήκη γαλακτοματοποιητων με ή χωρίς την προσθήκη προϊόντων γάλακτος και/ή άλλων τροφίμων. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται συνήθως κατά την παρασκευή τους κυμαίνονται από 70°C – 90°C για 3-4 λεπτά (ή στους 130°C – 145°C για μερικά δευτερόλεπτα). Υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία ανακατεργασμένων τυριών στην αγορά, με πολύ διαφορετικά χαρακτηριστικά και σύνθεση (Κεχαγιάς, 1997).

2.3. Τυριά τυρογάλακτος

Το γάλα μετά την τυροκόμησή του εξακολουθεί να έχει πρωτεΐνες του γάλακτος που έχουν και υψηλότερη βιολογική αξία σε σύγκριση με την καζεΐνη η οποία πηγαίνει στο τυρί. Έτσι μπορεί το τυρόγαλα να ξανατυροκομηθεί με θέρμανση και οξίνιση. Τα τυριά που λαμβάνονται είναι τα <<τυριά τυρογάλακτος>> με αντιπροσωπευτικό ελληνικό τυρί τη Μυζήθρα και τα τυριά τύπου μυζήθρας όπως ο Ανθότυρος και το Μανούρι (Ζερφυρίδης, 2001).

2.3.1. Παρασκευή τυριών τυρογάλακτος

Αν και το τυρόγαλα είναι παραπροϊόν της τυροκομίας είναι δυνατόν ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία να επαναχρησιμοποιηθεί στην παραγωγή τυριών λόγω των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών που περιέχει.

Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να ανακτηθούν με τρεις βασικούς τρόπους:

1. Θέρμανση και οξίνιση του τυρογάλακτος όποτε λαμβάνεται τυρόπηγμα για την παραγωγή τυριών Μυζήθρας, Ricotta και τα όμοια με αυτά τυριά.
2. Συμπύκνωση του τυρογάλακτος μέχρι να ληφθεί πυκνόρρευστος πολτός που δίνει τα τυριά τύπου Mysost που καταναλώνονται στις Σκανδιναβικές χώρες. Τα τυριά αυτά επειδή περιέχουν και τη λακτόζη έχουν γλυκίζουσα γεύση και είναι χρώματος ελαφρώς καφέ. Αν και είναι κατάλληλα από άποψη θερμίδων για το κλίμα της περιοχής όπου παράγονται, δεν παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τον τόπο μας.
3. Υπερδιήθηση ή αντίστροφη όσμωση για συμπύκνωση του τυρογάλακτος στο οποίο ακολούθως γίνεται μετουσίωση των πρωτεϊνών ώστε να μπορέσει να ανακατευθεί με το τυροκομούμενο γάλα για να αυξηθεί η απόδοσή του σε τυρί.

Από τις παραπάνω μεθόδους στη χώρα μας εφαρμόζεται η πρώτη για την παραγωγή Μυζήθρας (Ζερφυρίδης, 2001).

α. Παρασκευή Μυζήθρας

Η Μυζήθρα παράγεται στην Ελλάδα παραδοσιακά από αιγοπρόβειο τυρόγαλα που είναι πλουσιότερο από το αγελαδινό τυρόγαλα σε υδροδιαλυτές πρωτεΐνες κι έτσι η χρησιμοποίησή του για παραγωγή Μυζήθρας είναι απλούστερη και η απόδοσή του μεγαλύτερη.

Όταν το τυρόγαλα πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για Μυζήθρα δεν αποκορυφώνεται διότι το λίπος πηγαίνει στη Μυζήθρα κι έτσι δεν χάνεται αλλά και η Μυζήθρα γίνεται πιο εύγεστη

Η αρχική οξύτητα του τυρογάλακτος πρέπει να είναι pH 6.3 – 6.4 και η ογκομετρούμενη οξύτητά του 9-11^oD. Το να ξεκινήσει κανείς με χαμηλή οξύτητα δηλαδή φρέσκο τυρόγαλα συντελεί στο να θρομβωθεί και να συσσωματωθεί η πρωτεΐνη του τυρογάλακτος καλύτερα όποτε η περισυλλογή της από το καζάνι είναι ευκολότερη και η απόδοση μεγαλύτερη.

Κατά τη θέρμανση η αλβουμίνη και η γλοβουλίνη μετουσιώνονται και χάνουν τη φυσική τους ενυδάτωση οπότε αρχίζουν να σχηματίζουν μικρούς θρόμβους. Για να γίνει καλή θρόμβωση και συσσωμάτωση των θρόμβων πρέπει μετά τη θέρμανση να ακολουθήσει και η ρύθμιση του pH στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών αυτών όπου η διαλυτότητά τους είναι η ελάχιστη δυνατή όποτε επέρχεται το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Η μετουσίωση των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος αρχίζει στους 62^oC και σχεδόν ολοκληρώνεται στους 96^oC. Οι θρόμβοι (κόκκοι) όμως του τυρογάλακτος αρχίζουν να φαίνονται στους 80-83^oC. Μπορεί να λεχθεί ότι η μετουσίωση πρακτικά συντελείται στους 77^oC σε μια ώρα, στους 80^oC σε μισή ώρα και στους 90^oC σε 5 λεπτά. Συνήθως είναι προτιμότερη η μεγάλη θερμοκρασία σε μικρή διάρκεια αλλά σ' αυτή την περίπτωση πρέπει να προσεχθεί ώστε η τελική θερμοκρασία να επιτευχτεί περίπου σε 45 λεπτά. Έτσι δίνεται χρόνος στις πρωτεΐνες να μετουσιωθούν καλά και να είναι η απόδοση υψηλή. Αν δηλαδή ξεκινήσει κανείς με τυρόγαλα θερμοκρασίας 30^oC μπορεί να ρυθμίσει τη θέρμανση να ανεβαίνει 1.5^oC/λεπτό μέχρι 75^oC και κατόπιν 1^oC/λεπτό μέχρι 90^oC δηλαδή συνολικά η θέρμανση να έχει διάρκεια 45 min.

Αν είναι να προστεθεί γάλα στο τυρόγαλα, αυτό γίνεται σε δυο ή και περισσότερες δόσεις όταν η θερμοκρασία του τυρογάλακτος είναι 68-72^oC. Αυτό γίνεται για τον

παραπάνω λόγο που το τυρόγαλα πρέπει να κρατηθεί στην περιοχή αυτή των θερμοκρασιών περισσότερο χρόνο για να γίνει η μετουσίωσή του καλύτερα.

Μετά τη θέρμανση ακολουθεί ρύθμιση του pH ώστε αυτό να είναι στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος. Η αλβουμίνη όμως και η γλοβουλίνη έχουν διάφορα κλάσματα που το καθένα έχει το δικό του ισοηλεκτρικό σημείο. Γενικά είναι παραδεκτό ότι το άριστο σημείο οξύτητας είναι το pH 5.2 που είναι κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο της β-λακτογλοβουλίνης η οποία αποτελεί και τη μισή ποσότητα των πρωτεϊνών τυρογάλακτος. Αναφέρονται όμως και σαν άριστα pH και 5.5-5.8. Αυτό εξαρτάται από τη γενική φυσικοχημική κατάσταση του τυρογάλακτος και την παρουσία ιόντων ασβεστίου τα οποία όταν είναι αυξημένα η θρόμβωση και συσσωμάτωση γίνεται σε υψηλό pH.

Για να γίνει ρύθμιση του pH χρησιμοποιείται συνήθως κιτρικό οξύ ή οξικό οξύ σε διάλυμα 10%. Πιο εύχρηστο είναι το κιτρικό οξύ διότι είναι στερεό και χρησιμοποιείται σε μικρότερη ποσότητα παρότι το οξικό. Όταν χρησιμοποιηθεί διαλύονται 600g από αυτό σε 6 περίπου λίτρα νερού βρύσης για κάθε τόνο τυρογάλακτος και το διάλυμα μπαίνει στο τυρόγαλα σε χρόνο περίπου ενός λεπτού με ανάδευση όταν η θερμοκρασία του είναι 90°C, εφόσον το αρχικό pH του τυρογάλακτος είναι >6.4 και σε χαμηλότερη θερμοκρασία εφόσον αυτό είναι <6.4. Σχεδόν αμέσως εμφανίζονται σαν χιονονιφάδες οι θρόμβοι της πρωτεΐνης όποτε σταματά η ανάδευση ενώ οι θρόμβοι όλο και μεγαλώνουν λόγω συσσωμάτωσης και ανεβαίνουν στην επιφάνεια.

Το τυρόπηγμα που σχηματίστηκε ψήνεται για λίγα ακόμη λεπτά στους 90°C και κατόπιν αφήνεται στο καυτό τυρόγαλα μέχρι 20 λεπτά για να θρομβωθεί όλη η πρωτεΐνη, να συγκολληθούν οι κόκκοι της και να αποκτήσει το τυρόπηγμα σκληρότητα όποτε μπορεί να μαζευτεί εύκολα χωρίς απώλειες. Εξάλλου έτσι το τυρόπηγμα γίνεται συνεκτικό, με μικρότερη υγρασία και διατηρείται περισσότερο. Επίσης κατά τη διάρκεια αυτή συνεχίζεται η ελαφρά παροχή θέρμανσης του τυρογάλακτος για να μη χάσει τη θερμοκρασία του και για να κρατήσει το πήγμα της Μυζήθρας στην επιφάνεια με την κίνηση του τυρογάλακτος από κάτω προς τα επάνω (Ζερφυρίδης, 2001).

Το τυρόπηγμα που είναι μαζεμένο στην επιφάνεια του τυρογάλακτος μπορεί να μαζευτεί με τσαντίλα όπως στη Γραβιέρα ή με τρυπητή κουτάλα. Μπορεί επίσης να γίνει απορροή του τυρογάλακτος να μείνει η Μυζήθρα η οποία μπαίνει σε δοχεία όπου μένει να κατέβει η θερμοκρασία γύρω στους 45⁰C. Ακολουθεί προσθήκη καλλιέργειας 1% από διάφορους γαλακτικούς στρεπτόκοκκους και άλατος περίπου 2% στο τελικό προϊόν, εφόσον πρόκειται να γίνουν τέτοιες προσθήκες στη Μυζήθρα, διαφορετικά το πήγμα μπαίνει απευθείας στα καλούπια.

Στην επιφάνεια του τυροπήγματος μέσα στα καλούπια τοποθετείται ίσο με αυτά βάρος για να στραγγίσουν. Η πίεση του τυροπήγματος της Μυζήθρας δεν αποδίδει και πολύ στη στράγγιση διότι οι πρωτεΐνες τυρογάλακτος δεσμεύουν και συγκρατούν ισχυρά το νερό. Η πίεση πρέπει να γίνεται όταν ακόμα το τυρόπηγμα είναι ζεστό γιατί όταν κρυώσει δημιουργείται ήδη η δομή του τυριού και η υγρασία δεν αποβάλλεται. Την επόμενη μέρα βγαίνουν τα τυριά από τα καλούπια, αφήνονται σε θερμοκρασία 22⁰C περίπου και σχετική υγρασία 80-85% και την μεθεπόμενη εμβαπτίζονται σε διάλυμα 15% σορβικού καλίου ή ψεκάζονται με αυτό και επανατοποθετούνται στην τυροτράπεζα. Μετά από 5 μέρες τα τυριά συσκευάζονται σε ctyonas και φέρονται σε ψυγείο σε 8⁰C. Η κατανάλωσή τους, εφόσον χρησιμοποιηθούν καλλιέργειες, μπορεί να παραταθεί για δυο μήνες και αν τοποθετηθούν σε ψυγείο 4-5⁰C διατηρούνται μέχρι και 6 μήνες.

Η Μυζήθρα μπορεί να δοθεί στην κατανάλωση και από την επόμενη μέρα της παραγωγής της με ή χωρίς καλλιέργεια και επίσης με ή χωρίς αλάτι. Αλατισμένη Μυζήθρα μπορεί επίσης να σφραγισθεί σε δοχεία και να διατηρηθεί σε ψυγεία για να διατεθεί για τυρόπιτες και άλλες χρήσεις (Ζερφυρίδης, 2001).

β. Παρασκευή ανθότυρου

Ο Ανθότυρος είναι Μυζήθρα βελτιωμένης μορφής με αυξημένη λιποπεριεκτικότητα και μειωμένη υγρασία, πιο συνεκτική τυρώδη πάστα κρεμώδους μάλλον υφής και λιγότερο κοκκώδους απ'ότι η Μυζήθρα. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη γάλακτος στο τυρόγαλα με ή χωρίς κρέμα. Το γάλα αυτό λέγεται «**πρόσγαλα**» και καλύτερα είναι να προστίθεται στο τυρόγαλα σε θερμοκρασία περίπου 70⁰C, γι'αυτό όταν το πρόσγαλα είναι πολύ μπαίνει στο τυρόγαλα σε δυο ή τρεις δόσεις.

Η ποσότητα του προσγάλακτος είναι συνήθως 10% του τυρογάλακτος μπορεί όμως να είναι και λιγότερο αλλά να προστεθεί κρέμα μαζί με το πρόσγαλα. Το προστιθέμενο πρόσγαλα είναι από το είδος του γάλακτος που προήλθε το τυρόγαλα αλλά όταν υπάρχει κασικίσιο γάλα προτιμάται γιατί δίνει γεύση καλύτερη στον Ανθότυρο και η πάστα του γίνεται πιο συνεκτική απ' ότι με τα άλλα είδη γάλακτος.

Τα καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά έχει ο Ανθότυρος ο οποίος γίνεται από τυρόγαλα αιγοπρόβειο με πρόσγαλα αιγοπρόβειο ή κασικίσιο και είναι φρέσκος.

Η σύνθεση του Ανθότυρου που κυκλοφορεί στην αγορά είναι: Υγρασία 66.2±4.5%, λιποπεριεκτικότητα 18.5±4.8%, ολικές πρωτεΐνες περίπου 11.5%, συντελεστής άλατος 1.6% και pH 6.0. Η διαφορετική αυτή σύνθεση του Ανθότυρου από εκείνη της Μυζήθρας οφείλεται στην προσθήκη προσγάλακτος η οποία περιέχει καζεΐνη και λίπος και όσο περισσότερο είναι το πρόσγαλα τόσο μεγαλύτερες είναι οι διαφορές στη σύνθεση.

Η τεχνολογία του Ανθότυρου επομένως είναι όπως της Μυζήθρας με τις διαφορές που προαναφέρθηκαν. Μετά το καλούπιασμα και το στράγγισμα του Ανθότυρου, εισάγεται στο ψυγείο και από την επόμενη μέρα μπορεί να διατεθεί στην κατανάλωση. Η διάθεσή του καλό είναι να γίνεται ύστερα από αεροστεγή συσκευασία σε ειδικές πλαστικές σακούλες για να προστατεύεται από μύκητες και απώλεια υγρασίας (Ζερφυρίδης, 2001).

γ. Παρασκευή μανουριού

Το Μανούρι είναι τυρί ΠΟΠ ΤΗΣ Ευρωπαϊκής Ένωσης. Στην κατηγορία των τυριών τυρογάλακτος είναι το πλέον εύγεστο. Είναι πιο εμφανίσιμο, συνεκτικό και κρεμώδες απ' ό,τι ο Ανθότυρος διότι περιέχει διπλάσιο περίπου πρόσγαλα και κρέμα και κατά συνέπεια περιέχει περισσότερο λίπος και λιγότερη υγρασία απ' ό,τι ο Ανθότυρος.

Η τεχνολογία του Μανουριού με τα σημερινά δεδομένα παραγωγής του είναι ίδια με του Ανθότυρου. Οι διαφορές συνίστανται στις διαφορετικές ποσότητες προσγάλακτος και κρέμας, το διαφορετικό σχήμα και την μερική ωρίμανσή του. Έτσι το Μανούρι έχει σχήμα κυλινδρικό επίμηκες και αφήνεται αρκετό χρονικό διάστημα ώστε να στεγνώσει η επιφάνειά του. Έτσι το Μανούρι μπορεί και να παραφινωθεί σε αντίθεση με τον Ανθότυρο που δεν έχει την δυνατότητα αυτή.

Η παραδοσιακή εντούτοις τεχνολογία του Μανουριού είναι διαφορετική από την σύγχρονη και αξίζει να σημειωθεί. Χρησιμοποιείται τυρόγαλα από κατσίκισιο γάλα ή με πρόσμιξη λίγου πρόβειου. Για την παραγωγή του τυρογάλακτος πήζεται πλήρες κατσίκισιο γάλα σε 32⁰C. Όταν αρχίζει να σχηματίζεται το πήγμα κόβεται σε ψιλά κομμάτια με σύγχρονη ανάδευση με τον τυροκόπτη (χτυπητό κόψιμο) ώστε το λίπος να μένει κατά μεγάλο μέρος στο τυρόγαλα. Η ανάδευση στην αρχή είναι αργή και μετά γρήγορη. Το τυρόπηγμα αναθερμαίνεται μέχρι 50⁰C και εξάγεται από το τυρόγαλα. Συνεχίζει η θέρμανση και ανάδευση, προστίθεται πρόσγαλα 5-10% ή κρέμα στους 70⁰C με συνεχή θέρμανση και ανάδευση μέχρι να εμφανιστούν οι θρόμβοι της πρωτεΐνης στους 90⁰C. Στο σημείο αυτό σταματά η ανάδευση ενώ διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία για 15 περίπου λεπτά για το ψήσιμο του Μανουριού. Ακολούθως συλλέγεται, τοποθετείται σε ηθμούς από πανί (τσαντίλες) ή μεταλλικά καλούπια ορισμένου σχήματος για να υπάρχει ομοιόμορφη εμφάνιση. Αυτό μπορεί μετά από μια μέρα να πουληθεί νωπό αλατισμένο ή μη, ή ξηραίνεται στον ίσκιο σε χαμηλή θερμοκρασία. Στο ξηρό Μανούρι μπορεί να γίνει παραφίνωση.

Το Μανούρι που υπάρχει στην αγορά προέρχεται από όλα τα είδη γάλακτος και τυρογάλακτος και οι τεχνολογίες τους διαφέρουν. Γι' αυτό και η σύνθεση του τυριού δεν είναι σταθερή, έχει: Υγρασία 50.6±9.4%, λίπος 33.7±12.3%, συνολικές πρωτεΐνες περίπου 9.5%, συγκέντρωση άλατος 2.6% και pH 5.0±0.4 (Ζερφυρίδης, 2001).

3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΥΡΙΩΝ

Στο γάλα που τυροκομείται ανευρίσκεται ένα πλήθος μικροβιακών ομάδων που προέρχονται είτε από το γάλα, είτε το επιμολύνουν κατά τη διάρκεια της τυροκόμησης, είτε ακόμα προστίθενται σ' αυτό ως οξυγαλακτική καλλιέργεια. Κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών, συμβαίνουν σημαντικές μεταβολές στους μικροβιακούς αυτούς πληθυσμούς. Οι μεταβολές αρχίζουν με την έναρξη της τυροκόμησης. Το γάλα είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, αποτελώντας έτσι ένα εξαιρετικό υπόστρωμα ανάπτυξης, για τα περισσότερα βακτήρια. Επίσης, οι θερμοκρασίες τυροκόμησης (32-34⁰C) καθώς και εκείνες της πρώτης φάσης ωρίμασης (14-18⁰C) των τυριών άλμης, είναι ιδανικές για την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών. Για αρκετούς όμως από αυτούς, καθώς προχωρεί η ωρίμαση, το περιβάλλον του τυριού γίνεται δυσμενές για την ανάπτυξή τους. Έτσι λοιπόν, η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τη ζύμωση της λακτόζης και η επακόλουθη πτώση του pH, η μείωση της υγρασίας λόγω της στράγγισης, η αύξηση της συγκέντρωσης άλατος, ο μικροβιακός ανταγωνισμός που ασκεί η οξυγαλακτική χλωρίδα κατά των υπόλοιπων μικροβιακών ομάδων και τέλος η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης προκαλούν μείωση των περισσότερων μικροβιακών πληθυσμών είτε παθογόνων είτε εκείνων που προκαλούν ελαττώματα ή αλλοιώσεις στα τυριά.

3.1. Ομάδες σημαντικών μικροοργανισμών στα τυριά

Γαλακτικά βακτήρια

Τα γαλακτικά βακτήρια (LAB) είναι μια ετερογενής ομάδα βακτηρίων, με πολλά κοινά χαρακτηριστικά. Είναι μία ομάδα Gram θετικών βακτηρίων που διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα με βάση τα ιδιαίτερα μορφολογικά, μεταβολικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά τους. Τα βακτήρια αυτά, είναι μη σπορογόνα, προαιρετικά αναερόβιοι κόκκοι και ραβδία, χημικοοργανότροφα, τα οποία παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο τελικό προϊόν κατά τη ζύμωση των υδατανθράκων (ομοζυμωτικά) ή γαλακτικό οξύ και άλλες ενώσεις όπως οξικό οξύ, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και μυρμηγκικό οξύ (ετεροζυμωτικά). Τα γαλακτικά βακτήρια παίζουν σημαντικό ρόλο στην τεχνολογία τροφίμων. Μπορούν να βελτιώσουν το άρωμα και την υφή των τροφίμων και αναστέλλουν την ανάπτυξη των αλλοιωγόνων βακτηρίων.

Παρόλα αυτά, δεν είναι χρήσιμα όλα τα γαλακτικά βακτήρια. Μερικά απ' αυτά μπορεί να εμπλέκονται στην αλλοίωση των τροφίμων ή να είναι δυνητικά παθογόνα (Schleifer et al., 1995).

Μύκητες

Οι μύκητες είναι νηματώδεις οργανισμοί, νηματομύκητες (εκτός από κάποιους κατώτερους μύκητες), δηλαδή το σώμα τους αποτελείται από νήματα, που ονομάζονται υφές. Αναπαράγονται με σπόρια και τα αναπαραγωγικά τους όργανα είναι όργανα σποριογόνου. Αυτά σχηματίζονται όταν το φυτικό μυκήλιο αναπτυχθεί αρκετά ώστε να παραχθεί ποσότητα πρωτοπλάσματος αρκετή για να εξασφαλίσει τη διατροφή τους. Παράγονται σε μεγάλο αριθμό και είναι μικρά, ελαφρά και ανθεκτικά στην αποξήρανση. Για το λόγο αυτό μεταφέρονται εύκολα με τον αέρα, πέφτουν στο έδαφος και με εκβλάστηση αν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές, δίνουν τη νέα φυτική μορφή του μύκητα. Στην παραγωγή ορισμένων τύπων τυριών χρησιμοποιούνται επιλεγμένα στελέχη συγκεκριμένων ειδών μυκήτων, κυρίως του γένους *Penicillium*. Τα στελέχη αυτά δεν πρέπει να παράγουν μυκοτοξίνες. Έτσι το *P. roquefortii* χρησιμοποιείται στην ωρίμανση των τυριών Roquefort και Gorgonzola. Τα είδη *P. camembertii* και *P. caseicolum* χρησιμοποιούνται στην παραγωγή των τυριών Camembert και Brie αντίστοιχα. Εν τούτοις, η ανάπτυξη άλλων ειδών του γ. *Penicillium* καθώς και οι μύκητες των γενών *Mucor*, *Monilia*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, κ.α. προκαλούν ανεπιθύμητες μεταβολές υποβαθμίζοντας την ποιότητα των τυριών. Εμφάνιση ορατών αποικιών μυκήτων στην επιφάνεια των τυριών αποτελεί την πρώτη ένδειξη αλλοίωσης τους που αργότερα συνοδεύεται από ανώμαλες μεταβολές του χρώματος των τυριών και κακοσμία (ICMSF, 1998).

Ζύμες

Οι ζύμες είναι ευαίσθητες στις θερμοκρασίες παστεριώσεως, όμως απαντώνται συχνά στα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα οποία μολύνονται από το περιβάλλον των τυροκομείων. Ιδιαίτερης σημασίας θεωρούνται οι ζύμες που ζυμώνουν τη λακτόζη, διότι μερικές από αυτές χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες για την παρασκευή διάφορων γαλακτοκομικών προϊόντων, ενώ άλλες προκαλούν σφάλματα.

Χαρακτηριστικά των αλλοιώσεων φρέσκων τυριών από ζύμες είναι η παραγωγή αερίου, η κακοσμία και ανεπιθύμητες μεταβολές του χρώματος (Λιτοπούλου Τζανετάκη, 1989).

3.2. Παθογόνα βακτήρια στα τυριά

Το τυρί μπορεί να μολυνθεί από παθογόνα βακτήρια στις αρχικές φάσεις της παρασκευής του ή αργότερα κατά την επεξεργασία. Ιδιαίτερα επικίνδυνη είναι η χρήση μη παστεριωμένου γάλατος.

- **Κολοβακτηρίδια**

Την οικογένεια των εντεροβακτηριοειδών απαρτίζουν διάφορα γένη των οποίων τα είδη είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια, αερόβια ή προαιρετικώς αναερόβια, ασπορογόνα και ζυμώνουν τη γλυκόζη με παραγωγή οξέος και αερίου. Τα κολοβακτηριοειδή συνιστούν μια ομάδα της οικογένειας των εντεροβακτηριοειδών και χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να ζυμώνουν την λακτόζη με παραγωγή οξέος και αερίου. Η παρουσία τους στα τρόφιμα υποδηλώνει, ως ένα βαθμό, μόλυνση του τροφίμου άμεσα ή έμμεσα με εντερικό περιεχόμενο ανθρώπου ή ζώων. Κατά συνέπεια το τρόφιμο περιέχει πιθανώς και άλλους μικροοργανισμούς εντερικής προελεύσεως. Επομένως τα κολοβακτηριοειδή αποτελούν “δείκτη” της υγιεινής καταστάσεως ενός τροφίμου (Kornacki and Johnson, 2001).

- ***E. coli***

Ανήκει στα coliforms και ανευρίσκεται συχνότερα σε νωπά τρόφιμα ζωικής προέλευσης (γάλα, κόκκινα κρέατα, πουλερικά) ή σε ατελώς επεξεργασμένα τρόφιμα. Η εντεροτοξινογόνος *E. coli* προκαλεί συμπτώματα των οποίων η σοβαρότητα εξαρτάται από τις παραγόμενες τοξίνες. Η εμφάνιση των συμπτωμάτων είναι αιφνίδια και σε οξεία μορφή με κύριο χαρακτηριστικό την υδαρή διάρροια η οποία συνοδεύεται από έμετο και κοιλόπονο. Ο πυρετός είναι σπάνιος, αλλά η αφυδάτωση συνήθης και έντονη, με αποτέλεσμα, εφόσον καθυστερήσει η θεραπεία, να απειλείται η ζωή. Η εντεροπαθογόνος *E. coli* προκαλεί επίμονη μεγάλης διάρκειας διάρροια με σοβαρή εντερίτιδα. Τα συμπτώματα εμφανίζονται σε 12-36 ώρες.

Γενικά η *E. coli* δεν αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της τυροκόμησης. Το χαμηλό pH και το αλάτι αναστέλλουν την ανάπτυξή της. Εν τούτοις αν η γαλακτική καλλιέργεια δεν είναι αρκετά δραστική και δεν αναπτυχθεί κανονικά, η *E. coli* μπορεί να αναπτυχθεί και να επιβιώσει κατά την τυροκόμηση (Frank and Marth, 1977, Frank

and Marth, 1978). Τόσο στις Η.Π.Α όσο και σε άλλες χώρες έχουν εκδηλωθεί επιδημίες γαστρεντερίτιδες από μαλακά τυριά μολυσμένα με εντεροπαθογόνο *E. coli* (Marier et al., 1973).

Απεναντίας ο ορότυπος *E. coli* 0157:H7 είναι σχετικά οξυανεκτικός, γεγονός που επιβεβαιώθηκε κατά την τυροκόμηση από τους Reitsema and Henning (1996). Γενικά το πρόβλημα επαναμόλυνσης των τυριών με *E. coli* είναι γνωστό, αλλά είναι εξαιρετικά δύσκολο να προληφθεί τελείως η παρουσία των παθογόνων βακτηρίων στα μαλακά τυριά (Quinto and Capela, 1997, Deschenes et al., 1996).

- **Σαλμονέλα**

Οι σαλμονέλες ανήκουν στην οικογένεια των εντεροβακτηριοειδών (Enterobacteriaceae). Οι σαλμονέλες είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια διαστάσεων 0,6 x 2μm, κινητά με περίτριχες βλεφαρίδες, αερόβια ή προαιρετικώς αναερόβια, μη σπορογόνα και δεν διαθέτουν έλυτρο. Εξαιρέση αποτελούν οι *S.pullorum* και *S.gallinarum* που είναι ακίνητες και οι *S.typhi*, *S.paratyphi* και *S.dublin* που παράγουν ένα ειδικό περίβλημα που μοιάζει με έλυτρο (Edwards, 1972, Buchanan, 1974). Η παρουσία των σαλμονελών στα τρόφιμα είναι ανεπιθύμητη. Οι περισσότερες χώρες έχουν θεσπίσει σταθερότυπους σχετικά με τα ανεκτά επίπεδα σαλμονελών σ' αυτά. Με εξαίρεση τις *S.typhi* και *S.paratyphi* A και C (για τις οποίες η λοιμογόνος δόση στα τρόφιμα είναι από 1-10 κύτταρα) απαιτείται συνήθως μεγάλος σχετικά αριθμός κυττάρων για την πρόκληση τροφολοιμώξεων. Άγνωστος όμως είναι ο ελάχιστος αριθμός κυττάρων των υπολοίπων σαλμονελών τα οποία προσλαμβάνονται από τον άνθρωπο μπορούν να προκαλέσουν λοίμωξη σε αυτόν. Γι' αυτόν το λόγο θα πρέπει να αποτελεί κανόνα, ότι και ένα ακόμη κύτταρο σαλμονέλας είναι ικανό να προκαλέσει λοίμωξη όταν βρίσκεται μέσα σε τρόφιμο στο οποίο μπορούν να δημιουργηθούν κατάλληλες συνθήκες πολλαπλασιασμού ή όταν το τρόφιμο πρόκειται να καταναλωθεί από ευαίσθητα άτομα, όπως παιδιά, γέρους ή ασθενείς. Εξάλλου έχει αποδειχθεί ότι η πρόσληψη από τον άνθρωπο μικρού αριθμού, μη οικολογικά προσαρμοσμένων σ' αυτόν ειδών σαλμονελών, δημιουργεί ασυμπτωματικούς φορείς (Andrews et al., 2001). Οι συνθήκες που μπορεί να αναπτυχθεί η σαλμονέλα είναι: θερμοκρασία από 5,3-54 °C με βέλτιστη τους 35-37°C, pH από 4,5 – 9,5 με βέλτιστο εύρος 6,5 – 7,5 και a_w 0,93 ή μεγαλύτερο.

Τα τυριά, θεωρητικά τουλάχιστον, δεν ανήκουν στα τρόφιμα που είναι επικίνδυνα για σαλμονέλωση. Ωστόσο, το 1984 στον Καναδά εκδηλώθηκε σοβαρή επιδημία γαστρεντερίτιδας από τυρί Cheddar μολυσμένο με *S. muenster* (1500 κρούσματα). Αιτία ήταν ο λανθασμένος χειρισμός σε βαλβίδα ροής που διοχέτευσε νωπό γάλα στους κάδους του παστεριωμένου, έτοιμου για τυροκόμηση γάλακτος. Η λοιμογόνος δόση της σαλμονέλας που επέζησε κατά την ωρίμανση ήταν 1-10 cfu/g τυριού (Wood et al., 1984). Μολονότι σε πολλές αναλύσεις τυριών σπανίως απομονώθηκαν σαλμονέλες, το βακτήριο αυτό μπορεί να αναπτυχθεί κατά τη βιομηχανική παραγωγή του τυριού (Hargrove et al., 1969) και μπορεί να επιβιώσει σε διάφορα τυριά για περισσότερες από 60 ημέρες (White and Custer, 1976, D' Aoust et al., 1985).

- **Σταφυλόκοκκος**

Ένα σοβαρό κίνδυνο υγείας από το τυρί εγκυμονεί ο *S. aureus*. Σε πολλούς τύπους τυριών (μαλακά, ημίσκληρα, σκληρά) η μέγιστη ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου συμβαίνει όταν συμπληρώνεται το στράγγισμα και γενικά πριν το αλάτισμα. Ο μεγάλος αριθμός κυττάρων *S. aureus* στο τυρί ($>10^6$ cfu/g) οδηγεί στην παραγωγή εντεροτοξίνης. Αργότερα, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης οι σταφυλόκοκκοι μειώνονται σημαντικά και μόνο μικρός αριθμός αυτών υπάρχει στο τυρί. Εν τούτοις, η εντεροτοξίνη παραμένει στο τυρί. Η κατανάλωση τέτοιου τυριού οδηγεί στην εκδήλωση σταφυλοκοκκικής τροφοδοξίνωσης (Zehren and Zehren, 1968a,b, Johnson et al., 1990a,b,c).

- **Λιστέρια**

Η *L. monocytogenes* είναι βακτήριο που συνηθέστερα βρίσκεται σε νωπά και κατεψυγμένα κρέατα και πουλερικά, μη παστεριωμένα γαλακτοκομικά ή προϊόντα που υφίστανται ωρίμανση (μαλακά τυριά, παγωτά, νωπό γάλα, κρέμα, βούτυρο) αλλά και σε ωμά λαχανικά (λάχανο, μαρούλι), ιχθυηρά κ.ά. Η λιστερίωση είναι η λοίμωξη που προκαλεί στους μεν υγιείς ενηλίκους ήπια γριππώδη και γαστρεντερικά συμπτώματα, στους δε ανοσοκατεσταλμένους, στους ηλικιωμένους και στα μικρά παιδιά σηψαιμία, μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα και γενικά απειλεί επικίνδυνα τη ζωή τους (Montville and Matthews, 2002).

Η *L. monocytogenes* απομονώνεται συχνά από μη παστεριωμένο γάλα. Το 1985 στην Καλιφόρνια προκλήθηκε ομαδική λιστερίωση μετά από κατανάλωση μεξικάνικου τυριού που παρασκευάστηκε με μη παστεριωμένο γάλα (James et al., 1985, Linnan et al., 1988). Την ίδια περίοδο αναφέρθηκαν και άλλες λιστερίώσεις από μολυσμένα μαλακά τυριά (Bannister, 1987, Bille and Glauser, 1988). Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης της *L. monocytogenes* σε μαλακά τυριά και σε τυριά που ωριμάζουν με μύκητες επιβεβαιώθηκε σε μελέτες που έγιναν σε Η.Π.Α., Γαλλία, Ιταλία, Δανία, Κύπρο, Ισπανία, Ελβετία και Γερμανία (Ryser and Marth, 1991). Η σημασία της παρουσίας της *L. monocytogenes* στη βιομηχανία παρασκευής τυριών έχει αναφερθεί αρκετά συχνά (Gellin and Broome, 1989, Griffiths, 1989, Pearson and Marth, 1990, Ryser and Marth, 1991). Διαπιστώθηκε ότι το βακτήριο αναπτύχθηκε κατά τη βιομηχανική παρασκευή των τυριών Φέτα, Camembert, Brie και Blue cheese. Η ανάπτυξή του σχετίστηκε με την αύξηση του pH των τυριών κατά την ωρίμανση. Ακόμα η *L. monocytogenes* απομονώθηκε από την άλμη των τυριών Φέτα και Brie.

3.3. Μικροβιολογικός έλεγχος γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων

Σύμφωνα με την Κοινοτική Νομοθεσία το νωπό γάλα πριν υποστεί οποιαδήποτε θερμική ή άλλου είδους επεξεργασία θα πρέπει να πληρεί κάποια κριτήρια, όπως αναφέρονται παρακάτω. Θα πρέπει να προέρχεται από ζώα τα οποία :

- Είναι απαλλαγμένα από λοιμώδη νοσήματα, τα οποία θα μπορούσαν μέσω του γάλακτος να μεταδοθούν στον άνθρωπο.
- Είναι υγιή και δεν παρουσιάζουν κανένα σύμπτωμα νόσου το οποίο μπορεί να προκαλέσει μόλυνση του γάλακτος και πιο συγκεκριμένα δεν παρουσιάζουν καμία λοίμωξη της ουρογεννητικής οδού με απέκκριμα, εντερίτιδα με εμπύρετη διάρροια ή από φλεγμονή του μαστού.

- Δεν παρουσιάζουν πληγές στους μαστούς που θα μπορούσαν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στο γάλα.
- Δεν έχουν λάβει μη επιτρεπόμενες ουσίες ή προϊόντα.
- Δεν έχουν υποβληθεί σε παράνομες φαρμακευτικές αγωγές σύμφωνα με την Οδηγία 96/23/ΕΟΚ, 97/747/ΕΟΚ, 2002/657.

Σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων ισχύουν οι παρακάτω μικροβιολογικές προδιαγραφές για το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Μικροβιολογικές προδιαγραφές γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων [κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής των Ευρωπαϊκών κοινοτήτων]

Κατηγορία τροφίμου	Μικροοργανισμοί	Σχέδιο δειγματοληψίας		Όρια	
		n	c	m	M
Παστεριωμένο γάλα και άλλα παστεριωμένα υγρά γαλακτοκομικά προϊόντα	Enterobacteriaceae	5	2	1 cfu/ml	5 cfu/ml
Τυριά από γάλα ή ορό γάλακτος που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία	<i>E. coli</i>	5	2	10 ² cfu/g	10 ³ cfu/g
Τυριά από νωπό γάλα	Σταφυλόκοκκοι θετικοί στην πηκτάση	5	2	10 ⁴ cfu/g	10 ³ cfu/g
Τυριά γάλακτος με θερμ. επεξεργασία χαμηλότερη της παστερίωσης ή <u>ωριμασμένα τυριά</u> από γάλα ή ορό γάλακτος με παστερίωση ή ισχυρότερη θερμική επεξεργασία	Σταφυλόκοκκοι θετικοί στην πηκτάση	5	2	10 ² cfu/g	10 ³ cfu/g
Μη ωριμασμένα μαλακά τυριά (νωπά τυριά) από γάλα ή ορό γάλακτος με παστερίωση ή ισχυρότερη θερμική επεξεργασία	Σταφυλόκοκκοι θετικοί στην πηκτάση	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g
Βούτυρο και κρέμα από νωπό γάλα με επεξεργασία χαμηλότερη της παστερίωσης	<i>E. coli</i>	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g
Σκόνη γάλακτος και σκόνη ορού γάλακτος	Enterobacteriaceae	5	0	10 cfu/g	
	Σταφυλόκοκκοι θετικοί στην πηκτάση	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g

4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της πτυχιακής εργασίας ήταν να μελετηθεί η μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας του μανουριού όταν αυτό συντηρείται στους 5 °C για χρονικό διάστημα 30 ημερών. Οι αναλύσεις που έγιναν εκτελέστηκαν την πρώτη (1^η) ημέρα, την δέκατη (10^η) ημέρα , την εικοστή (20^η) ημέρα και την τριακοστή (30^η) ημέρα μετά την ημερομηνία παραγωγής. Οι καταμετρήσεις έγιναν σε δύο διαδοχικές παρτίδες του τροφίμου και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν στατιστικά με το πρόγραμμα MINITAB14. Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν στις παρακάτω μικροβιολογικές αναλύσεις:

1. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)
2. Αρίθμηση ψυχρότροφων
3. Αρίθμηση κολοβακτηριοειδών (coliforms)
4. Αρίθμηση *E. coli*
5. Αρίθμηση σταφυλόκοκκων
6. Αρίθμηση *Listeria* spp.
7. Αρίθμηση μυκήτων – ζυμών

5. ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΕΝΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

5.1 Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ή ΣΑΜ: Συνολικός Αριθμός Μεσόφιλων)

Η πιο συνηθισμένη τεχνική αρίθμησης των μικροβίων στα τρόφιμα είναι η “Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα “ γνωστή και ως “ Aerobic Plate Count “ ή “ Aerobic Mesophilic Count “ ή “ Standard Plate Count “. Κατά την τεχνική αυτή προστίθεται ορισμένη ποσότητα του τροφίμου στο Plate Count agar (pH 7,0-7,4) με σκοπό να ευνοηθεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Το pH του υποστρώματος αυτού ρυθμίζεται σε 7,0-7,4. Τα μεμονωμένα βακτηριακά κύτταρα που μεταφέρονται στο τρυβλίο διαιρούνται κατά τη διάρκεια της επώασης (κάτω από αερόβιες συνθήκες) με αποτέλεσμα στην επιφάνεια του υποστρώματος να αναπτυχθούν αποικίες οι οποίες στη συνέχεια καταμετρούνται.

Οι θερμοκρασίες επώασης που επιλέγονται εξαρτώνται από τα βακτήρια που εξετάζονται. Για τα θερμοφιλά βακτήρια χρησιμοποιούνται θερμοκρασίες 55 ± 2 °C, για τα μεσόφιλα 35-37 °C και για τα ψυχρόφιλα 5 °C.

Τα αποτελέσματα της εκτίμησης του μικροβιακού φορτίου ενός τροφίμου εκφράζονται σε “ μονάδες που σχηματίζουν αποικίες “, (c.f.u: colony forming units/ g τροφίμου).

5.2 Ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί

Υπάρχει σύγχυση σχετικά με τον ορισμό των μικροβίων που αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Σύμφωνα με ορισμένους, ψυχρόφιλα είναι τα μικρόβια που έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 15 °C, μέγιστη θερμοκρασία < 20 °C και ελάχιστη < 0 °C. Σύμφωνα με άλλους, μικρόβια που αναπτύσσονται στους 0 °C, αλλά

με διαφορετική άριστη και μέγιστη θερμοκρασία από τα ψυχρόφιλα, ονομάζονται ψυχρότροφα (Δεληγκάρης, 2004).

Τα περισσότερα ψυχρόφιλα είναι ευαίσθητα σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από τους 10 °C και γι' αυτό παρουσιάζουν μικρότερη σημασία από τα ψυχρότροφα στην επεξεργασία των τροφίμων.

Τα ψυχρότροφα βακτήρια αναπτύσσονται καλύτερα σε μέτριες θερμοκρασίες και γι' αυτό μπορεί να θεωρηθούν ως υποομάδα μεσοφίλων που είναι ικανά να αναπτυχθούν κάτω από την ελάχιστη θερμοκρασία των μεσοφίλων. Σύμφωνα με τον Παπαντωνίου (2011) τα ψυχρότροφα είναι μεσόφιλα βακτήρια (άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 25-30°C) που έχουν όμως την ικανότητα να αναπτύσσονται και σε θερμοκρασίες οικιακού ψυγείου (3-5°C) εντός 10 ημερών. Γι αυτό χαρακτηρίζονται και σαν μεσόφιλα-ψυχρότροφα. Στην ομάδα αυτή ανήκουν βακτήρια ιδιαίτερα σημαντικά στη Μικροβιολογία Τροφίμων, διότι προκαλούν αλλοιώσεις σε τρόφιμα συντηρούμενα υπό ψύξη. Πρόκειται για Gram-αρνητικά βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Brochothrix*, *Serratia*, κ.α. Από τα παθογόνα βακτήρια, ψυχρότροφα είναι το *C. botulinum* τύπου E, η *Listeria monocytogens* και η *Yersinia enterocolitica* (Παπαντωνίου, 2011). Μεταξύ των ζυμών, ψυχρότροφα στελέχη απαντούν στα γένη *Candida*, *Torulopsis*, *Cryptococcus* και *Rhodotorula*. Ψυχρότροφοι μύκητες υπάρχουν στα γένη *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichothecium*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Botrytis*.

Πολλοί ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί, όταν υπάρχουν σε μεγάλο αριθμό, μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στα τρόφιμα (ανωμαλίες στη γεύση, τη χροιά και την οσμή). Η ταχύτητα της αναπτύξεώς τους εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Γι' αυτό η διάρκεια ζωής, η ταχύτητα υποβαθμίσεως της ποιότητας και επομένως η αλλοίωση

ενός τροφίμου που διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία εξαρτάται από τη θερμοκρασία συντηρήσεως.

Η καταμέτρηση των ψυχρότροφων μικροβίων των τροφίμων που θα συντηρηθούν σε χαμηλές θερμοκρασίες ψυγείου (0 °C έως 10 °C) είναι σημαντική, διότι η παρουσία τους (ιδίως σε μεγάλο αριθμό) αποτελεί δείκτη δυνητικής αλλοιώσεως κατά την διάρκεια της παρατεταμένης συντηρήσεως.

Οι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί δεν αναπτύσσονται στους -17 έως -20 °C, θερμοκρασίες στις οποίες συντηρούνται τα κατεψυγμένα τρόφιμα. Αν όμως τα τρόφιμα αυτά λιώσουν κατά τη διάρκεια διατηρήσεώς τους σε θερμοκρασίες ψυγείου στις αίθουσες πωλήσεως, τότε τα ψυχρότροφα μικρόβια πολλαπλασιάζονται και αλλοιώνουν το προϊόν. Μερικά είδη μικροβίων μπορούν να αναπτυχθούν αργά ακόμα και στους -5 έως -12 °C. Ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων που διατηρούνται σε τόσο χαμηλές θερμοκρασίες από τη μικροβιακή δράση παρουσιάζεται ύστερα από μακριά περίοδο συντηρήσεως (Δεληγκάρης, 2004).

5.3 Οικ. Enterobacteriaceae

Τα εντεροβακτηριακά είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια κυλινδρικά διαστάσεων 0,5 x 3 μm, προαιρετικά αναερόβια, ασπορογόνα, κινούμενα με περίτριχες βλεφαρίδες ή ακίνητα. Όλα ζυμώνουν την γλυκόζη με παραγωγή οξέος και συχνά με αέριο.

Η οικογένεια Enterobacteriaceae υποδιαιρείται σε 29 γένη, βασισμένη στις γενετικές ιδιότητες και περισσότερο στα βιοχημικά χαρακτηριστικά και στην παθογένεια. Τα συχνότερα γένη είναι : *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Yersinia*, *Proteus*, *Providencia* (Kornucki and Johnson, 2001).

5.3.1 Κολοβακτηριοειδή (coliforms)

Τα βακτήρια των γενεών *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* αποτελούν την ομάδα των κολοβακτηριοειδών ή κολοβακτηριοειδίουμορφων (ή coliforms στην αγγλική βιβλιογραφία). Αυτά έχουν τα γνωρίσματα της οικογ. Enterobacteriaceae. Τα βακτήρια αυτά χρησιμεύουν ως δείκτες εντερικής ρυπάνσεως των τροφίμων, δηλαδή η παρουσία τους στα τρόφιμα δείχνει ότι το τρόφιμο αυτό έχει ρυπανθεί με κόπρανα και πιθανόν να είναι μολυσμένο με εντεροπαθογόνα βακτήρια. Για αυτό έχουν μεγάλη σπουδαιότητα για την δημόσια υγεία. Όλα τα γένη που αποτελούν τα κολοβακτηριοειδή δεν έχουν την ίδια αξία ως δείκτες.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα η *Escherichia coli* είναι βέβαιης εντερικής προέλευσης που η παρουσία της στα τρόφιμα σημαίνει βέβαιη εντερική ρύπανση. Ενώ η *Klebsiella* είναι πιθανής εντερικής προελεύσεως (Δεληγκάρης, 2004).

Τα coliforms είναι ευρέως διαδεδομένα και βρίσκονται κυρίως στο έδαφος, στο νερό, στα λαχανικά και στον εντερικό σωλήνα των ζώων.

Κοινό γνώρισμά τους είναι η ικανότητά τους να ζυμώνουν τη λακτόζη γρήγορα σε οξύ και σε αέριο (Αρσένη, 2000).

Τα coliforms αναπτύσσονται καλά σε peptone, meat extract & Mac' Conkey broth. Η ζύμωση της λακτόζης μετά παραγωγής οξέος και αερίου (όγκου > 1/10 του όγκου του σωληνίσκου) αποτελεί ένδειξη της παρουσίας κολοβακτηριδίουμορφων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε "προκαταρκτικός MPN coliforms/ g ή ml τροφίμου" (Δεληγκάρης, 2004).

5.3.2 *Escherichia coli*

Η *E. coli*, γνωστή σαν κολοβακτηρίδιο είναι το πιο αντιπροσωπευτικό είδος της οικογένειας Enterobacteriaceae, το πιο πολυάριθμο μικρόβιο στο σώμα και το περιβάλλον του ανθρώπου (Αρσένη, 2000).

Είναι Gram αρνητικό βακτήριο, αερόβιο, ασπορογόνο, κυλινδρικό με διαστάσεις 1,1-1,5 x 2-6 μm (ζωντανά) ή 0,4-0,7 x 1-3 μm (χρωματισμένα), μονά, σε ζεύγη και κινητά με περίτριχες βλεφαρίδες ή ακίνητα. Για τον προσδιορισμό και τη ταυτοποίηση της *E. coli* χρησιμοποιούνται κυρίως τα υποστρώματα Brilliant Green broth ή Mc' Conkey broth και το πεπτονούχο νερό ως επιβεβαιωτική δοκιμή. Η

ζύμωση της λακτόζης με παραγωγή οξέος και αερίου υποδηλώνει ένδειξη θετική και έτσι ακολουθεί η δοκιμή της ινδόλης, στην οποία χρησιμοποιείται αντιδραστήριο Kovacs. Το αποτέλεσμα θεωρείται θετικό για *E. coli*, όταν εμφανιστεί κόκκινο χρώμα στο δακτύλιο του αντιδραστήριου, ενώ εάν εμφανιστεί κίτρινο χρώμα, η δοκιμή είναι αρνητική. Η απομόνωση της *E. coli* από ένα τρόφιμο σημαίνει ρύπανση αυτού με εντερικό περιεχόμενο και άρα πιθανόν να υπάρχουν στο τρόφιμο παθογόνα μικρόβια εντερικής προέλευσης (Kornucki and Johnson, 2001).

Οι βιοχημικές, δηλαδή οι σακχαροδιασπαστικές, και άλλες ενζυμικές-βιολογικές ιδιότητες της *E. coli* αποτελούν σταθερό γνώρισμα, που επιτρέπει τη χρήση τους για ταυτοποιητικούς σκοπούς. Στις ιδιότητες αυτές στηρίζονται τα περισσότερα σχήματα ταυτοποιήσεως και διαχωρισμού γενών και ειδών. Έτσι η *E. coli* εκτός από την γλυκόζη και τη λακτόζη ζυμώνει και διάφορα άλλα σάκχαρα όπως τημανιτόλη, τη μαλτόζη, και αρκετά στελέχη τη σουκρόζη, την σαλικίνη και την δουλσιτόλη (Αρσένη, 2000).

Τρόφιμα που μπορεί να είναι πιθανές πηγές *E. coli* είναι το νωπό γάλα, το ωμό και το μισοψημένο βόειο κρέας και άλλα ερυθρά κρέατα, το ελλιπώς παστεριωμένο γάλα, ωμά αλιεύματα-οστρακοειδή, μαρούλια, απαστερίωτος χυμός μήλου και άλλα (Meng et al.). Μολυσμένο νερό έχει θεωρηθεί επίσης υπεύθυνο για μολύνσεις με *E. coli*. Η επιμόλυνση των τροφίμων γίνεται κατά την εκσπλάγχχιση των σφαγίων, στους οπωρώνες, από τα ζώα και τα περιττώματά τους που έρχονται σε επαφή με τα φρούτα, από εργαζόμενους στη βιομηχανία τροφίμων που είναι φορείς του βακτηρίου καθώς και από μολυσμένο εξοπλισμό στις εταιρίες παραγωγής τροφίμων, τα εστιατόρια κλπ (Tomprkin et al., 2001).

Ο πλέον μολυσματικός ορότυπος *E. coli* 0157:H7 παράγει μια ισχυρή τοξίνη και συνήθως προκαλεί βαριά γαστρεντερίτιδα με αιμορραγικές κενώσεις, μέτριο ή καθόλου πυρετό και κοιλιακό πόνο. Τα συμπτώματα υποχωρούν σε 5-10 ημέρες χωρίς ειδική θεραπεία. Εντούτοις περίπου 2-7 % των ατόμων που προσβάλλονται-ιδίως μικρά παιδιά και ηλικιωμένοι- μπορεί να εμφανίσουν επιπλοκές, όπως αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο ή ακόμα και θάνατο (Παπαντωνίου, 2011).

5.4 *Staphylococcus aureus*

Οι σταφυλόκοκκοι είναι σφαιρικά βακτήρια διαμέτρου 1μm, ακίνητα, που διατάσσονται σε τετράδες ή σταφυλοειδείς σχηματισμούς. Οι κόκκοι είναι Gram θετικοί, προαιρετικά αναερόβιοι, αλλά αναπτύσσονται πιο γρήγορα και πιο άφθονα κάτω από αερόβιες συνθήκες, παράγουν καταλάση όχι όμως οξειδάση.

Οι σταφυλόκοκκοι βρίσκονται στο δέρμα, στους αδένες του δέρματος και στους βλεννογόνους των θερμόαιμων ζώων. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται μεταξύ 35-40 °C και έχουν άριστο pH 7-7,5. Διασπών την γλυκόζη και πολλά άλλα σάκχαρα οξειδωτικά χωρίς παραγωγή αερίου. Μερικά από τα σάκχαρα τα διασπών και σε αναερόβιες συνθήκες, δηλαδή τα ζυμώνουν. Δεν λύνονται με λυσοζύμη, αλλά λύνονται με την λυσοσταφίνη (Αρσένη, 2000).

Η ζωτικότητα των σταφυλόκοκκων είναι πολύ μεγάλη: αντέχουν για πολύ στις καλλιέργειες, στην αποξήρανση και στο κρύο (διατηρούνται για πολλούς μήνες στο ψυγείο μέσα σε σφραγισμένους σωλήνες). Είναι ευαίσθητοι στην θερμότητα ($D_{60} = 3\text{min}$). Παρουσιάζουν μέτρια αντοχή στην γ-ακτινοβολία και αναπτύσσονται σε συγκέντρωση NaCl 15% (Δεληγκάρης, 2004).

Στο γένος των σταφυλόκοκκων υπάγονται 28 είδη. Ένα από αυτά το πιο σημαντικό είναι ο *S. aureus*. Ο *S. aureus* διαφοροποιείται από τα άλλα είδη σταφυλόκοκκων με τέσσερα (4) βιοχημικά χαρακτηριστικά. Πρόκειται για τις δοκιμές της πηκτάσης, της θερμονουκλεάσης, της αλκαλικής φωσφατάσης και την ευαισθησία στη λυσοσταφίνη, στις οποίες ο *S. aureus* παρουσιάζει θετική συμπεριφορά (Kloos et al., 1992).

Ο *S. aureus* διασπά την γλυκόζη και τηνμανιτόλη αεροβίως αλλά και αναεροβίως. Αυτή είναι η βασικότερη βιοχημική διαφορά του από τους άλλους σταφυλόκοκκους και τους μικρόκοκκους. Διασπά και πολλά άλλα σάκχαρα αργά με παραγωγή οξέος όχι όμως και αερίου, όπως τη λακτόζη, μαλτόζη, σουκρόζη, τρεχαλόζη. Δεν παράγει ινδόλη, δίνει θετική αντίδραση ερυθρού του μεθυλίου, ανάγει τα νιτρικά, διασπά την ουρία και μερικά στελέχη παράγουν ίχνη υδρόθειου (Αρσένη, 2000).

Αναπτύσσεται σε κοινά θρεπτικά υλικά. Οι αποικίες του στο άγαρ είναι κυρτές με διάμετρο 1-2 mm, υγρές, αδιαφανείς, κρεμώδεις και έχουν ελαφριά χρυσοκίτρινη χροιά. Η παρασκευή εκλεκτικών υποστρωμάτων βασίζεται στην αντοχή που έχουν οι σταφυλόκοκκοι στα άλατα, στα αμινοξέα και στα αντιβιοτικά.

Εκλεκτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των σταφυλόκοκκων είναι τα υποστρώματα: Chapman, Baird-Parker και Zebovitz.

Τα χαρακτηριστικά των αποικιών του *S. aureus* στο Baird-Parker είναι, αποικίες μαύρες, γυαλιστερές, κυρτές, διαμέτρου 1-1,5 mm με στενή λευκή περιφέρεια που περιβάλλονται από διαφανή ζώνη πλάτους 2-5 mm. Μερικά στελέχη παρουσιάζουν ζώνη διαφανή μόνο μετά από 36 ώρες (Δεληγκάρης, 2004).

Όλα τα στελέχη του *S. aureus* είναι δυνητικά παθογόνα. Προκαλούν λοιμώξεις που ονομάζονται σταφυλοκοκκιάσεις. Η ανάπτυξη του *S. aureus* στα τρόφιμα είναι μια από τις σημαντικότερες αιτίες τροφικής δηλητηρίασης. Τόσο τα ζώα όσο και οι άνθρωποι είναι φορείς του βακτηρίου. Οι χαμηλές τιμές του *S. aureus* στα τρόφιμα δεν αποτελούν κίνδυνο για την δημόσια υγεία. Η ανάπτυξη του *S. aureus* σε επίπεδα $> 10^6$ cfu/g τροφίμου αποτελεί κίνδυνο, επειδή πολλά στελέχη του παράγουν εντεροτοξίνες, όταν βρίσκονται σε αυτά τα επίπεδα (Le Loir et al., 2003).

Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί πέντε ορολογικά διαφορετικοί τύποι εντεροτοξινών (SEA, SEB, SEC, SED, SEE). Η ποσότητα αυτών που απαιτείται, για να προκαλέσουν δηλητηρίαση σε έναν άνθρωπο, είναι το λιγότερο 1mg τοξίνη/100g τροφίμου. Τα συμπτώματα από την δηλητηρίαση είναι ζάλη, εμετός, κοιλιακός πόνος, διάρροια και εμφανίζονται 2-6 ώρες μετά την κατάποση του τροφίμου και διαρκούν 1-3 μέρες. (Bhatia and Zahoor, 2007)

Τα περισσότερα τρόφιμα που συχνά ενοχοποιούνται για σταφυλοκοκκική τροφιοτοξίνωση είναι τα πουλερικά, τα ψάρια (κυρίως οστρακοειδή, γαρίδες), τρόφιμα αρτοποιείου (που έχουν σαντιγί), γαλακτοκομικά προϊόντα (κυρίως η σκόνη γάλακτος) και τα μαγειρεμένα λαχανικά. Η κακή μεταχείριση των τροφίμων τόσο στη βιομηχανία όσο και στο σπίτι ευθύνονται για τη μόλυνσή τους. Οι σημαντικότερες πηγές μόλυνσης των έτοιμων προς κατανάλωση φαγητών είναι οι άνθρωποι- φορείς του *S. aureus* και ωμά τρόφιμα μολυσμένα με σταφυλόκοκκους. Πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στη σωστή επεξεργασία, την αποθήκευση και το χειρισμό των τροφίμων, δεδομένου ότι το μαγείρεμα δεν μπορεί να καταστρέψει τις εντεροτοξίνες του σταφυλόκοκκου. Τα ευπαθή τρόφιμα θα πρέπει να ψύχονται γρήγορα αλλά και να διατηρούνται συνεχώς υπό ψύξη.

Πολλά τρόφιμα ευνοούν την ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου και το σχηματισμό τοξινών. Εξαιρεση αποτελούν τα τρόφιμα, τα οποία έχουν $pH < 5$ και ενεργότητα

νερού $a_w < 0,86$. Σε τρόφιμα όπου δεν υπάρχει ανταγωνιστική μικροχλωρίδα, η ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου θα συνεχιστεί, αν δεν εμποδιστεί από χαμηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης (Adams and Moss, 2008).

5.5 Γένος *Listeria*

Είναι βακτήρια κυλινδρικά, μόνα ή σε κοντές αλυσίδες (3-5 κύτταρα). Μερικές φορές διατάσσονται σε σχήμα V ή Y. Είναι Gram-θετικά, κινητά (περίτριχα) όταν αναπτυχθούν στους 20-25 °C, ασπορογόνα, χωρίς έλυτρο, καταλάση-θετικά και προαιρετικά αναερόβια. Έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 30-37 °C και όρια 1-45 °C. Δεν επιβιώνουν στους 60 °C για 30 min. Άλλα χαρακτηριστικά που είναι χρήσιμα για την ταυτοποίηση του γένους *Listeria* είναι: M.R.-τεστ +, V.P.- τεστ +, υδρόλυση εσκουλίνης +, αλκαλική φωσφατάση +, ουρεάση -, ζελατίνη και καζεΐνη -. (Jones and Seeliger, 1992).

Τα βακτήρια του γ. *Listeria* βρίσκονται στα κόπρανα του ανθρώπου και των ζώων. Έχουν απομονωθεί από 42 τουλάχιστον είδη άγριων και οικιακών θηλαστικών, καθώς και από 17 είδη πτηνών. Στο περιβάλλον βρίσκονται στο έδαφος, σε φυτικά υλικά σε αποσύνθεση, σε κανάλια, σε ακάθαρτα νερά, σε αποχετεύσεις και σε απόβλητα. Η παρουσία των βακτηρίων αυτών σε πολλούς από τους παραπάνω βιότοπους οφείλεται πιθανότατα σε κοπρανώδη μόλυνση. Εν τούτοις, η συνεχής απομόνωση λιστεριών από το έδαφος και τα φυτά υποδηλώνει, ότι τα βακτήρια του γ. *Listeria* είναι σαπροφυτικά και αποτελούν μέλη της μικροβιοχλωρίδας στο περιβάλλον εδάφους-φυτών. Λιστέριες έχουν απομονωθεί από διάφορα τρόφιμα και κυρίως από αλλοιωμένα λαχανικά, πράσινες σαλάτες, μαλακά τυριά, μη παστεριωμένο γάλα, ανεπαρκώς μαγειρεμένα πουλερικά και hot dogs, καθώς και διάφορα πατέ (Ryser and Donnelly, 2001).

Το γ. *Listeria* περιλαμβάνει 7 είδη: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* και *L. murrayi*. Από αυτά τα 2 πρώτα είναι παθογόνα. Η *Listeria monocytogenes* είναι παθογόνος για τον άνθρωπο και τα ζώα, ενώ *L. ivanovii* προσβάλλει τα ζώα και κυρίως τα πρόβατα. Η ασθένεια που προκαλούν τα 2 είδη ονομάζεται λιστερίωση και εμφανίζει πολλά κλινικά συμπτώματα. Επειδή τα τελευταία 25 χρόνια η λιστερίωση έχει μετατραπεί σε μια σημαντική τροφογενή ασθένεια, πολλοί μικροβιολόγοι τροφίμων, ιατροί και

κτηνίατροι ασχολήθηκαν και εξακολουθούν να ερευνούν και να επιλύουν προβλήματα σχετικά με την ταυτοποίηση, την ταξινόμηση, την απομόνωση, την επιδημιολογία και την παθογόνο δύναμη της *L. monocytogenes* (Παπαντωνίου, 2011).

5.6 Μύκητες – Ζύμες

Οι μύκητες και οι ζύμες είναι πλατιά διαδεδομένοι στη φύση και έτσι ανευρίσκονται στα τρόφιμα και τον εξοπλισμό σε περίπτωση ανεπαρκούς καθαριότητας. Μολονότι ορισμένοι μύκητες και ζύμες χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ποικίλων τροφίμων (π.χ. άρτου, ζύθου, ροκφόρ κ.τ.λ.), αυτοί προκαλούν επίσης αλλοίωση σε πολλά τρόφιμα και ορισμένοι παράγουν επικίνδυνες τοξίνες. Επειδή οι μύκητες αναπτύσσονται αργά και έχουν μικρή ικανότητα ανταγωνισμού, εκδηλώνουν τη δράση τους σε τρόφιμα που δεν ευνοούν την ανάπτυξη των βακτηρίων, όπως είναι όσα έχουν χαμηλό pH, χαμηλό a_w , υψηλή συγκέντρωση άλατος ή ζαχάρων, συντηρούνται σε χαμηλή θερμοκρασία, περιέχουν αντιβιοτικά κ.τ.λ (Beuchat and Cousin, 2001).

Οι μύκητες και οι ζύμες μπορούν να χρησιμοποιήσουν υδατάνθρακες, οργανικά οξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια. Η αποδόμηση των ουσιών αυτών οδηγεί στην αλλοίωση του τροφίμου.

Ακόμα, οι μύκητες και οι ζύμες μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα εξαιτίας (α) της συνθέσεως τοξικών μεταβολιτών (μυκοτοξίνες), (β) της θερμοαντοχής τους, (γ) της αντοχής στις χαμηλές θερμοκρασίες, στα αντιβιοτικά, τις ακτινοβολίες (Δεληγκάρης, 2004).

6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Δείγματα-Δειγματοληψία

Δειγματοληψία ονομάζεται η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την εκλογή του κατάλληλου δείγματος. Το βασικό γνώρισμα της δειγματοληψίας είναι ότι προσπαθεί να εκλέξει το δείγμα έτσι ώστε να είναι αυτό όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτικό του πληθυσμού. Μόνο από τη μελέτη ενός τέτοιου δείγματος μπορεί να εξαχθούν ορθά συμπεράσματα για τον πληθυσμό. Απ' αυτό προκύπτει, ότι η δειγματοληψία αποτελεί μια από τις σπουδαιότερες φάσεις του μικροβιολογικού ελέγχου των τροφίμων.

Το δείγμα πρέπει να απεικονίζει τη μικροβιολογική σύσταση του τροφίμου και γι' αυτό πρέπει να παίρνονται όλα τα κατάλληλα μέτρα ασηψίας, ώστε κατά τη συλλογή, τη μεταφορά και την ανάλυσή του να αποκλείεται η μικροβιολογική μόλυνση από εξωτερικές πηγές.

Για την ασηπτική δειγματοληψία: α) χρησιμοποιούμε αποστειρωμένα εργαλεία και σκεύη, όπως μαχαιρίδια, λαβίδες, ειδικούς δειγματολήπτες, σιφώνια, σωλήνες, φιάλες, φιαλίδια κ.τ.λ. β) εκτελούμε τη δειγματοληψία πλησίον λύχνου Bunsen γ) τοποθετούμε τα δείγματα, ανάλογα με τη σύσταση του προϊόντος, σε ευρύστομα φιαλίδια ή δοχεία με στεγανό κοχλιωτό πάωμα. Τα στερεά δείγματα μπορεί να συσκευασθούν σε αδιάβροχο χαρτί ή αλουμινόχαρτο, εφ' όσον δεν απαιτείται μικροβιολογική εξέταση της επιφανειακής στιβάδας τους. Στην περίπτωση που το δείγμα συσκευάζεται σε χαρτί ή αλουμινόχαρτο πρέπει να έχει σχήμα κύβου πλευράς 10 cm το ελάχιστο δ) Τα πρόσωπα που συλλέγουν τα δείγματα πλένουν τα χέρια τους πριν από τη δειγματοληψία (Midura and Bryant, 2001).

Τα δείγματα του μανουριού συσκευάστηκαν στην βιομηχανία παραγωγής ανά 200 g σε ειδικές πλαστικές συσκευασίες κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε φορητά ψυγεία με ψυκτικά στοιχεία (παγοκύστες) σε θερμοκρασία 6°C και μεταφέρθηκαν στο ΤΕΙ Θεσσαλονίκης, όπου τοποθετήθηκαν σε ψυγεία θερμοκρασίας 5°C . Τα δείγματα μελετήθηκαν την 1η ημέρα της παρασκευής τους, την 10η ημέρα, την 20η ημέρα και την 30η ημέρα. Αυτή η διαδικασία έγινε για 2 διαφορετικές παρτίδες όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2: Πίνακας δειγμάτων μανουριού δύο παρτίδων Α και Β που αναλύθηκαν μικροβιολογικά μετά από συντήρηση στους 5°C για 0, 10, 20 και 30 ημέρες.

Προϊόν	Παρτίδα	Δείγματα που αναλύθηκαν	Ημέρες συντήρησης σε 5 °C
Μανούρι	A	2	0
	B	2	0
	A	2	10
	B	2	10
	A	2	20
	B	2	20
	A	2	30
	B	2	30
Σύνολο	2	16	

6.2 Ομογενοποίηση – Παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων

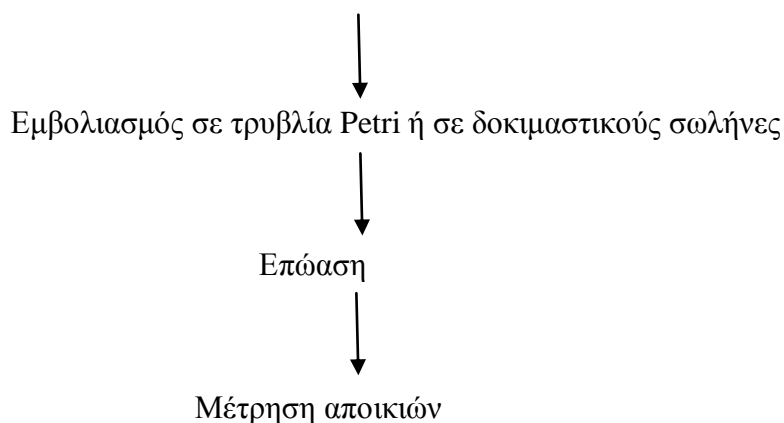
Η ομογενοποίηση σκοπεύει να καταλείψει τα μικρόβια όσο γίνεται πιο ομοιόμορφα μέσα στο δείγμα, ώστε η ποσότητα που θα εξετάσουμε να δώσει αντιπροσωπευτική εικόνα της ολικής χλωρίδας.

Από διάφορα σημεία του δείγματος πάρθηκαν με ασηπτικό τρόπο, τεμάχια συνολικού βάρους 50g και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο ποτήρι ζέσεως, όπου λεπτοτεμαχίσθηκαν με αποστειρωμένο ψαλίδι. Από το έτσι προετοιμασμένο δείγμα μεταφέρθηκαν 10g ή 11g ή 50g σε φιάλη ομοιογενοποίησης, στην οποία προστέθηκε 9-πλάσια ποσότητα αραιωτικού. Η ομοιογενοποίηση έγινε με ηλεκτρικό ομοιογενοποιητή (blender, mixer) επί 2 min και ταχύτητα 8000 rpm. Αν το δείγμα απαιτεί περισσότερο χρόνο για να ομοιογενοποιηθεί, τότε διακόπτεται κατά διαστήματα η λειτουργία του οργάνου, ώστε να μην υπερθερμανθεί το δείγμα.

Η θερμοκρασία δεν πρέπει να ανέβει πάνω από 4-5°C. Η ομοιογενοποίηση μπορεί επίσης να γίνει με άριστα αποτελέσματα και με το Stomacher, όπου ανακινείται για 30-60 sec. (Midura and Bryant, 2001)

Έτσι, παρασκευάστηκε η αραιώση 1/10 του δείγματος που χρησίμευσε για την παρασκευή των περαιτέρω αραιώσεων (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7}). Στο σχήμα παρακάτω φαίνεται συνοπτικά η πειραματική διαδικασία που πραγματοποιήθηκε.

10g δείγματος → 90 ml αραιωτικό (10^{-1}) → Περαιτέρω αραιώσεις (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7})



Κατά την παρασκευή των αραιώσεων τηρήθηκαν τα ακόλουθα:

1. Κάθε φιάλη, αμέσως μετά την μεταφορά του δείγματος από την προηγούμενη, ανακινείται ισχυρά με το χέρι επί 1 min. Τα φιαλίδια και οι δοκιμαστικοί σωλήνες ανακινούνται καλύτερα μηχανικά επί 15 sec.
2. Οι μετρήσεις με τα ογκομετρικά σιφώνια πρέπει να είναι όσο γίνεται πιο ακριβείς.
3. Κατά τη μεταφορά υλικού από μια φιάλη στην άλλη με το ογκομετρικό σιφώνιο πρέπει: (α) το άκρο του σιφωνίου να μη βυθίζεται περισσότερο από 2,5 cm κάτω από την επιφάνεια του δείγματος ή του αραιωτικού, (β) το άκρο του σιφωνίου δεν πρέπει να έλθει σε επαφή με το υγρό της φιάλης στην οποία μεταφέρεται το υλικό. Η τελευταία σταγόνα εκδιώκεται με ελαφρύ φύσημα, (γ) δεν πλένεται το σιφώνιο με το αραιωτικό.
4. Για κάθε αραιώση χρησιμοποιείται νέο σιφώνιο.

5. Όλες οι αραιώσεις πρέπει να παρασκευασθούν μέσα σε 15 min από τη στιγμή της ομοιογενοποίησης του δείγματος.
6. Η όλη εργασία γίνεται κάτω από συνθήκες ασηψίας.
7. Δεν πρέπει να παρασκευάζονται ή να διανέμονται αραιώσεις κάτω από το άμεσο ηλιακό φως (Δεληγκάρης, 2004).

6.3 Προσδιορισμός των μικροβιολογικών δεικτών

6.3.1 OMX (ή ΣΑΜ)

Για τον προσδιορισμό της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος καταμέτρησης των αποικιών σε τρυβλία. Ο ενοφθαλμισμός έγινε με την τεχνική της ενσωμάτωσης. Από κάθε δεκαδική αραιώση του δείγματος μεταφέρθηκε 1 ml και τοποθετήθηκε στο κέντρο του πυθμένα αποστειρωμένου τρυβλίου Petri. Ο ενοφθαλμισμός έγινε σε δύο τρυβλία. Σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν περίπου 15 ml λιωμένου, θερμοκρασίας 45-46 °C υποστρώματος. Η θερμοκρασία του υποστρώματος δεν πρέπει να είναι υψηλότερη από 46 °C, γιατί θα καταστρέψει τα θερμοευαίσθητα βακτηριακά κύτταρα.

Στην συνέχεια έγινε ανάμιξη του ενοφθαλμίσματος με το υπόστρωμα με ήπιες κυκλικές κινήσεις αρχικά (τρεις δεξιά και τρεις αριστερά) και οριζόντιες στη συνέχεια (μπρος-πίσω, δεξιά-αριστερά). Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή κατά τις κινήσεις αναμίξεως, ώστε η διασπορά του ενοφθαλμίσματος και άρα των μικροβίων στη μάζα του υποστρώματος να είναι ομοιόμορφη, αλλά να μη ρυπανθούν τα τοιχώματα ή το καπάκι του τρυβλίου με υπόστρωμα.

Μετά την πήξη του υποστρώματος, τα τρυβλία αναστράφηκαν και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο. Για την καταμέτρηση των αποικιών των μεσόφιλων, τα τρυβλία επώασθηκαν στους 35 °C για 48 ± 3 ώρες. Στις θερμοκρασίες αυτές και σε αερόβιες συνθήκες επώασεως, η καταμέτρηση αφορά τα αερόβια, μεσόφιλα βακτήρια. Ο πληθυσμός αυτός των βακτηρίων που αναπτύσσεται στο άγαρ καταμέτρησης και κάτω από τις συνθήκες επώασεως που αναφέρονται παραπάνω χαρακτηρίζεται ως “ Ολική μεσόφιλη χλωρίδα” (OMX) ή ως “ συνολικός αριθμός μεσόφιλων “ (ΣΑΜ).

Η μέτρηση των αποικιών έγινε με τη βοήθεια μετρητή αποικιών. Καταμετρήθηκαν όλες οι αποικίες, οποιουδήποτε μεγέθους. Το αποτέλεσμα εκφράστηκε σε μονάδες που σχηματίζουν αποικίες (cfu colony forming units/g).

6.3.2 Ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση των ψυχρότροφων μικροοργανισμών ήταν το ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην OMX, δηλαδή το Plate Count άγαρ. Ο ενοφθαλμισμός έγινε με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης. Ενοφθαλμίσθηκαν δύο τρυβλία από κάθε αραιώση με 0,1 ml το καθένα. Το ενοφθάμισμα τοποθετήθηκε στο κέντρο της επιφάνειας του υποστρώματος και με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου λυγισμένης σε σχήμα Γ απλώθηκε ομοιόμορφα σ' όλη την επιφάνεια του υποστρώματος. Τα τρυβλία επώασθηκαν στους 7 °C για 10 ημέρες. Η αρίθμηση των αποικιών έγινε όπως και στη μέθοδο της ενσωματώσεως. Για την εξαγωγή όμως του τελικού αποτελέσματος λήφθηκε υπόψη και η ποσότητα του ενοφθαλμίσματος (0,1ml) (Roberts and Greenwood, 2003).

6.3.3 Coliforms

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση των coliforms ήταν το VRB Άγαρ (Violet Red Bile Άγαρ). Ο ενοφθαλμισμός έγινε με την τεχνική της ενσωμάτωσης. Τα τρυβλία επώασθηκαν στους 37 °C για 24 ώρες. Καταμετρήθηκαν οι αποικίες που είχαν έντονα κόκκινο χρώμα (Microbiology Manual, 2000).

6.3.4 *E. coli*

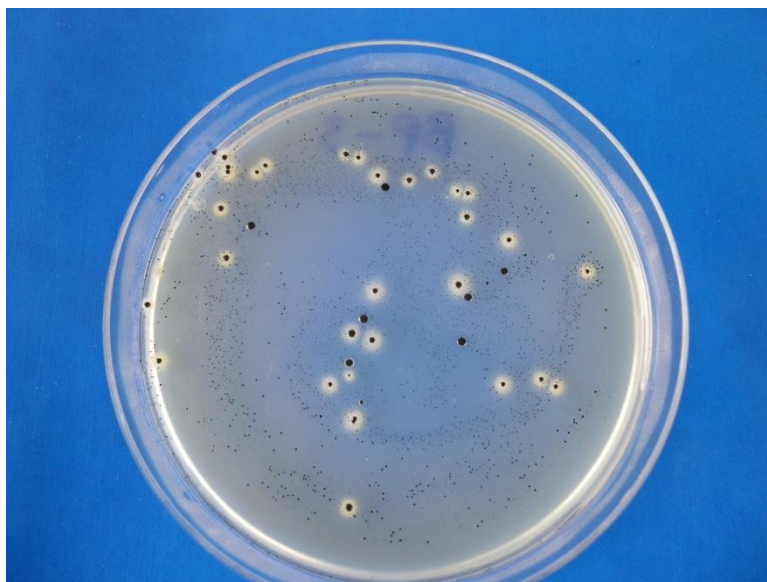
Για την καταμέτρηση της *E. coli* εφαρμόστηκε η MPN-μέθοδος των 3 σωλήνων με McConkey-Broth για τη ζύμωση της λακτόζης και ταυτόχρονα η ίδια τεχνική MPN των 3 σωλήνων) με πεπτονούχο νερό (peptone water) για τη δοκιμή της ινδόλης (προσθήκη αντιδραστηρίου Kovacs). Μετά τον ενοφθαλμισμό οι δοκιμαστικοί σωλήνες με τα δύο υγρά υποστρώματα επώασθηκαν στους 44,5°C για 48 ώρες. Κατά την ανάγνωση των αποτελεσμάτων οι σωλήνες με McConkey-Broth που παρουσίασαν ζύμωση της λακτόζης σε οξύ και αέριο και ταυτόχρονα ήταν ινδόλη-θετικοί στο πεπτονούχο νερό, σήμαιναν την παρουσία της *E. coli* και συνεπώς εκτιμήθηκαν θετικοί (Δεληγκάρης, 2004).

6.3.5 *Staphylococcus aureus*

Για την μέτρηση των βακτηρίων του γ. *Staphylococcus* και του *Staphylococcus aureus* χρησιμοποιήθηκε το Baird-Parker-Άγαρ και ο ενοφθαλμισμός έγινε με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης. Ο ενοφθαλμισμός σε αντίθεση με άλλες περιπτώσεις έγινε σε 3 τρυβλία για κάθε αραιώση με 0,3ml, 0,3ml και 0,4ml. Το ενοφθάμισμα τοποθετήθηκε στο κέντρο της επιφάνειας του υποστρώματος και με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου λυγισμένης σε σχήμα Γ απλώθηκε ομοιόμορφα σ' όλη την επιφάνεια του υποστρώματος.

Τα τρυβλία επώσθησαν σε κλίβανο στους 37 °C για 48-72 ώρες. Οι αποικίες των *Staphylococcus spp.* έχουν χρώμα μαύρο και είναι κυρτές και γυαλιστερές. Αν αυτές οι μαύρες αποικίες περιβάλλονται από ζώνη χρώματος ελαφρύ κίτρινο και περιβάλλονται από διαυγή ζώνη περίπου 2-5 mm τότε είναι αποικίες του *Staphylococcus aureus*.

Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ένα παράδειγμα ανάπτυξης αποικιών των βακτηρίων του γ. *Staphylococcus* και του *Staphylococcus aureus* στο B.P-άγαρ.

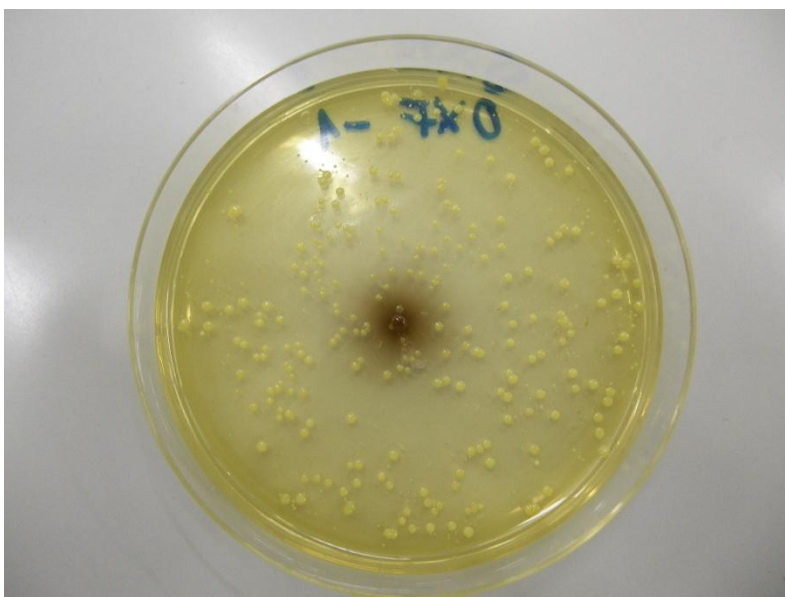


Σχήμα 3: Αποικίες βακτηρίων του γ.*Staphylococcus* και του *Staphylococcus aureus* στο B.P-άγαρ.

6.3.6 γ. *Listeria*

Για την αρίθμηση των βακτηρίων του γένους *Listeria* χρησιμοποιήθηκε το Oxford-*Listeria*-Selective άγαρ. Ο ενοφθαλμισμός έγινε με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης. Ενοφθαλμίσθηκαν δύο τρυβλία από κάθε αραιώση με 0,1 ml το καθένα. Η περιγραφή της τεχνικής της επιφανειακής εξάπλωσης αναφέρεται περιληπτικά στη μέθοδο καταμέτρησης των ψυχρότροφων μικροοργανισμών. Τα τρυβλία επωάσθηκαν σε κλίβανο στους 37 °C για 48 ώρες. Οι αποικίες των βακτηρίων του γ. *Listeria* έχουν πράσινο-γκρι χρώμα και περιβάλλονται από μαύρη ζώνη (Microbiology Manual, 2000).

Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η ανάπτυξη μιας αποικίας του βακτηρίου του γένους *Listeria* στο Oxford άγαρ.



Σχήμα 4: Αποικία βακτηρίου του γένους *Listeria* στο Oxford άγαρ

6.3.7 Μύκητες – Ζύμες

Οι μύκητες και οι ζύμες καταμετρήθηκαν με την τεχνική των τρυβλίων. Ο ενοφθαλμισμός έγινε με την τεχνική της ενσωμάτωσης. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το malt extract agar, με pH 3,5 περίπου. Αυτό ρυθμίστηκε με την προσθήκη στο υπόστρωμα αποστειρωμένου 10% τρυγικού οξέος. Η αναλογία ήταν 1,8ml διαλύματος ανά 100 ml υποστρώματος.

Στην συνέχεια όπως και στην OMX έγινε ανάμιξη του ενοφθαλμίσματος με το υπόστρωμα με ήπιες κυκλικές κινήσεις αρχικά και οριζόντιες στη συνέχεια. Τα τρυβλία επώσθησαν στους 20°C -25°C για 5-7 μέρες.

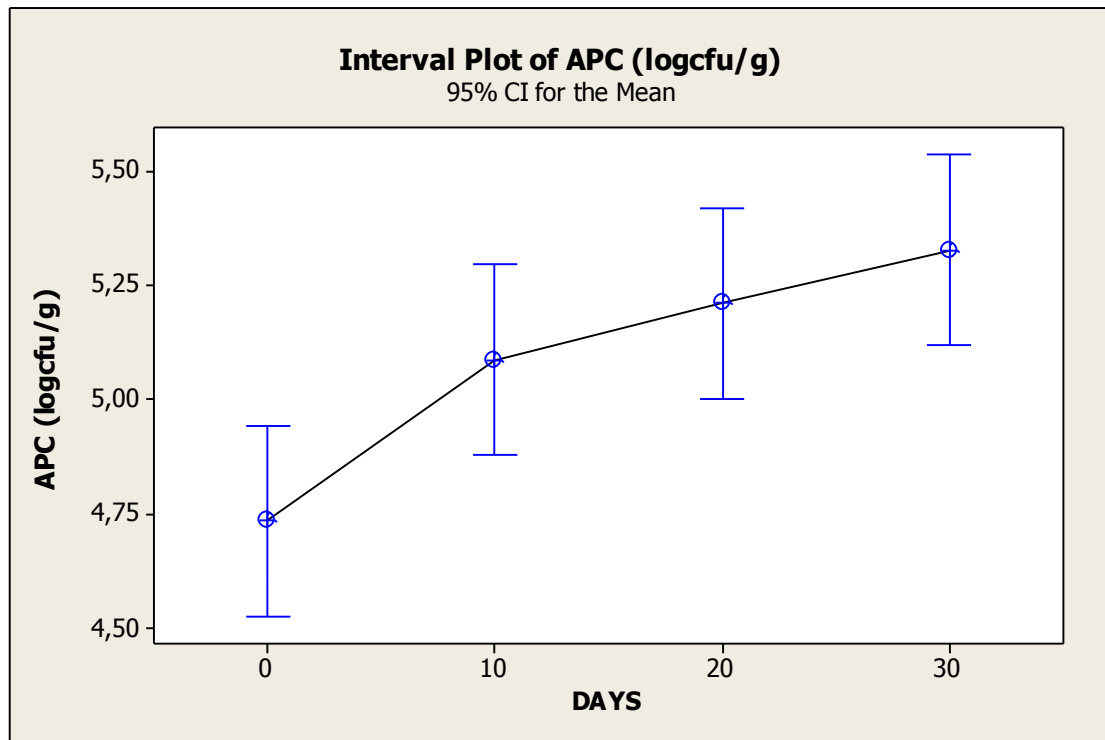
Η αρίθμηση των αποικιών έγινε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως και στις παραπάνω περιπτώσεις, δηλαδή με τη βοήθεια μετρητή αποικιών. Αριθμήθηκαν όλες οι αποικίες, οποιουδήποτε μεγέθους. (Beuchat and Cousin, 2001)

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της εργασίας παρουσιάζονται στα σχήματα 5 έως 14. Όπως έχει ήδη αναφερθεί αναλύθηκαν δείγματα από δύο (2) διαδοχικές τυροκομήσεις μανουριού ενός τυροκομείου μικρομεσαίας δυναμικότητας. Για κάθε τυροκόμηση οι αναλύσεις έγιναν εις διπλούν την πρώτη, δέκατη, εικοστή και τριακοστή ημέρα. Συνολικά εξετάστηκαν 16 δείγματα. Όλα τα δείγματα του μανουριού, από την παρασκευή του προϊόντος μέχρι και το τέλος του πειραματικού μέρους (30^η ημέρα), συντηρήθηκαν στους 5°C. Σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθεί η μεταβολή του μικροβιακού φορτίου του μανουριού κατά τη διάρκεια της συντήρησης του στους 5°C για 30 ημέρες. Τα δείγματα του μανουριού υποβλήθηκαν στις παρακάτω μικροβιολογικές αναλύσεις: 1) Αρίθμηση της O.M.X., 2) Αρίθμηση ψυχρότροφων μικροοργανισμών, 3) Αρίθμηση των coliforms, 4) Αρίθμηση της *E.coli*, 5) Αρίθμηση *Listeria* spp., 6) Αρίθμηση *S. aureus* και 7) Αρίθμηση μυκήτων-ζυμών.

1) Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα

Στο σχήμα 5 αποτυπώνονται οι μέσοι όροι και τα 95% όρια εμπιστοσύνης του πληθυσμού των μεσόφιλων μικροβίων των δειγμάτων του μανουριού. Όπως φαίνεται στο σχήμα η O.M.X. του προϊόντος κατά την ημέρα της παρασκευής του παρουσιάζει υψηλές τιμές, που κυμαίνονται μεταξύ 4,5-5,0 λογάριθμους. Σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές πηγές (USDA, 1994, USG, 1998) η μικροβιοχλωρίδα μη ωριμασμένων μαλακών τυριών (νωπά τυριά) παρασκευασμένα από ορό γάλακτος, πρέπει να μην υπερβαίνει 25.000 cfu/g (δηλ. 4,4 λογαρίθμους).



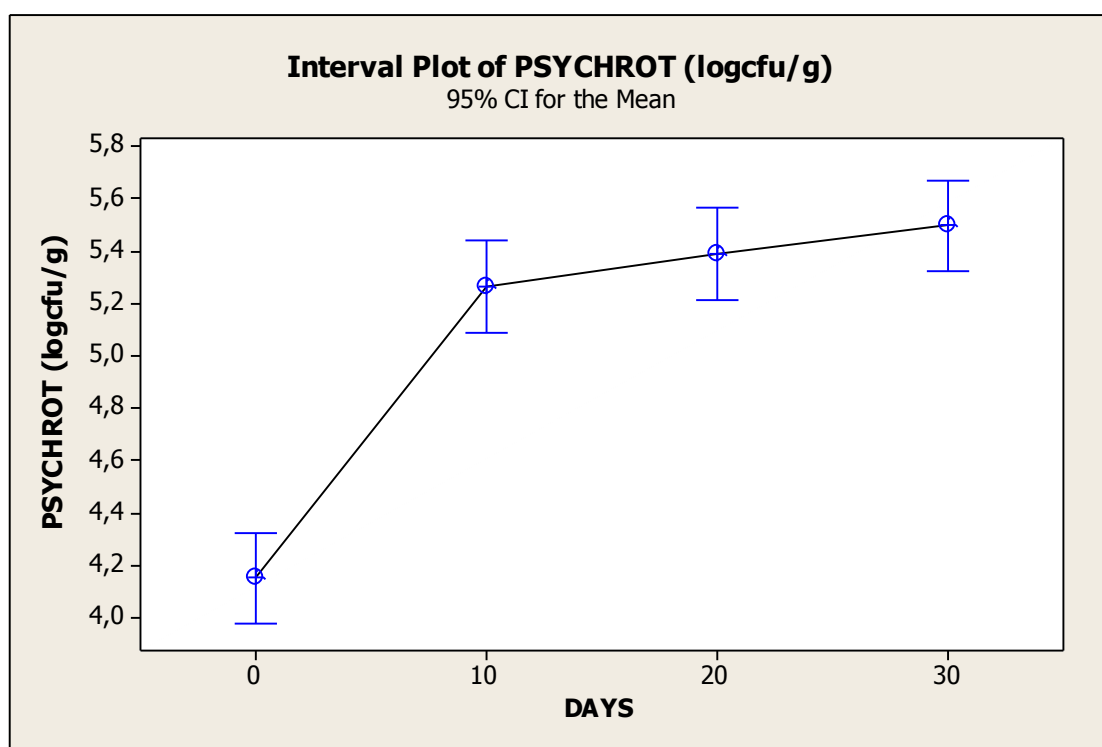
Σχήμα 5: Διάγραμμα της μεταβολής του πληθυσμού της OMX δειγμάτων μανουριού, που συντηρήθηκε στους 5°C για 10, 20 και 30 ημέρες.

Τα δείγματά μας μετά από συντήρηση 10 ημερών στους 5°C παρουσίασαν O.M.X. αυξημένη κατά 0,5-1,0 λογάριθμο περίπου. Στο επόμενο χρονικό διάστημα συντήρησης του προϊόντος μέχρι και την 30^η ημέρα του πειράματος η O.M.X. παρουσίασε ελαφρά αυξητική τάση. Εν τούτοις δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές της O.M.X. του προϊόντος μετά από 10, 20 και 30 ημέρες συντήρησης.

2) Ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί

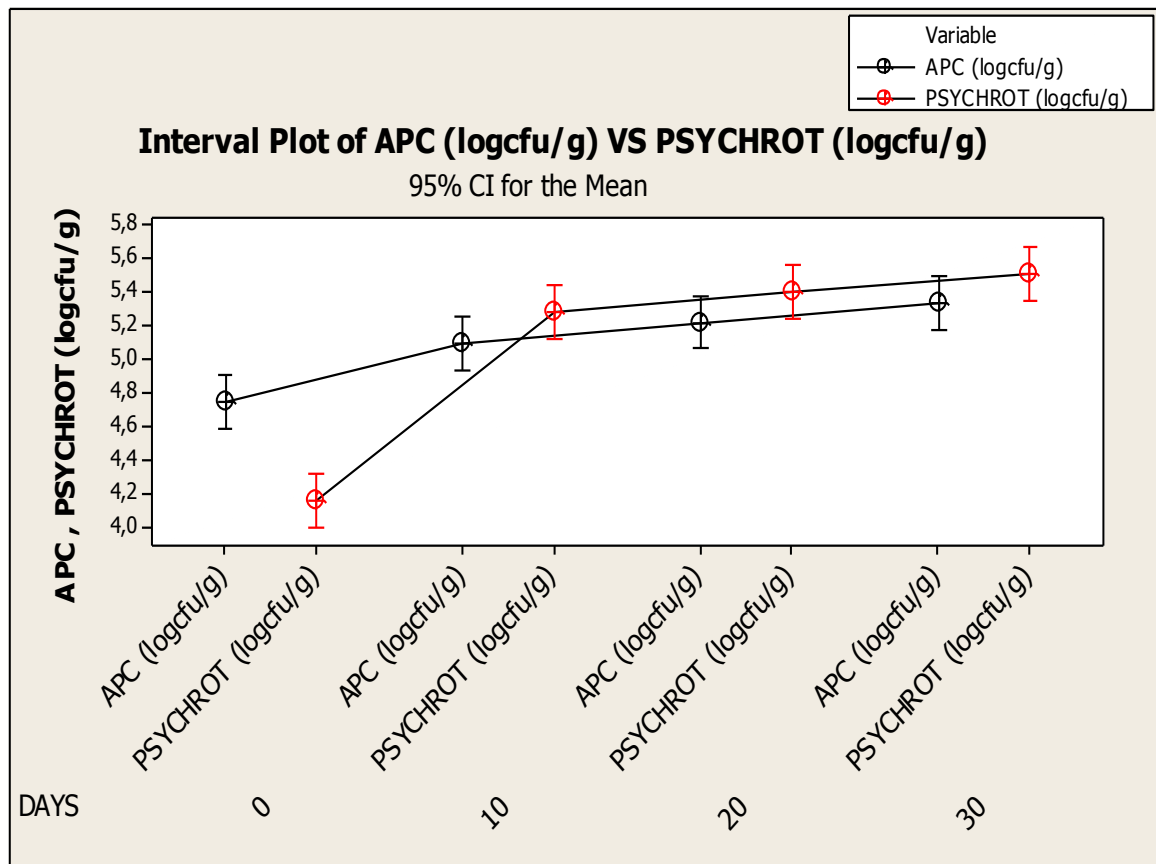
Στο σχήμα 6 αποτυπώνεται η μεταβολή του αριθμού των ψυχρότροφων βακτηρίων. Οι αριθμοί αυτών κατά την 1^η ημέρα παρασκευής του μανουριού ήταν ελαφρώς χαμηλότεροι (κατά 0.5-1.0 λογάριθμο) των αντιστοιχών της O.M.X. Αυτό ήταν αναμενόμενο, δεδομένου ότι τα ψυχρότροφα μικρόβια αποτελούν υποομάδα των μεσοφίλων. Εντούτοις ο συνολικός αριθμός των ψυχρότροφων μικροοργανισμών στα δείγματά μας κυμαίνεται υψηλότερα από τα προτεινόμενα στην βιβλιογραφία (4.0 log έναντι 2.0 log αντίστοιχα) (USDA, 1994, USG, 1998). Κατά την 10^η ημέρα

συντήρησης στους 5°C τα ψυχρότροφα παρουσίασαν αύξηση κατά 1.5 λογάριθμο περίπου (από 4.0 log σε 5.5 log).



Σχήμα 6 : Διάγραμμα της μεταβολής του αριθμού των ψυχρότροφων βακτηριών δειγμάτων μανουριού, που συντηρήθηκε στους 5°C για 10, 20 και 30 ημέρες.

Αυτό γίνεται εύκολα αντιληπτό από το σχήμα 6, σύμφωνα με το οποίο υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ψυχρότροφων κατά την 1^η και τη 10^η ημέρα συντήρησης στους 5°C. Από τη 10^η μέχρι και την 30^η ημέρα συντήρησης ο πληθυσμός των ψυχρότροφων παρουσιάζει ελαφρά αυξητική τάση, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών. Όπως προκύπτει και από το σχήμα 7, στο οποίο αποτυπώνεται η πορεία της μεταβολής τόσο της O.M.X. όσο και των ψυχρότροφων, τα τελευταία, όπως ήταν αναμενόμενο, κατά το πρώτο 10ήμερο της συντήρησης του μανουριού στους 5°C πολλαπλασιάζονται γρήγορα και ο αριθμός τους φθάνει σε επίπεδα ελαφρώς υψηλότερα από ότι τα επίπεδα της O.M.X. Αυτό υποδηλώνει ότι στο ψυγείο η μεσόφιλη μικροβιοχλωρίδα μεταβάλλεται σε ψυχρότροφη.

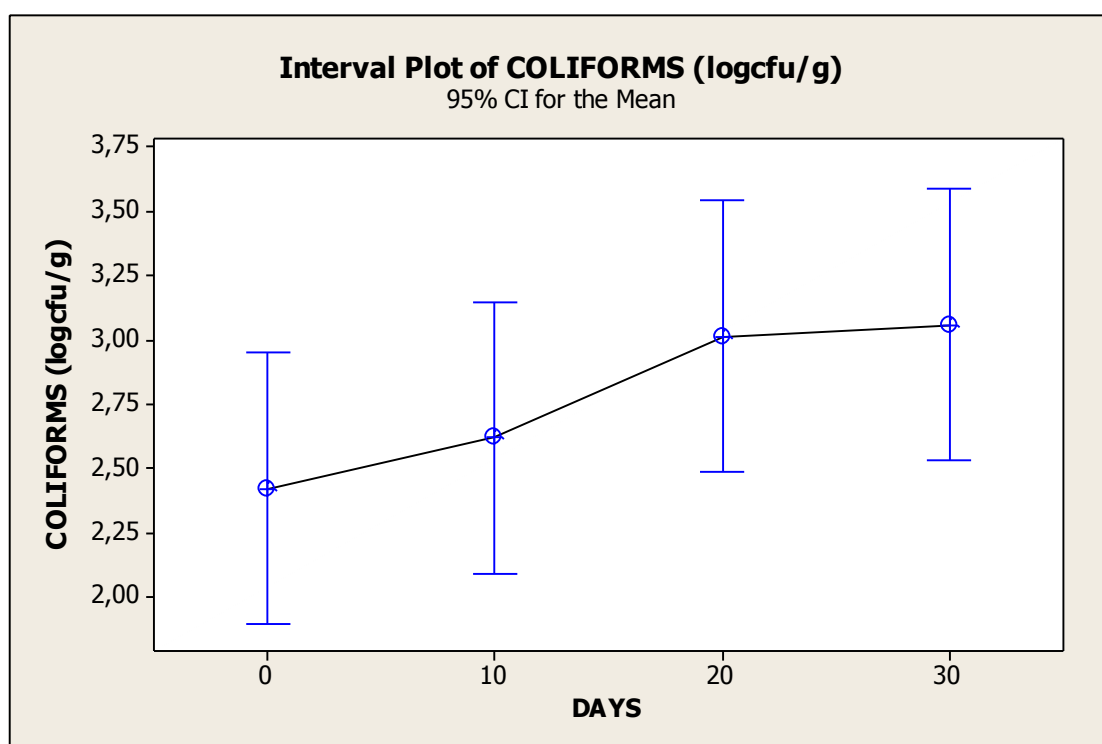


Σχήμα 7: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της OMX και των ψυχρότροφων σε ίδια δείγματα μανουριού, που συντηρήθηκαν στους 5°C για 10, 20 και 30 ημέρες.

Εν τούτοις κατά τη 10^η ημέρα συντήρησης δεν υπάρχει μεταξύ OMX και ψυχρότροφων στατιστικά σημαντική διαφορά. Η σχέση αυτή διατηρείται μέχρι και την 30^η ημέρα συντήρησης. Γενικά, η καταμέτρηση των ψυχρότροφων μικροβίων των τροφίμων που συντηρούνται σε θερμοκρασίες ψυγείου (2-7°C) είναι πολύ σημαντική, διότι η παρουσία τους (ιδίως σε μεγάλο αριθμό) αποτελεί δείκτη δυνητικής αλλοίωσης κατά τη διάρκεια παρατεταμένης συντήρησης.

3) Coliforms και *E.coli*

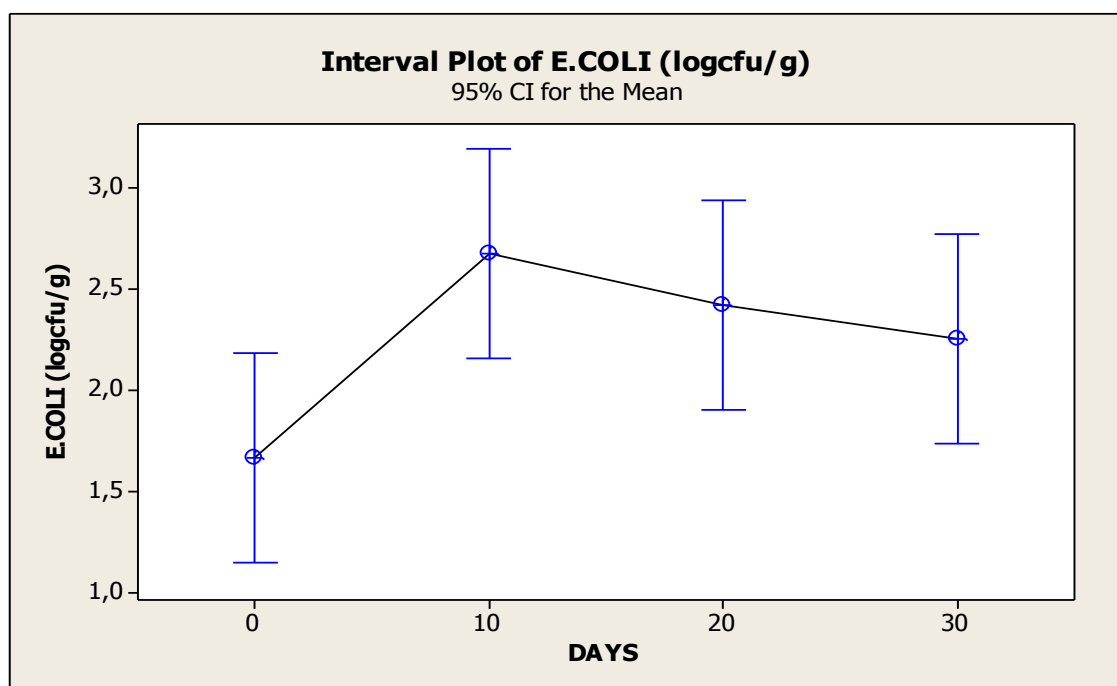
Στο σχήμα 8 αποτυπώνεται η μεταβολή του αριθμού των coliforms κατά τη συντήρηση του μανουριού στους 5°C για 30 ημέρες. Ο πληθυσμός των coliforms του μανουριού κατά την ημέρα της παρασκευής του κυμαίνονταν μεταξύ 10^2 - 10^3 cfu/g (2-3 λογάριθμοι), φορτίο σημαντικά υψηλότερο απ' ότι το προτεινόμενο μικροβιολογικό πρότυπο 10 cfu/g, δηλ. 1 λογάριθμος (USDA, 1994, και USG, 1998).



Σχήμα 8: Διάγραμμα μεταβολής του αριθμού των coliforms σε δείγματα μανουριού, που συντηρήθηκαν στους 5°C για 10, 20 και 30 ημέρες.

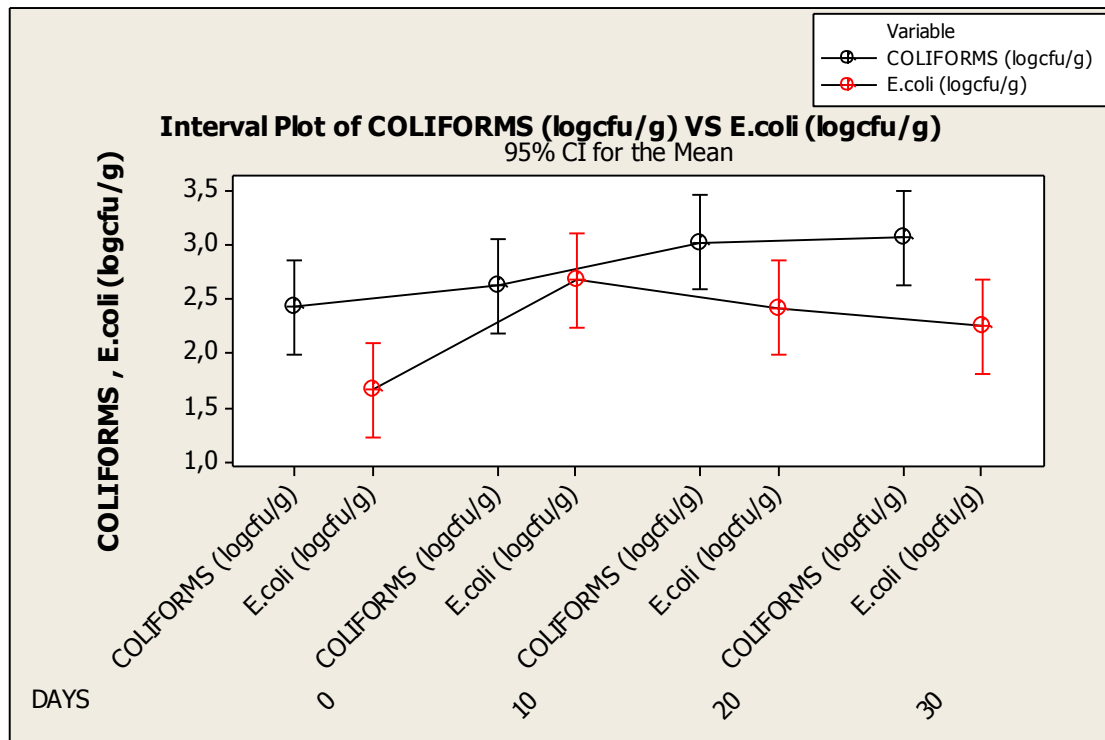
Αυτό το υψηλό φορτίο των coliforms υποδηλώνει ελλιπή μέτρα καθαριότητας και υγιεινής του εξοπλισμού και των επιφανειών του τυροκομείου καθώς και πιθανή μόλυνση από το προσωπικό. Τα coliforms κατά το διάστημα της συντήρησης του μανουριού μέχρι και την 30^η ημέρα παρουσίασαν ελαφρά αυξητική τάση ($\sim 0.51\log$), χωρίς εντούτοις να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των coliforms 1^{ης}, 10^{ης}, 20^{ης} και 30^{ης} ημέρας συντήρησης. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι, στο μανούρι

τα κολοβακτηριοειδή αποτελούν μικρό σχετικά ποσοστό της συνολικής ψυχρότροφης μικροβιοχλωρίδας. Στο σχήμα 9 αποτυπώνεται η μεταβολή του αριθμού της *E. coli* στα δείγματά μας. Ο πληθυσμός της *E. coli* κατά την 1^η ημέρα της παρασκευής του μανουριού κυμαίνονταν 10^1 - 10^2 cfu/g. Αυτό το μικροβιακό φορτίο είναι σημαντικά υψηλότερο από το προτεινόμενο μικροβιολογικό πρότυπο, δηλ. απουσία *E. coli* σε 1g (USDA, 1994).



Σχήμα 9: Διάγραμμα μεταβολής του αριθμού της *E. coli* σε δείγματα μανουριού, που συντηρήθηκαν στους 5°C για 10, 20 και 30 ημέρες.

Μετά από 10 ημέρες συντήρησης η *E. coli* αυξήθηκε κατά 1 λογάριθμο (οριακή στατιστικά σημαντική διαφορά με την *E. coli* της 1^{ης} ημέρας). Στο διάστημα που ακολούθησε (20, 30 ημέρες) ο αριθμός της *E. coli* παρέμεινε περίπου σταθερός, δηλ. δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των coliforms 10^{ης}, 20^{ης} και 30^{ης} ημέρας.

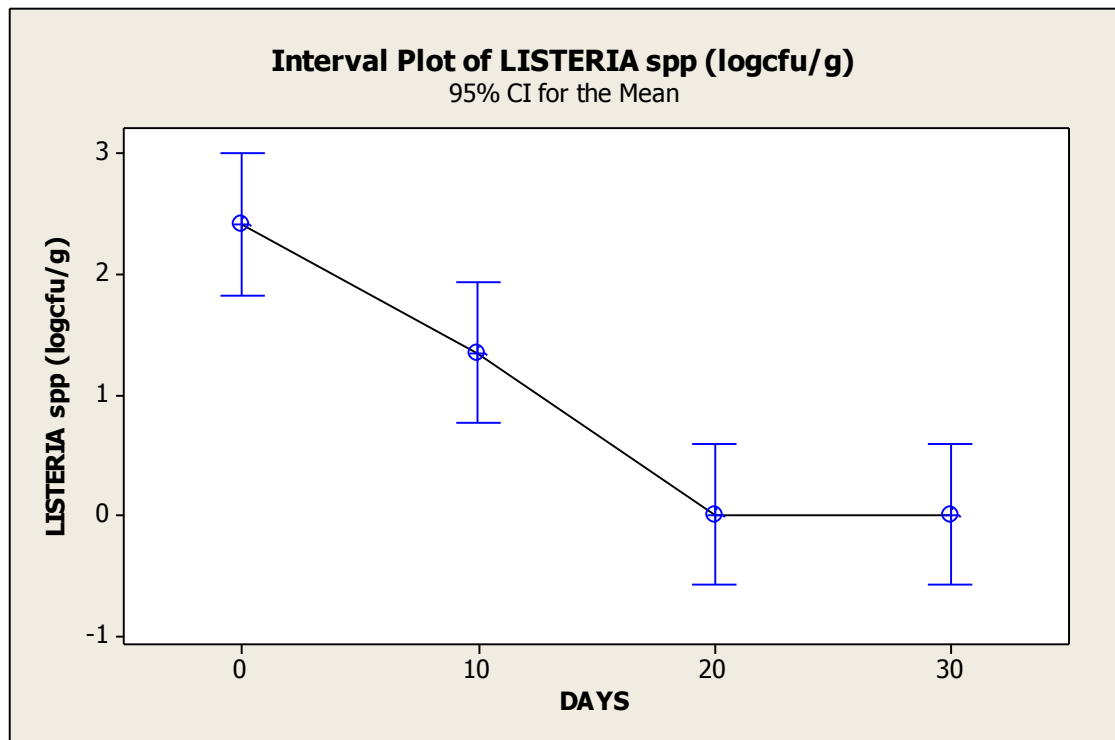


Σχήμα 10: Συγκριτικό διάγραμμα της μεταβολής των coliforms και της *E. coli* στα ίδια δείγματα μανουριού, που συντηρήθηκαν στους 5°C για 10, 20 και 30 ημέρες.

Στο σχήμα 10 φαίνεται συγκριτικά πως μεταβάλλεται ο πληθυσμός των coliforms και της *E. coli* στα δείγματα του μανουριού που συντηρήθηκαν στους 5°C για 30 ημέρες.

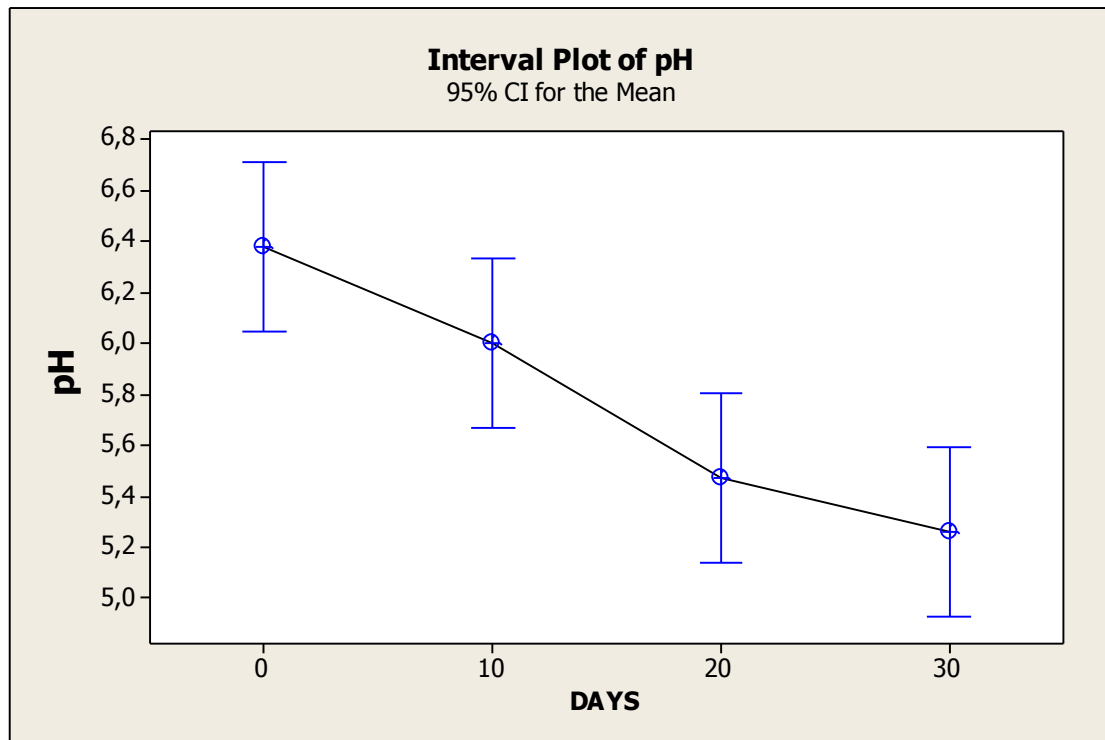
4) Listeria spp.

Στο σχήμα 11 αποτυπώνεται η μεταβολή του πληθυσμού των βακτηρίων του γ. *Listeria* στο μανούρι. Κατά την πρώτη ημέρα παρασκευής του προϊόντος καταμετρήθηκαν λιστέριες της τάξης 2-2,5 λογαρίθμων. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαίωσε παλαιότερες έρευνες, σύμφωνα με τις οποίες οι λιστέριες απομονώνονται από μαλακά τυριά (Bannister, 1987, Bille and Glauser, 1988). Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης λιστεριών σε μαλακά τυριά και τυριά που ωριμάζουν με μύκητες επιβεβαιώθηκε σε έρευνες που έγινε σε Η.Π.Α, Γαλλία, Ελβετία και Γερμανία (Ryse and Marth, 1991).



Σχήμα 11: Διάγραμμα της μεταβολής του αριθμού *Listeria* spp, σε δείγματα μανουριού, που συντηρήθηκαν στους 5°C για 10, 20 και 30 ημέρες.

Αυτό το επίπεδο των 100-500 λιστεριών/g μανουριού είναι σημαντικά υψηλότερο από το όριο που προτείνεται με τον κανονισμό 2073/2005 ΕΕΚ, σύμφωνα με το οποίο τρόφιμο έτοιμο προς κατανάλωση (για ενήλικα και υγιή άτομα) πρέπει για τη *L. monocytogenes* να πληροί την προδιαγραφή: $n=5$, $c=0$, απουσία σε 25g πριν το τρόφιμο αποδεσμευθεί από τον έλεγχο της επιχείρησης τροφίμων που παρήγαγε. Μετά από 10 ημέρες παρατηρείται ελαφρά μείωση της λιστέριας (0.5-1.0log), ενώ το βακτήριο δεν καταμετράται στο 1g μανουριού μετά από 20 ημέρες στους 5°C. Εκ πρώτης όψεως, το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται να έρχεται σε αντίθεση με το γεγονός ότι το βακτήριο είναι ψυχρότροφο ($T^{\circ}\text{min} = 1^{\circ}\text{C}$).



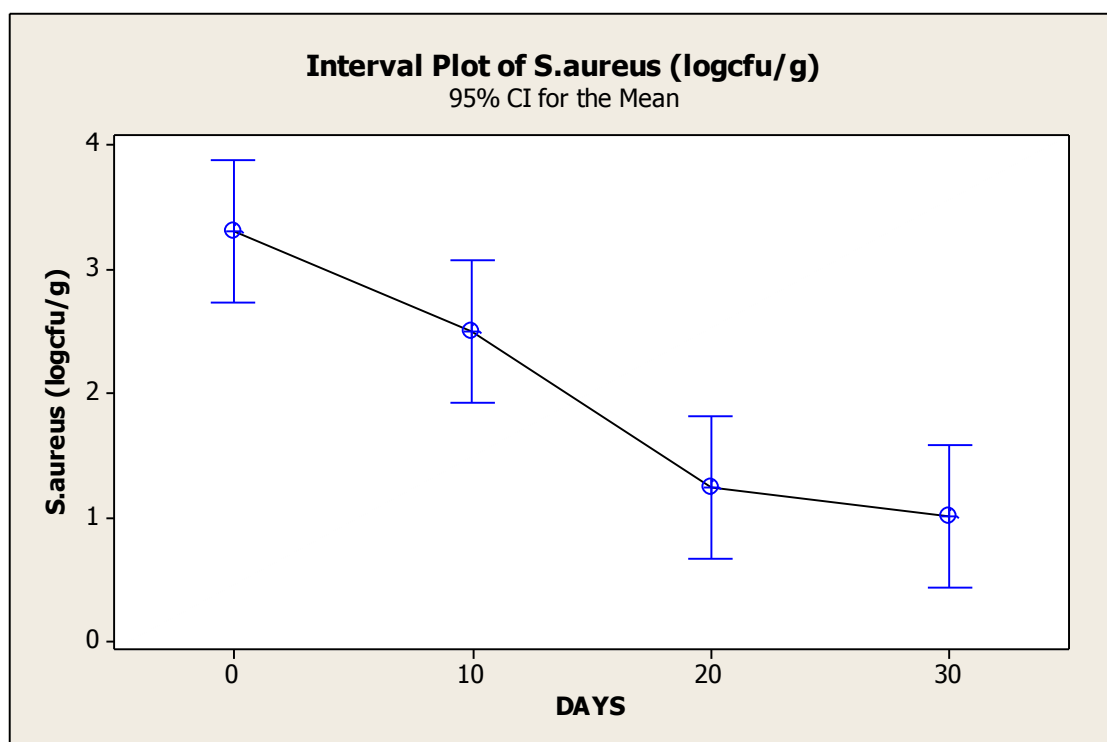
Σχήμα 12: Διάγραμμα της μεταβολής του pH σε δείγματα μανουριού, που συντηρήθηκαν στους 5°C για 10, 20 και 30 ημέρες.

Εν τούτοις, σύμφωνα με το μοντέλο των εμποδίων (hurdle technology, Garbutt, 1997) ο συνδυασμός δύο παραγόντων, δηλ. θερμοκρασία συντήρησης 5°C και μείωση του pH του μανουριού από 6.4 σε 5.4 (σχήμα 12) προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου, ενώ κάθε ένας από τους παράγοντες μόνος του δεν μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του βακτηρίου.

5) *S. aureus*

Στο σχήμα 13 αποτυπώνεται η μεταβολή του πληθυσμού του *S. aureus* κατά τη συντήρηση του μανουριού στους 5°C για διάστημα 30 ημερών. Την 1^η ημέρα παρασκευής του μανουριού καταμετρήθηκαν *S. aureus* περισσότεροι από 10³ cfu/g. Ο πληθυσμός αυτός είναι σημαντικά μεγαλύτερος από το πρότυπο που προβλέπει ο κανονισμός 2073/2005 για τα μη ωριμασμένα μαλακά τυριά (νωπά τυριά) από ορό γάλακτος (m=10, M=100). Η παρουσία του *S. aureus* στο μανούρι οφείλεται σε επαναμόλυνση του τυριού μετά τη θέρμανσή του.

Επομένως, η παρουσία του υποδηλώνει ανεπαρκή μέτρα υγιεινής κατά την παρασκευή του. Το πρόβλημα της μόλυνσης πολλών τυριών με *S. aureus* είναι γνωστό, αλλά είναι δύσκολο να προληφθεί η παρουσία του βακτηρίου στα τυριά. Όταν σε ένα τρόφιμο ο πληθυσμός του *S. aureus* είναι μεγαλύτερος από 10^5 cfu/g, απαραίτητο κριτήριο καταλληλότητας ή μη του τροφίμου αποτελεί η ανίχνευση της εντεροτοξίνης (Tatini, 1971, κανονισμός 2073/2005).

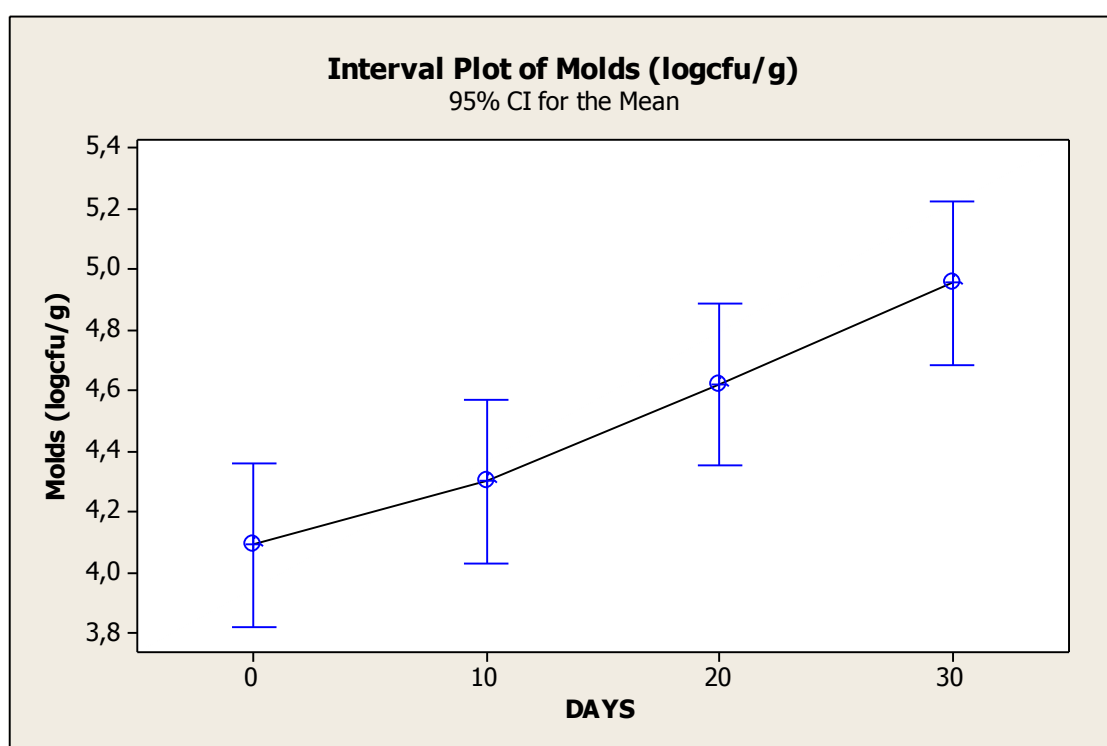


Σχήμα 13: Διάγραμμα της μεταβολής του αριθμού του *S. aureus* σε δείγματα μανουριού, που συντηρήθηκαν στους 5°C για 10, 20 και 30 ημέρες.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 13 οι σταφυλόκοκκοι μειώνονται σε 10^2 cfu/g μετά από 10 ημέρες, ενώ ο πληθυσμός τους σταθεροποιείται σε 10^1 cfu/g μετά από 20 ημέρες. Γενικά, η μείωση του αριθμού των *S. aureus* στο μανούρι ήταν αναμενόμενη, αφού οι σταφυλόκοκκοι έχουν $T^0 \text{ min} = 7^\circ\text{C}$.

6) Μύκητες-Ζύμες

Στο σχήμα 14 αποτυπώνεται η μεταβολή του πληθυσμού των μυκήτων-ζυμών κατά τη συντήρηση του μανουριού. Οι μύκητες-ζύμες με πληθυσμό 10^4 cfu/g την 1^η ημέρα παρασκευής του τυριού αποτέλεσαν τη δεύτερη πολυπληθέστερη ομάδα μικροοργανισμών μετά την O.M.X. Τη 10^η ημέρα συντήρησης δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά, ενώ μόνο μετά από 30 ημέρες στους 5⁰C ο αριθμός της αυξήθηκε ~ 1.0 λογάριθμο. Από τα 4 δείγματα (των 2 τυροκομήσεων) που αναλύθηκαν την 30^η ημέρα, μόνο ένα παρουσίασε ορατή ανάπτυξη μυκήτων.



Σχήμα 14: Διάγραμμα της μεταβολής του πληθυσμού μυκήτων και ζυμών σε δείγματα μανουριού, που συντηρήθηκαν στους 5⁰C για 10, 20 και 30 ημέρες.

Είναι γνωστό ότι η ορατή ανάπτυξη των μυκήτων στην επιφάνεια των τυριών αποτελεί την πρώτη ένδειξη αλλοίωσης που στη συνέχεια συνοδεύεται με την εμφάνιση ανεπιθύμητου χρώματος και οσμής (ICMSF, 1998).

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Όλες οι ομάδες των μικροβίων που καταμετρήθηκαν κατά την ημέρα παρασκευής του μανουριού ήταν σε επίπεδα 1-2 λογάριθμων υψηλότερα των μικροβιολογικών προτύπων που ισχύουν. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ελλιπή μέτρα καθαριότητας του εξοπλισμού και των επιφανειών του τυροκομείου καθώς και πιθανή μόλυνση από το προσωπικό.
2. Ο σημαντικότερος δείκτης δυνητικής αλλοίωσης του μανουριού κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης συντήρησης ήταν τα ψυχρότροφα μικρόβια. Ο αριθμός αυτών ($\sim 10^4$ cfu/g) παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση τη 10^η ημέρα συντήρησης (ημέρα λήξης του προϊόντος) χωρίς όμως να φθάσει στο επίπεδο 10^7 cfu/g, που αποτελεί σημείο αρχόμενης αλλοίωσης.
3. Οι μύκητες ήταν η δεύτερη πολυπληθέστερη ομάδα μικροβίων στο μανούρι ($\sim 10^4$ cfu/g). Εν τούτοις μέχρι και την 20^η ημέρα συντήρησης δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά αύξηση.
4. Ο αρχικός αριθμός των coliforms στο μανούρι (10^2 - 10^3 cfu/g) δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση μέχρι την 30^η ημέρα συντήρησης, ενώ συγκριτικά όμοια περίπου μεταβολή παρουσίασε ο αρχικός πληθυσμός και της *E. coli* (10^1 - 10^2 cfu/g).
5. Ο αριθμός των *Listeria* spp και *S. aureus* την ημέρα της παρασκευής του μανουριού κυμάνθηκε στα ίδια περίπου επίπεδα 10^2 - 10^3 cfu/g. Και οι δύο μικροβιολογικοί δείκτες παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση μετά την 20^η ημέρα συντήρησης και μειώθηκαν στο επίπεδο 0-10 cfu/g.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

- Adams R.M. and O.M.Moss (2008). Food Microbiology, 3rd ed., RSC Publishing, 252-257.
- Andrews W.H., R.S.Flowers, J. Silliker and J.S.Bailey (2001). Salmonella In: F.P.Downers and K.Ito (ed).Compendium of Methods the Microbiological Examinations of Food, 4thed, APHA, 357-380.
- Bannister B.A. (1987). *Listeria monocytogenes* meningitis associated with eating soft cheese. Journal of Infections, 15, 165-168
- Beuchat L.R and M.A. Cousin (2001): Yeasts and Molds.In: F.P.Downes and K.Ito (ed.). Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods, 4th Ed., APHA, 209-216.
- Bhatia A. and S. Zahoor (2007). *Staphylococcus aureus* enterotoxin: A review. Journal of chinal and diagnostic research, 188-197.
- Bille J. and M.P.Glauser (1988). Zur Listeriose-Situationin der Schweiz. Buntesaemes fuer Gesundheitswesens, 3, 28-29.
- Buchanan, R.G (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology (8th εκδ.) Buchanan RE, Gibbons NE.
- D'Aoust J.Y.,D.W.Warburton and A.M.Sewell (1985). *Salmonella typhimurium* phage-type 10 from Cheddar cheese implicated in a major Canadian foodborne outbreak. Journal of Food Protection, 48, 1062-1066.
- Deschenes, G., C. Casanave, F. Grimont, J.C. Desenclos, S. Benoit, M. Collin, S. Baron, P. Mariani, P.A. Grimont and H. Nivet (1996). Cluster of cases of haemolytic uraemic syndrome due to unpasteurised cheese. Pediatrival Nephrology, 10, 203-205.
- Edwards, P.E. (1972). Bacteriological Analytical Manual for Foods. Washington DC: AOAC.

- Frank, F.J. and E.H.Marsh (1977): Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by homofermentative lactic acid bacteria in skim milk.I. Comparison of strains of *Escherichia coli*. Journal of Food Protection, 40, 749-753.
- Frank, F.J. and E.H.Marsh (1978): Survey of soft and semi-soft cheese for the presence of fecal coliforms and serotypes of enteropathogenic *E.coli*. Journal of Food Protection, 41, 198-200.
- Garbutt J. (1997). Essentials of Food Microbiology, Arnodd, London, 107-108.
- Gellin B.G. and C.V. Broome (1989). Listeriosis. Journal of the American Medical Association, 261, 1313-1320.
- Griffiths M.W. (1989), *Listeria monocytogenes*: its importance in the dairy industry. Journal of the Science of Food and Agriculture, 47, 133-157.
- Hargrove R.E., F.E. McDonough and J.A. Mattingly (1969). Factors affecting survival of *Salmonella* in Cheeddar and Colby cheese. Journal of Milk and Food Technology, 32, 480-484.
- International Commission on Microbiological Specification for Foods (1998). Milk and dairy products, In: Microorganisms in Foods, Microbial Ecology of Food Commodities, ICMSF, Blackie Academic and Professional, 553.
- James S.M., S.L. Fannon and B.A. Agree (1985). Listeriosis associated with Mexican-style cheese: California, Morbidity and Mortality Weekly Reports, 34, 357-359.
- Johnson E.A., J.H.Nelson and M.Johnson (1990a). Microbial safety of cheese made from heat-treated milk. PartI. Executive summary, introduction and history. Journal of Food Protection, 53, 441-452.
- Johnson E.A., J.H.Nelson and M.Johnson (1990b). Microbial safety of cheese made from heat-treated milk. PartII. Microbiology. Journal of Food Protection, 53, 519-540.
- Johnson E.A., J.H.Nelson and M.Johnson (1990c). Microbial safety of cheese made from heat-treated milk. PartIII. Technology, discussion, recommendations, bibliography. Journal of Food Protection, 53, 610-623.
- Jones D. and H.P.R. Seeliger (1992): The Genus *Listeria*. In: Balows et al., (ed.), The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria:

Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, 2nd Ed., Vol.II, Springer-Verlag, 1595-1616.

- Kloos W.E., Schleifer.K-H. and F. Gotz (1992): The Genus *Staphylococcus*. In: Balows et al., (ed.). The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications 2nd Ed., Vol.II, Springer-Verlag, 1369-1420
- Kornacki, J.K. and J.L. Johnson (2001): Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: F.P. Downers and K.Ito (ed.), Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods, 4th Ed., APHA, 69-82.
- Le Loir Y.L., K. Baron and M. Gautier (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and molecular research, 63-76.
- Linnan M.P., L.Mascala and X.O.Lou (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. New England Journal of Medicine, 319, 823-828.
- Marier R., J.G. Wells, R.C. Swanson, W. Callahan and I.J. Mehlman (1973): An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported French cheese. Lancet, ii, 1376-1378.
- Meng J., P. Feng and M. Doyle (2001). Pathogenic *Escherichia coli*. In: F.P.Downes and K.Ito (ed.). Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods, 4th ed., APHA, 331-341.
- Microbiology Manual (2000): Oxford Listeria Selective Agar. Merck KGaA, Darmstadt, 181-182.
- Microbiology Manual (2000): VRB Agar (Violet Red Bile Agar). Merck KGaA, Darmstadt, 273.
- Midura T.F. and R.G Bryant (2001): Sampling Plans, Sample Collection, Shipment and Preparation for Analysis. In: F.P.Downes and K.Ito (ed.). Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods, 4th Ed., APHA, 13-24.
- Montiville T.J. and K.R.Matthews (2002). *Listeria monocytogenes* In: Food Microbiology, An Introduction, ASM Press, 159-173.

- Park H.S., E.H. Marth and N.F.Olson (1973): Fate of enteropathogenic strains of *Escherichia coli* during the manufacture and ripening of Camember cheese. *Journal of Milk and Food Technology*, 36, 543-546.
- Pearson L.J. and E.H.Marth (1990). *Listeria monocytogenes*-threat to a safe food supply: a review. *Journal of Dairy Sciencw*, 73, 912-928.
- Quinto E.J. and A.Capeda (1997). Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft cheese made with raw or pasteurised milk. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 291-295.
- Reitsema C.J. and D.R. Henning (1996): Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 during manufacture and curing of cheese. *Journal of Food Protection*, 59, 460-464.
- Roberts D. and M. Greenwood (2003): *Practical Food Microbiology*, 3rd Ed., Blackwell Publishing, 105-129.
- Ryser E.T. and C.W.Donnely (2001): *Listeria*. In: F.P.Downes and K.Ito (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods*, 4th Ed., APHA, 349-356
- Ryser E.T. and E.H.Marth (1991). *Listeria*, listeriosis and food safety. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Schleifer, K.H., Ludwig, W., (1995) Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In: Wood BJB, Holzapfel WH, eds. *The genera of lactic acid bacteria*. London: Chapman and Hall, 7-18.
- Tatini S.R., J.J.Jezeski, H.A.Morris, J.J.,Jr Olson and E.P.Casman (1971): Production of staphylococcal enterotoxin Ain Cheddar and Colby cheeses. *Journal of Dairy Science*,54, 815-825.
- Tompkin R.B., A.M.McNamara and G.R.Acuff (2001). *Meat and Poultry Products*. In: F.P. Downes and K. Ito (ed.). *Compedium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods* 4th ed., APHA, 463-471.
- USDA (U.S.Department of Agriculture, 1994). United States specifications for cream cheese, cream cheese with other foods, and related products. USDA Agric. Market. Serv., Dairy Div., Washington, D.C.

- USG (U.S.Government. National Archives and Records Administration 1998). CFR. Title 7.Part 58. Subpart B. Section 528-Microbiological requirements, p.126
- White C.H. and E.W.Custer (1976). Survival of *Salmonella* in Cheddar cheese. Journal of Milk and Food Technology, 39, 328-331
- Wood D.S., D.L.Collins-Thompson, D.M.Irvine and A.N.Myhr (1984): Source and persistence of *Salmonella muenster* in naturally contaminated Cheddarcheese. Journal of Food Protection, 47, 20-22
- Zehren V.L.and V.F.Zehren (1968a). Examination of large quantities of cheese for staphylococcal enterotoxin A.Journal of Dairy Science, 51, 635-644.
- Zehren V.L.and V.F.Zehren (1968b).Relation of acid development during cheese making to development of staphylococcal enterotoxin A. Journal of Dairy Science, 51, 645-649.

Ελληνική βιβλιογραφία

- Αρσένης Α. (2001). Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος, 2^η έκδοση, Εκδόσεις Γιαχούδη, Θεσσαλονίκη.
- Δεληγκάρης Ν. (2004). Μικροβιολογικές αναλύσεις τροφίμων. ΑΤΕΙ-Θες/νίκης.
- Ζερφυρίδης Κ.Γ (2001). Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος, 2^η έκδοση, Εκδόσεις Γιαχούδη, Θεσσαλονίκη.
- Κανονισμός 2073/2005 ΕΕΚ: Περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, 1-26.
- Κεχαγιάς Χ. (1997). Ποότητα γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων. Εκδόσεις ΙΩΝ, Αθήνα.
- Λιτοπούλου-Τζανετάκη, Ε. (1989). «Μικροβιολογία γάλακτος». Α.Π.Θ. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων.
- Παπαντωνίου Δ. (2011). Μικροβιολογία Τροφίμων. ΑΤΕΙ-Θεσσαλονίκης.