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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της επίδρασης της σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας συντήρησης στην επιβίωση της *Listeria monocytogenes* σε φρέσκα έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά

Σμυρνιώτης Πέτρος

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2012

Μελέτη της επίδρασης της σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας συντήρησης στην επιβίωση της *Listeria monocytogenes* σε φρέσκα έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά

Σμυρνιώτης Πέτρος

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονικης (ΑΤΕΙ),
Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη ΤΘ 141,

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

Εισηγητής: Λυκοτραφίτη Ελένη

Εξεταστική επιτροπή: Παπαντωνίου Δημήτριος
Rhoades Jonathan

Μελέτη της επίδρασης της σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας συντήρησης στην επιβίωση της *Listeria monocytogenes* σε φρέσκα έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά

Σμυρνιώτης Πέτρος

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονικης (ΑΤΕΙ), Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη ΤΘ 141,

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής ήταν η μελέτη της επίδρασης διαφορετικών τιμών σχετικής υγρασίας (53 και 90%) και θερμοκρασίας (10, 20 και 30 ^{o}C) ως προς την επιβίωση/ανάπτυξη του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes*.σε φρέσκα έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στους 10 ^{o}C και στα δυο ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* στο μαρούλι (1,2 και 0,8 log cfu.cm^{-2} αντίστοιχα) και τον μαϊντανό (0,8 και 0,6 log cfu.g^{-1}) μετά από 7 μέρες πειράματος, ενώ στο αγγούρι παρατηρήθηκε αύξηση κατά 0,6 και 1,3 log cfu.cm^{-2} αντίστοιχα. Στους 20 ^{o}C σε τιμές σχετικής υγρασίας 53 και 90% παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* στο μαρούλι (0,9 και 2,1 log cfu.cm^{-2} αντίστοιχα) και τον μαϊντανό (1,5 και 0,7 log cfu.g^{-1}) μετά από 5 μέρες πειράματος, ενώ αντίθετα στο αγγούρι τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση κατά 0,5 και 0,8 log cfu.cm^{-2} αντίστοιχα. Στους 30 ^{o}C και στις δυο τιμές σχετικής υγρασίας 53 και 90% παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* στο μαρούλι κατά 1 log cfu.cm^{-2}. Στον μαϊντανό παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* κατά 0,9 log cfu.g^{-}1 σε σχετική υγρασία 53% και κατά 0,6 log cfu.g^{-1} σε σχετική υγρασία 90% μετά από 24 h πειράματος. Στο αγγούρι παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* κατά 0,7 και 1,1 log cfu.cm^{-2} σε τιμές σχετικής υγρασίας 53 και 90% αντίστοιχα μετά από 24 h πειράματος.

Συμπερασματικά τόσο η θερμοκρασία όσο και το ποσοστό σχετικής υγρασίας καθώς και το είδος του υπό εξέταση λαχανικού είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη/επιβίωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes*.

Περιεχόμενα

1.Λαχανικά....1
1.1. Αγγούρι....1
1.1.1. Συγκομιδή....2
1.1.2. Θρεπτική αξία....2
1.2. Μαϊντανός....3
1.2.1. Συγκομιδή....4
1.2.2. Θρεπτική αξία....5
1.3. Μαρούλι....6
1.3.1. Συγκομιδή....8
1.3.2. Θρεπτική αξία....9
2. Έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά....11
2.1. Μικροχλωρίδα των έτοιμων προς κατανάλωση λαχανικών....11
2.1.1. Βακτήρια....12
2.1.2. Μύκητες....13
2.1.3. Ζύμες....14
2.2. Παρουσία παθογόνων βακτηρίων σε έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά....15
2.2.1. *Listeria monocytogenes*....16
2.2.2. Άλλα παθογόνα βακτήρια....19
2.3. Τρόποι επιμόλυνσης λαχανικών με παθογόνα....19
2.4. Πιθανές αιτίες για τους αυξημένους αριθμούς τροφολοιμόξεων....21
3. *Listeria monocytogenes*....23
3.1 Εισαγωγή....23
3.2. Ταξινόμηση της *Listeria*....24
3.3. Ανάπτυξη....25
3.4. Διάδοση της *L. monocytogenes* και μετάδοση στον άνθρωπο....25
3.5. Τοξικές ιδιότητες....27
3.6. Λιστερίωση....28
3.6.1. Συμπτώματα....30
3.6.2. Παθογένεια....31
4. Νομοθεσία σχετικά με την *L. monocytogenes* στα τρόφιμα....33
5. Σχετική υγρασία....35
6. Υλικά και μέθοδοι....40
6.1.Αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής....40
6.2. Προετοιμασία πριν τον ενοφθαλμισμό....40
6.2.1. Προετοιμασία δειγμάτων λαχανικών....40

6.2.2. Προετοιμασία ενοφθαλμίσματος 41
6.3. Πειραματική Διαδικασία 42
6.3.1.Πειραματική διαδικασία της επιβίωσης της *L.monocytogenes* σε λαχανικά διατηρημένα σε διαφορετικές θερμοκρασίες με επίδραση διαφορετικής σχετικής υγρασίας. 42
6.4. Καταμέτρηση αποικιών *L. monocytogenes* 42
6.5. Στατιστική ανάλυση 43
7. Αποτελέσματα 44
7.1. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε μαρούλι διατηρημένο στους 30°C για 24h σε 53 και 90%ποσοστά σχετικής υγρασίας 44
7.2. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε αγγούρι διατηρημένο στους 30 ^{o}C για 24h σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας. 45
7.3. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε μαϊντανό διατηρημένο στους 30 ^{o}C για 24h σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας. 46
7.4. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε μαρούλι διατηρημένο στους 20 ^{o}C για χρόνο επώασης 5 ημερών σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας. 47
7.5. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε αγγούρι διατηρημένο στους 20 ^{o}C για χρόνο επώασης 5 ημερών σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας. 48
7.6. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε μαϊντανό διατηρημένο στους 20 ^{o}C για χρόνο επώασης 5 ημερών σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας. 49
7.7. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε μαρούλι διατηρημένο στους 10 ^{o}C για χρόνο επώασης 7 ημερών σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας. 51
7.8. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε αγγούρι διατηρημένο στους 10 ^{o}C για χρόνο επώασης 7 ημερών σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας. 52
7.9. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε μαϊντανό διατηρημένο στους 10 ^{o}C για χρόνο επώασης 7 ημερών σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας. 53
8.Συζητηση 55
9. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα 60
10. Βιβλιογραφία 61

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1.1. Μέση χημική σύσταση ακατέργαστου αγγουριού (με τη φλούδα) ανά 100g.....3

Πίνακας 1.2. Θρεπτική αξία μαϊντανού ανά 100g. 6

Πίνακας 1.3. Περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά των τεσσάρων τύπων μαρουλιού (ανά 100 g).....10

Πίνακας 2.1. Παραδείγματα παθογόνων μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από φρέσκα λαχανικά. 15

Πίνακας 2.2. Φρέσκα λαχανικά, στα οποία έχει βρεθεί *L. monocytogenes*.....18

Πίνακας 3.1. Ταξινόμηση των ειδών της Listeria και χαρακτηριστικά διαφοροποίησής τους.....24

Πίνακας 3.2. Εκτίμηση των πέντε πιο κοινών αιτιών θανάτου από τροφογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς στις ΗΠΑ, και στην Αγγλία & Ουαλία.....29

Πίνακας 3.3. Περιπτώσεις λιστερίωσης για συγκεκριμένο τύπο ασθενών της εβδομάδες 1-12 από το 2005-2011 σε Αγγλία και Ουαλία.....30

Πίνακας 5.1. Κλιματικά δεδομένα κατά τη διάρκεια του έτους στην Αθήνα.....36

Πίνακας 5.2. Κλιματικά δεδομένα κατά τη διάρκεια του έτους στην Θεσσαλονίκη. 36

Πίνακας 5.3. Συνιστώμενη θερμοκρασία, σχετική υγρασία και διάρκεια αποθήκευσης τροφίμων σε ψύξη.....37

Ευρετήριο Σχημάτων

Σχήμα 3.1. Απεικόνιση κυττάρων της *L. monocytogenes*.....23

Σχήμα 3.2. Πιθανές οδοί μέσω των οποίων γίνεται η μετάδοση της *L. monocytogenes* στους ανθρώπους μέσω των λαχανικών 26

Σχήμα 7.1. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαρούλι διατηρημένο στους 30 ^{o}C για 24 h σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας.....44

Σχήμα 7.2. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε αγγούρι διατηρημένο στους 30 ^{o}C για 24 h σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας. 45

Σχήμα 7.3. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαϊντανό διατηρημένο στους 30 ^{o}C για 24 h σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας. 46

Σχήμα 7.4. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαρούλι διατηρημένο στους 20 ^{o}C για 5 ημέρες σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας..47

Σχήμα 7.5. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε αγγούρι διατηρημένο στους 20 ^{o}C για 5 ημέρες σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας..48

Σχήμα 7.6. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαϊντανό διατηρημένο στους 20 ^{o}C για 5 ημέρες σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας..50

Σχήμα 7.7. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαρούλι διατηρημένο στους 10 ^{o}C για 7 ημέρες σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας..51

Σχήμα 7.8. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε αγγούρι διατηρημένο στους 10 ^{o}C για 7 ημέρες σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας..52

Σχήμα 7.9. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαϊντανό διατηρημένο στους 10 ^{o}C για 7 ημέρες σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας..53

Συντμήσεις

B. cereus: *Bacillus cereus*

CAMP: Christie-Atkins-Munch-Petersen

Cfu: colony-forming unit

E. coli: *Escherichia coli*

Haccp (Hazard analysis and critical control point): Κρίσιμα σημεία ελέγχου και ανάλυση κινδύνου

L. grayi: *Listeria grayi*

L. innocua: *Listeria innocua*

L. ivanovii: *Listeria ivanovii*

LLO (listeriolysin O): Λιστεριολυσίνη Ο

L. monocytogenes: *Listeria monocytogenes*

L .seeligeri: *Listeria seeligeri*

L. welshimeri: *Listeria welshimeri*

MAP (Modified Atmosphere Packaging): Συσκευασία Τροποποιημένης Ατμόσφαιρας

RH (relative humidity)**:** σχετική υγρασία

RTE (Ready to Eat): Έτοιμα προς κατανάλωση

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

1.Λαχανικά

1.1. Αγγούρι

Το αγγούρι είναι καρπός του φυτού της αγγουριάς (Cucumis sativus) και ανήκει στην οικογένεια κολοκυνθοειδή (Cucurbitaceae) που είναι η ίδια οικογένεια με τα φυτά που παράγουν το καρπούζι, το πεπόνι και το κολοκύθι. Ξεκίνησε να καλλιεργείται πριν από 3,000 χρόνια και πηγή προέλευσης του ήταν η Ινδία από την οποία διαδόθηκε αρχικά στην αρχαία Ελλάδα και την Ρώμη και στην συνέχεια στην υπόλοιπη Ευρώπη. Τα άνθη βρίσκονται επάνω στο φυτό και είναι μικρά και κίτρινα. Τα άνθη που υπάρχουν στο φυτό είναι αρσενικά και θηλυκά. Τα αγγούρια είναι κυλινδρικά, συνήθως, ακανόνιστα και διαφορετικού μεγέθους, με φλοιό ομαλό ή με εξογκώματα ακανθωτά και χρώμα πράσινο βαθύ μέχρι λευκό. Οι σπόροι είναι μακρουλοί και ασπριδεροί, πολύ όμοιοι με εκείνους της πεπονιάς. Η περίοδος καλλιέργειας των αγγουριών είναι το καλοκαίρι όπου καλλιεργούνται στην ύπαιθρο ενώ τους υπόλοιπους μήνες του χρόνου καλλιεργούνται σε θερμοκήπια, καθώς παρουσιάζουν ευαισθησία στο κρύο. Οι καλύτερες συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη των αγγουριών είναι υψηλές τιμές σε θερμοκρασία και υγρασία. Οι καλύτερες θερμοκρασίες για την ανάπτυξη τους είναι 18-24°C την ημέρα και 20°C το βράδυ, με σχετική υγρασία 70-80% και θερμοκρασία εδάφους 18°C (Φανουράκη, 2004). Στην αγορά κυκλοφορούν τέσσερις ποικιλίες υβριδίων αγγουριάς ανάλογα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των καρπών:

Α) Αγγούρια αγκαθωτά, τεμαχιζόμενα σε φέτες για σαλάτα, τύπου ‘Slicer’ για υπαίθρια καλλιέργεια.

Β) Αγγούρια κοντά αγκαθωτά, χρησιμοποιούμενα για τουρσί (‘pickling cucumbers’).

Γ) Τα αγγούρια τύπου mini για υπαίθρια καλλιέργεια με μήκος καρπού στα 12-20cm (‘short cucumbers’).

Δ) Τα long type με 100% θηλυκά άνθη, που δίνουν καρπούς άσπερμους με μήκος περίπου 30cm και βάρος καρπού 400g και άνω.

Α

Β

Γ

Δ

1.1.1. Συγκομιδή

Η αγγουριά είναι θερμοαπαιτητικό φυτό, που δεν αντέχει σε χαμηλές θερμοκρασίες αλλά και σε υψηλές θερμοκρασίες ο καρπός του αγγουριού κιτρινίζει με γρήγορο ρυθμό. Επομένως στις θερμοκρασίες που αναφέραμε παραπάνω από 18-24°C και με σχετική υγρασία 70-80% έχουμε τις καλύτερες συνθήκες ανάπτυξης. Οι σπόροι σε 25°C φυτρώνουν σε 2-5 μέρες (Φανουράκη,2004). Για να ενισχυθεί η ανάπτυξη των μικρών φυτών τους χειμωνιάτικους μήνες πρέπει να δοθεί τεχνητός φωτισμός επί 15 μέρες. Επιπλέον σε περιπτώσεις έκθεσης του καρπού σε θερμοκρασία κάτω των 10°C για χρονική διάρκεια 2 ημερών και άνω προκαλεί στο αγγούρι ζημιές δεδομένου ότι το αγγούρι ως φυτό όπως αναφέραμε είναι θερμοαπαιτητικό και ευπαθές στο ψύχος. Ο καρπός του αγγουριού μπορεί επίσης να διατηρηθεί σε καλή κατάσταση για περίπου 10 ημέρες σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 10-13°C.

1.1.2. Θρεπτική αξία

Στον παρακάτω **πίνακα 1.1.** παρουσιάζεται η χημική σύσταση του αγγουριού (ακατέργαστο, με τη φλούδα).

Πίνακας 1.1. Μέση χημική σύσταση ακατέργαστου αγγουριού (με τη φλούδα) ανά 100g.

Νερό	95g
Ενέργεια	65KJ
Υδατάνθρακες	3,63g
Σάκχαρα	1,67g
Φυτικές ίνες	0,5g
Λίπος	0,11g
Πρωτεΐνες	0,65g
Βιταμίνη B_1 (Θειαμίνη)	0,027 mg
Βιταμίνη B_2 (Ριβοφλαβίνη)	0,033 mg
Βιταμίνη B_3 (Νιασίνη)	0,098 mg
Βιταμίνη B_5 (Παντοθενικό οξύ)	0,259 mg
Βιταμίνη C	2,8 mg
Ασβέστιο	16 mg
Μαγνήσιο	13 mg
Φώσφορος	24 mg
Κάλιο	147 mg
Σίδηρος	0,28 mg

Πηγή: USDA

1.2. Μαϊντανός

Ο μαϊντανός (Petroselinum sativum, Petroselinum crispum) ανήκει στην οικογένεια των Σεληνοειδών (Apiaceae) ή Σκιαδοφόρων (Umbelliferae). Είναι ένα διετές φυτό που ευδοκιμεί σε εύκρατες περιοχές και τα φύλλα του χρησιμοποιούνται τόσο στη μαγειρική όσο και σε διάφορες σαλάτες. Οι αρχαίοι Έλληνες το χρησιμοποίησαν σαν θεραπευτικό φάρμακο σε διάφορες παθήσεις αλλά και σαν αρωματικό βότανο. Πολλά είδη μαϊντανού είναι διαδεδομένα σε διάφορες χώρες του κόσμου, ωστόσο τρεις είναι οι κύριες ποικιλίες στις οποίες διακρίνεται (Wikipedia):

1. Ο απλός μαϊντανός ή μαϊντανός με επίπεδα φύλλα (plain, flat-leaf parsley), που ονομάζεται και 'Ιταλικός μαϊντανός', Petroselinum crispum var. neopolitanum, προτιμάται από κάποιους ως ο πιο εύκολος για να καλλιεργηθεί,

καθώς είναι ανεκτικός τόσο στον ήλιο όσο και την βροχή. Είναι επίπεδος με κατσαρά φύλλα και διακρίνεται για την έντονη γεύση και άρωμά του πράγμα που τον καθιστά επιθυμητό στην μαγειρική. Το ύψος του μπορεί να φτάσει το 1m.

2. Ο σγουρός μαϊντανός ή κοινός μαϊντανός (curly, common parsley), Petroselinum crispum var. crispum, καλλιεργείται περισσότερο στην Γαλλία, τη Γερμανία, το Βέλγιο και στις Η.Π.Α. Το συγκεκριμένο είδος μαϊντανού προτιμάται σαν διακοσμητικό στοιχείο στο γαρνίρισμα των πιάτων. Τα είδη της ποικιλίας αυτής φτάνουν σε ύψος τα 20-35cm.

3. Ο μαϊντανός με μεγάλη ρίζα ή μαϊντανός Hamburg (turnip rooted, Hamburg parsley), Petroselinum crispum var. tuberosum, λόγω της καλλιέργειας του ως ρίζα λαχανικού χρησιμοποιείται σε περισσότερο εξειδικευμένες αγορές. Αυτό το είδος μαϊντανού εμφανίζει διογκωμένες ρίζες που φτάνουν τα 12-15cm. Η χρήση του συγκεκριμένου είδους είναι συνηθισμένη στις χώρες της κεντρικής και ανατολικής Ευρώπης καθώς χρησιμοποιείται στις σούπες. Το φύλλωμά του αποτελείται από ψηλά φύλλα.

1.2.1. Συγκομιδή

Κατά την συγκομιδή του μαϊντανού δεν πρέπει να υπάρχει ανάμιξη μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών και πρέπει να γίνεται σταδιακά, αφού τα φυτά αναπτύξουν ικανοποιητικό φύλλωμα.

Ο μαϊντανός είναι φυτό που αντέχει σε χαμηλές θερμοκρασίες, καθώς σε αυτές οφείλεται η καλή ανάπτυξη του φυλλώματός του ενώ οι υψηλές θερμοκρασίες χρειάζονται μόνο κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής φάσης.

Οι ιδανικές θερμοκρασίες που ευνοούν την βλάστηση του σπόρου είναι από 20-30°C ενώ για την ανάπτυξη του φυτού κυμαίνονται από 15-18°C (Θανόπουλος, 2008). Ο μαϊντανός ως φυλλώδες λαχανικό, διατηρείται μόνο για λίγες ημέρες στο ψυγείο. Η

συντήρηση του μαϊντανού κατά την αποθήκευση είναι καλύτερο να γίνεται στου $0^{o}C$ με 95-100% σχετική υγρασία (RH) (Parthasarathy, Chempakam & Zachariah, 2008). Ο μίσχος του μαϊντανού κιτρινίζει άμεσα σε περίπτωση που βρεθεί σε θερμοκρασία υψηλότερη από τους $10^{o}C$. Αυτό οφείλεται στον υψηλό ρυθμό αναπνοής του μαϊντανού. Σημαντικός είναι επίσης ο κίνδυνος της αφυδάτωσης καθώς αποτελεί την πιο σημαντική αιτία μετασυλλεκτικής απώλειας (Snowdon, 2010).
Ο μικροοργανισμός *Erwinia carotovora* προκαλεί στο μαϊντανό, την βακτηριακή σήψη, η οποία παρατηρείται κατά την διατήρηση του στο ψυγείο και εμφανίζεται με τη μορφή σκούρας πράσινης γλοιώδους ουσίας, ενώ ο ιστός του κόβεται τελείως. Σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και υγρασίας, ευνοείται η βακτηριακή σήψη, η οποία συνεχίζει κατά τη διατήρηση στο ψυγείο (Snowdon, 2010).

1.2.2. Θρεπτική αξία

Στον **πίνακα 1.2.** παρουσιάζονται τα συστατικά και η θρεπτική αξία ανά 100g μαϊντανού. Ο μαϊντανός αποτελεί πλούσια πηγή ασβεστίου, σιδήρου και φολλικού οξέος και έχει υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνες C, β-καροτένιο, θειαμίνη και τη ριβοφλαβίνη.

Πίνακας 1.2. Θρεπτική αξία μαϊντανού ανά 100g.

Ενέργεια	151KJ
Υδατάνθρακες	6,3g
Σάκχαρα	0,9g
Φυτικές ίνες	3,3g
Λίπος	0,8g
Πρωτεΐνες	3,0g
Βιταμίνη B_1 (Θειαμίνη)	0,1 mg
Βιταμίνη B_2 (Ριβοφλαβίνη)	0,2 mg
Βιταμίνη B_3 (Νιασίνη)	1,3 mg
Βιταμίνη B_5 (Παντοθενικό οξύ)	0,4 mg
Βιταμίνη C	133,0 mg
Ασβέστιο	138,0 mg
Μαγνήσιο	50,0 mg
Φώσφορος	58,0 mg
Κάλιο	554 mg
Σίδηρος	6,2 mg
Φολλικό οξύ	152 mg

Πηγή: USDA

1.3. Μαρούλι

Το μαρούλι είναι ετήσιο, ποώδες φυτό που ανήκει στην οικογένεια Compositae. Το είδος που καλλιεργείται ονομάζεται Lactuca sativa και ανήκει στο γένος Lactuca. Το μαρούλι, σε αντίθεση με πολλά άλλα είδη λαχανικών που καλλιεργούνται σε ορισμένες περιοχές, έχει διαδοθεί και καλλιεργείται σχεδόν σε όλη την υφήλιο, ως ετήσιο λαχανικό.

Στην Ελλάδα, το μαρούλι καλλιεργείται ως υπαίθρια καλλιέργεια καθόλη τη διάρκεια του χρόνου, κυρίως από νωρίς το φθινόπωρο μέχρι αργά την άνοιξη. Το καλοκαίρι είναι μια περίοδος όπου το μαρούλι περιορίζεται σημαντικά, εξαιτίας των προβλημάτων που δημιουργούνται από τις υψηλές θερμοκρασίες (Ζούμη, 2009). Υπάρχουν πολλές ποικιλίες καλλιεργήσιμου μαρουλιού που μαζί με τα υβρίδια κατατάσσονται σε πέντε διαφορετικούς τύπους (Σιώμος, 2004):

1. Συμπαγής κεφαλωτός (crisphead ή iceberg):

Σχηματίζει σφαιρική κεφαλή, τα φύλλα είναι κυματοειδή (σγουρά) τραγανά και εύθραυστα, ενώ το βάρος του μπορεί να φτάσει τα 1000g και η διάμετρός του τα

15cm ή και παραπάνω. Μπορεί να μεταφερθεί σε μεγάλες αποστάσεις καθώς είναι ανθεκτικός στου μετασυλλεκτικούς χειρισμούς. Το χρώμα του ποικίλει από ελαφρύ μέχρι βαθύτερο πράσινο. Συγκεκριμένα τα εξωτερικά του φύλλα έχουν έντονο πράσινο χρώμα, ενώ τα εσωτερικά του φύλλα είναι ανοιχτότερου χρώματος. Είναι ποικιλία που καλλιεργείται κυρίως στις Η.Π.Α και τον Καναδά και είναι ο πιο διαδεδομένος τύπος παγκόσμια.

2. Ρωμάνα (romaine ή cos)

Ονομάζεται Κως λόγω της καλλιέργειάς του στη νήσο Κω και Ρωμάνα γιατί

καλλιεργείται από την Ρωμαϊκή εποχή. Φυτό ψηλό, με λεπτή μικρή επιμήκη κεφαλή στο εσωτερικό και λεπτά μακριά φύλλα στο εξωτερικό με χρώμα συνήθως σκούρο πράσινο. Υπάρχουν καλλιεργούμενες ποικιλίες σε διάφορες αποχρώσεις του πράσινου χρώματος. Σε σχέση με τους άλλους τύπους είναι ο πιο ευαίσθητος στις αντίξοες καιρικές συνθήκες. Είναι το μαρούλι που προτιμάται στην Ελλάδα, στη Β. Αφρική και στη Μέση Ανατολή.

3. Χαλαρός κεφαλωτός ή βουτύρου ή ημικεφαλωτός (butterhead)

Το φυτό αυτό χαρακτηρίζεται από σφαιρική κεφαλή, τα φύλλα του είναι μαλακά και

το χρώμα του ποικίλει από ελαφρύ έως βαθύ πράσινο. Το κεντρικό νεύρο όπως και τα πλάγια δεν είναι τόσο χαρακτηριστικά και ευδιάκριτα όπως συμβαίνει με τον κεφαλωτό. Επιπλέον τα φύλλα του είναι γυαλιστερά και παρουσιάζουν μεγάλη ευλυγισία ωστόσο απαιτούν προσεχτικούς χειρισμούς κατά την διάρκεια της συγκομιδής αλλά και μετά κατά την αποθήκευση καθώς πληγώνονται και σχίζονται εύκολα. Είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος μαρουλιού στην Κεντρική και

Βόρεια Ευρώπη και καλλιεργείται συνήθως στο θερμοκήπιο. Στην Ελλάδα ο τύπος αυτός μαρουλιού είναι σχεδόν άγνωστος.

4. Σπαραγγιού ή κινέζικο μαρούλι (stem lettuce ή celtuce)

Ο τύπος αυτός μαρουλιού (Lactuca sativa var. augustana Irish ή var. asparagina Bailey) χαρακτηρίζεται από πολυετή στενά φύλλα με παχύ σαρκώδη βλαστό. Οι ποικιλίες αυτού του τύπου καλλιεργούνται στην Ασία κυρίως για τους βλαστούς τους.

5. Σαλάτα (looseleaf ή bunching ή leaf)

Τα φυτά αυτού του τύπου δεν σχηματίζουν κεφαλή. Τα φύλλα του είναι κυματοειδή,

κατσαρά και το χρώμα τους ποικίλει στις διάφορες αποχρώσεις του πράσινου με εξαίρεση τα εξωτερικά φύλλα που ορισμένες φορές φέρουν κοκκινωπή απόχρωση. Το συγκεκριμένο είδος έχει περιορισμένη αντοχή στο ψύχος και μετασυλλεκτική ζωή. Είναι διαδεδομένο στις χώρες της Κεντρικής και Βόρειας Ευρώπης, ενώ είναι αρκετά γνωστός και στην Ελλάδα. Καλλιεργείται κυρίως σε θερμοκήπια κατά τη διάρκεια του χειμώνα και στην ύπαιθρο στις χώρες της Μεσογείου (Ζούμη, 2009).

1.3.1. Συγκομιδή

Το μαρούλι είναι φυτό που αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε χαμηλές θερμοκρασίες (μπορεί να αντέξει έως -5°C). Οι άριστες θερμοκρασίες τόσο κατά τη διάρκεια της ημέρας όσο και κατά τη διάρκεια της νύχτας ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο του μαρουλιού και την ποικιλία, την ηλικία του φυτού, την εποχή, την ένταση του φωτισμού και το επίπεδο CO_2 (Ζούμη, 2009).

Γενικά, συνιστάται η θερμοκρασία κατά την διάρκεια της νύχτας να κυμαίνεται από 5-7°C χαμηλότερα από την αντίστοιχη θερμοκρασία της ημέρας και η θερμοκρασία στο σπορείο που τα φυτά είναι μικρά, να κυμαίνεται μεταξύ 2-3°C υψηλότερα από τη θερμοκρασία στον κύριο χώρο ανάπτυξης της καλλιέργειας που τα φυτά είναι μεγαλύτερα. Η άριστη θερμοκρασία για την βλάστηση των σπόρων είναι μεταξύ 15-21°C. Συγκεκριμένα για:

- Για τα κεφαλωτά μαρούλια οι επιθυμητές θερμοκρασίες είναι οι εξής:

Θερμοκρασία νύκτας: 15°C

Θερμοκρασία ημέρας με συννεφιά: 17-20°C

Θερμοκρασία ηλιόλουστης ημέρας: 21-24°C

- Για τα κατσαρά κεφαλωτά μαρούλια (iceberg) συνιστώνται οι εξής θερμοκρασίες:

Θερμοκρασία νύκτας: 10-15°C

Θερμοκρασία ημέρας: 13-21°C

Οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται παραπάνω στις θερμοκρασίες συνδέονται άμεσα με την ένταση του φωτισμού. Γι' αυτό το λόγο μπορούν διάφορες ποικιλίες μαρουλιού να καλλιεργούνται σε διαφορετικές εποχές του χρόνου, επειδή έχουν την ικανότητα ευρείας προσαρμογής σε διάφορες θερμοκρασίες (Ζούμη, 2009).

Το κυριότερο κριτήριο κατά τη συγκομιδή του μαρουλιού είναι το μέγεθος του.

Το μαρούλι παρουσιάζει την υψηλότερη διαπνοή σε σχέση με τα άλλα λαχανοκομικά προϊόντα. Ανάλογα με τον τύπο του μπορεί να συντηρηθεί από μια έως τρεις εβδομάδες αν βρεθεί στις κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας (θερμοκρασία ≈ 0°C και σχετική υγρασία >95%).

Κατά τη διάρκεια της περιόδου συντήρησης είναι πιθανό να εμφανιστούν διάφορες ασθένειες πάνω στο μαρούλι, όπως η βακτηριακή σήψη που αποτελεί την πιο συνηθισμένη ασθένεια Η κοκκινόμαυρη (russet spotting) και η καστανή (brown stain) κηλίδωση των φύλλων αποτελούν συνηθισμένες μετασυλλεκτικές ανωμαλίες των μαρουλιών. Ορισμένες μάλιστα ποικιλίες μαρουλιού παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανωμαλία αυτή (Σιώμος, 2004).

1.3.2. Θρεπτική αξία

Το μαρούλι είναι ένα τρόφιμο με χαμηλές θερμίδες και αποτελεί πηγή βιταμίνης Α και φολικού οξέος. Έχει υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (94-96%) και είναι καλή πηγή φυτικών ινών, μετάλλων και αποτελεί σημαντική πηγή ασβεστίου και φωσφόρου.

Το μαρούλι τύπου Κως ή Ρωμάνα είναι πιο θρεπτικό από τον κεφαλωτό τύπο μαρουλιού, γιατί έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε βιταμίνες Α και C. Μεταξύ των διαφορετικών τύπων μαρουλιού υπάρχουν σημαντικές διαφορές ως προς την περιεκτικότητα τους σε θρεπτικά συστατικά. Η χημική σύσταση των διαφόρων τύπων μαρουλιού παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1.3. Περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά των τεσσάρων τύπων μαρουλιού (ανά 100 g).

Θρεπτική αξία	**Κεφαλωτός**	**Ημικεφαλωτός**	**Κως ή Ρωμάνα**	**Σαλάτα**
Νερό (%)	95,5	95,1	94	94
Ενέργεια (Cal)	13	14	18	18
Υδατάνθρακες(%)	2,9	2,5	3,5	3,5
Πρωτεΐνες (%)	0,9	1,2	1,3	1,3
Λίπος (%)	0,1	0,2	0,3	0,3
Φυτικές ίνες (%)	0,5	0,5	0,7	0,7
Βιταμίνη Α (IU)	330	970	1900	1900
Βιταμίνη C (mg)	6	8	18	18
Θειαμίνη (mg)	0,06	0,06	0,05	0,05
Ριβοφλαβίνη (mg)	0,06	0,06	0,08	0,08
Νιασίνη (mg)	0,3	0,3	0,4	0,4
Ασβέστιο (mg)	20	35	68	68
Σίδηρος (mg)	0,5	2	1,4	1,4
Φώσφορος (mg)	22	26	25	25
Κάλιο (mg)	175	264	264	264
Νάτριο (mg)	9	9	9	9

Πηγή: Σιώμος (2004)

2. Έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά

Στα μεγάλα αστικά κέντρα ο ρυθμός ζωής είναι εξαιρετικά γρήγορος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα να γίνονται ολοένα και πιο δημοφιλή τα τελευταία χρόνια. Έτσι και στα έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά καθημερινά αυξάνεται η ζήτησή τους από τους καταναλωτές.
Ως φρεσκοκομμένο προϊόν (fresh cut product) χαρακτηρίζεται, σύμφωνα με την International Fresh-Cut Produce Association (IFPA), ένα 'φρούτο ή λαχανικό που έχει υποστεί αποφλοίωση ή τεμαχισμό ή κόψιμο με φυσικές μεθόδους από την αρχική του μορφή και έχει συσκευαστεί παραμένοντας σε φρέσκια κατάσταση' (IFPA and PMA, 1999). Σκοπός αυτής της επεξεργασίας είναι να προσφέρεται στους καταναλωτές ένα τρόφιμο υψηλής θρεπτικής αξίας, με ευχάριστη γεύση και άρωμα (Corbo *et al*. 2010). Επιπλέον είναι σημαντικό να διατηρήσει την φρεσκάδα του για μεγάλο χρονικό διάστημα και να έχει ικανοποιητική διάρκεια ζωής ώστε να είναι ελκυστικό στο καταναλωτικό κοινό (Ölmez & Kretzschmar, 2009).
Τις τελευταίες δεκαετίες, γίνεται προσπάθεια βελτίωσης της ποιότητας των φρεσκοκομμένων προϊόντων με στόχο την ικανοποίηση των καταναλωτών και την αύξηση της παραγωγής διατηρώντας ανεπηρέαστη την ποιότητα και το περιβάλλον. Η προσπάθεια που γίνεται έχει στόχο την παραγωγή φρέσκων και με υψηλή θρεπτική αξία τροφίμων. Εξαιτίας της αυξημένης ζήτησης αυτών των προϊόντων χρειάζεται σχεδιασμός νέων τεχνικών επεξεργασίας, ώστε να αυξηθεί η διάρκεια ζωής των φρεσκοκομμένων προϊόντων (Corbo *et al*. 2010).
Η βιομηχανία τροφίμων έχει δώσει ιδιαίτερη προσοχή στα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα εξαιτίας της ζήτησης και του έντονου ενδιαφέροντος των καταναλωτών. Τα σημεία στα οποία έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία είναι η ελαχιστοποίηση της πιθανότητας ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών, η αύξηση της διάρκειας ζωής τους στο ψυγείο και η κατανάλωση των προϊόντων χωρίς επιπλέον επεξεργασία (FDA/FSIS, 2001, FAO, 2004).

2.1. Μικροχλωρίδα των έτοιμων προς κατανάλωση λαχανικών

Η μικροβιακή χλωρίδα των φρούτων και λαχανικών μεταφέρεται συνήθως από το αγρόκτημα στο τραπέζι. Το προϊόν είναι εκτεθειμένο σε πιθανή μικροβιακή μόλυνση

σε κάθε βήμα, συμπεριλαμβανομένης της καλλιέργειας, της συγκομιδής, της μεταφοράς, της συσκευασίας, της αποθήκευσης έως και της διάθεσής του στον καταναλωτή. Η μικροβιακή αλλοίωση και η μόλυνση με παθογόνους μικροοργανισμούς αποτελεί μείζον πρόβλημα στην ασφάλεια των τροφίμων (FDA, 2000). Επομένως είναι πολλοί οι παράγοντες που καθορίζουν τόσο το είδος των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στα έτοιμα προς κατανάλωση φρούτα και λαχανικά όσο και τον πληθυσμό τους (Beuchat, 2002).

Η μικροχλωρίδα στα φρούτα και τα λαχανικά αποτελείται σε μεγάλο βαθμό από τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas spp.*, *Erwinia herbicola*, *Flaveobacterium*, *Xanthomonas* και *Enterobacter agglomerans*. Γαλακτικά βακτήρια όπως *Leuconostoc. Mesenteroides* και *Lacobacillus spp.*,μπορεί να αναπτυχθούν στα φρούτα και λαχανικά. Σύμφωνα με τους Magnuson *et al.* (1990), η *Erwinia herbicola* είναι ένα από τα βακτήρια που συχνά προκαλεί μαλακή σήψη και έχει απομονωθεί από φρέσκο μαρούλι.

Τα μέρη από τα οποία αποτελείται ένα φρούτο και ένα λαχανικό, όπως η ρίζα, τα κοτσάνια, τα φύλλα, τα άνθη όπως και η ίδια η επιφάνεια του φρούτου και του λαχανικού, χαρακτηρίζονται από μοναδικό μικροπεριβάλλον. Στο έτοιμο προς κατανάλωση μαρούλι ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών εξαρτάται τόσο από το αρχικό μικροβιακό φορτίο όσο και από τη θερμοκρασία συντήρησής του (Beuchat, 2002) και από άλλους παράγοντες.

2.1.1. Βακτήρια

Τα ελαφρώς επεξεργασμένα φρεσκοκομμένα λαχανικά αποτελούν πηγή ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών αφού προσφέρουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά σε αυτούς (Akbaz & Olmez, 2007). Είναι γνωστό ότι τα ελαφρώς επεξεργασμένα λαχανικά αποτελούν πηγή τροφικών ασθενειών (Sivapalasingam *et al*. 2004). Σαλάτες που περιέχουν μαρούλι είναι πιθανό να έχουν μολυνθεί από παθογόνους μικροοργανισμούς που έχουν ανιχνευτεί στα μαρούλια όπως η *Escherichia coli* (Beuchat, 1999, Loncarevic *et al*. 2005), *Pseudomonas aeruginosa*, Serratia, Citrobacter, *L. monocytogenes* (Beuchat & Brackett, 1990, Carlin & Nguyen-the, 1994, Francis *et al*., 1999), και η *Yersinia enterocolitica* (Escudero *et al*., 1999). Η μικροβιακή μόλυνση των προϊόντων αυτών εμφανίζεται πριν την συγκομιδή και κατά την διάρκεια των μετασυλλεκτικών χειρισμών. Επιπλέον μικροβιακή ανάπτυξη είναι

πιθανό να εμφανιστεί και σε ορισμένες επεξεργασίες του προϊόντος, όπως είναι ο τεμαχισμός. Το νερό περιέχει χλώριο το οποίο είναι ανασταλτικός παράγοντας μικροβιακής ανάπτυξης. Το πρώτο είδος επεξεργασίας στα έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά με στόχο τη μείωση του μικροβιακού φορτίου ήταν το πλύσιμο με νερό. (Burnett & Beuchat, 2002). Ωστόσο η αποτελεσματικότητα του χλωρίου στην αναστολή του βακτηριακού πληθυσμού (Parish *et al*., 2003) και κάποιες αρνητικές επιπτώσεις που προσδίδει στο προϊόν έχει οδηγήσει τους καταναλωτές να αντιτίθενται στην χρησιμοποίηση του χλωρίου (Richardson et al., 1998). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων απολύμανσης των φρέσκων λαχανικών.

Στα εξωτερικά φύλλα του μαρουλιού παρουσιάζεται ο μεγαλύτερος μικροβιακός πληθυσμός σε σχέση με τα εσωτερικά φύλλα όπου ο πληθυσμός των μικροοργανισμών είναι συνήθως μικρότερος (King *et al*., 1991, Baur *et al*., 2005). Μικροοργανισμοί αλλοίωσης όπως οι *Pseudomonas spp*. προσκολλώνται και αναπτύσσονται στην επιφάνεια του ανέπαφου φύλλου του μαρουλιού, ενώ παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως είναι η *L. monocytogenes* και η *Escherichia coli* O157:H7 αναπτύσσονται επιλεκτικά στις κομμένες άκρες των φύλλων του μαρουλιού (Takeuchi *et al*., 2000).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως σύμφωνα με τους Magnuson *et al.* (1990), τα βακτήρια που απομονώθηκαν από φρέσκα μαρούλια διέφεραν από αυτά του επεξεργασμένου μαρουλιού. Συγκεκριμένα, σε επεξεργασμένο μαρούλι το οποίο είχε τεμαχιστεί δεν βρέθηκαν Gram θετικά βακτήρια και ο αριθμός των Gram αρνητικών βακτηρίων ήταν αρκετά μικρότερος συγκριτικά με τον αριθμό του φρέσκου μαρουλιού, πράγμα που σημαίνει ότι η διαδικασία της πλύσης κατά την επεξεργασία απομάκρυνε ένα μέρος των μικροοργανισμών οι οποίοι προέρχονται από το έδαφος.

2.1.2. Μύκητες

Τα γένη των μυκήτων που απομονώνονται πιο συχνά στα λαχανικά είναι η Candida, Cryptococcus, Pichia, Torulaspora και Trichosporon. Ο ρυθμός ανάπτυξης των μυκήτων στο μαρούλι είναι μικρότερος συγκριτικά με τα βακτήρια, επομένως οι μύκητες δε σχετίζονται με την αλλοίωση τους (Magnuson *et. al*., 1990).

Ο *Geotrichum candidum* είναι ένας από τους οργανισμούς που προκαλεί το σάπισμα και τη μαλακή αποσύνθεση στο μαρούλι (Jay *et al*., 2005).
Το μεγαλύτερο ποσοστό αλλοίωσης στα φρούτα και τα λαχανικά από μύκητες προκαλείται μετά την συγκομιδή, όπου ο μύκητας εισβάλει σε συγκεκριμένες περιοχές του τροφίμου και το αλλοιώνει (Jay *et al*., 2005).
Οι μύκητες μπορούν να αναπτυχθούν καλά σε μη επεξεργασμένα φυτά, αλλά δεν ανταγωνίζονται εύκολα με τα βακτήρια (Li *et al*., 2001). Τα 2/3 των αλλοιώσεων των φρούτων προέρχονται από μύκητες. Τα κυριότερα γένη μυκήτων που αλλοιώνουν τα φρούτα είναι ο Penicillium, ο Aspergillus,ο Botrytis, ο Eurotium spp., Alternaria spp., Cladosporium spp., Sclerotinia και ο Rhizopus (Corbo *et al*., 2010).

2.1.3. Ζύμες

Τόσο το μαρούλι όσο και το αγγούρι μπορούν να προσβληθούν από τον μύκητα *Botrytis cinerea,* ο οποίος παράγει ένα γκρίζο μυκήλιο όταν βρεθεί σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και υγρασίας. Ο μύκητας μπορεί να προσβάλει τα φρούτα και τα λαχανικά με την είσοδο του μέσο των τραυματισμένων φύλλων και των ρωγμών που είναι πιθανό να έχουν δημιουργηθεί (Jay *et al*., 2005).
Έχει αναφερθεί ότι η αλλοίωση φρούτων που έχουν υποστεί τεμαχισμό σχετίζεται με οσμόφιλες ζύμες οι οποίες αναπτύσσονται γρηγορότερα από την μούχλα. Ο Cryptococcus, η Rhodotorula και ο Saccharomyces spp. σχετίζονται άμεσα με τα φρέσκα φρούτα, ενώ οι Zygosaccharomyces rouxii, Hanseniaspora, Candida, Debaryomyces και ο Pichia spp. σχετίζονται άμεσα με τα αποξηραμένα φρούτα (Corbo *et al*., 2010).
Κάποιοι μικροοργανισμοί οι οποίοι αποτελούν φυσιολογική χλωρίδα προϊόντος, είναι πολύ πιθανό να έχουν ανταγωνιστική και θανατηφόρο επίδραση σε βακτήρια που είναι υπεύθυνα για ασθένειες που προκαλούνται στον άνθρωπο. Για παράδειγμα, τα στελέχη κάποιων μικροοργανισμών που παράγουν βακτηριοσίνες, έχει αποδειχτεί πως μπορούν να ελέγξουν την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε ορισμένα προϊόντα (Randazzo *et al.*, 2009) όπως τα τυριά (McAuliffe, Hill, & Ross, 1999), η σαλάτα ‘Caesar’ και τα πράσινα σπαράγγια (Molinos et al., 2005).

2.2. Παρουσία παθογόνων βακτηρίων σε έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά

Εκτός από αλλοιογόνα βακτήρια, τους μύκητες και τις ζύμες που υπάρχουν στην μικροχλωρίδα των φρούτων και λαχανικών και είναι υπεύθυνα για πολλές αλλοιώσεις, έχει αναφερθεί και ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών, παρασίτων και ιών που είναι ικανά να προκαλέσουν τροφολοιμώξεις (De Roever, 1998, Beuchat, 1996, Beuchat, 2002, Francis & O'Beirne, 2005). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που έχουν μεγάλη σημασία για την δημόσια υγεία περιλαμβάνουν, την *Escherichia coli*, Campylobacter spp., *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Shigella* spp., Salmonella, ιούς και παράσιτα (De Roever, 1998, Beuchat, 1996, Beuchat, 2002). Σε περιπτώσεις που τραυματιστεί κάποιο φρούτο μετά την συγκομιδή κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του, μπορούν να εισέλθουν οι παραπάνω μικροοργανισμοί στις τραυματισμένες επιφάνειες και να τις προσβάλλουν (Corbo *et al*., 2010).

Στον παρακάτω **Πίνακα 2.1** εμφανίζονται παραδείγματα φρέσκων λαχανικών από τα οποία απομονώθηκαν παθογόνοι μικροοργανισμοί.

Πίνακας 2.1. Παραδείγματα παθογόνων μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από φρέσκα λαχανικά.

Λαχανικό	**Χώρα**	**Παθογόνο**	**Διάδοση***	**Πηγή**
Αγγούρι	ΗΠΑ	*B.cereus*		Portnoy *et al*. (1976)
	Μαλαισία	*L.monocytogenes*	4/5 (80%)	Arumugaswamy *et al*. (1994)
	Πακιστάν	*L.monocytogenes*	1/5 (6,7%)	Vahidy (1992)
Μαρούλι	Μαλαισία	*L.monocytogenes*	5/22 (22,7%)	Arumugaswamy *et al*. (1994)
	Καναδάς	*Campylobacter*	2/67 (3,1%)	Park & Sanders (1991)
	Ιταλία	*Salmonella*	82/120 (68,3%)	Ercolani (1976)
	Λίβανος	*Staphylococcus*	(14,3%)	Abdelnoor *et al*. (1983)
	Μαλαισία	*L.monocytogenes*	1/28 (3,6%)	Tang *et al*. (1994)
	Ολλανδία	*Salmonella*	2/28 (7,1%)	Tamminga *et al*. (1978)
	Ισπανία	*Salmonella*	5/80 (6,3%)	Garcia-Villanova (1987)
	Σρι Λάνκα	*L.monocytogenes*	10/20 (50%)	Gunasena *et al*. (1995)
	ΗΠΑ	*Aeromonas*		Callister & Agger (1989)
Μαϊντανός	Καναδάς	*Campylobacter*	1/42 (2,4%)	Park & Sanders (1991)
	Αίγυπτος	*Shigella*	1/250 (0,4%)	Satchell *et al*. (1990)
	Λίβανος	*Staphylococcus*	(7,7%)	Abdelnoor *et al*. (1983)
	Ισπανία	*Salmonella*	1/23 (4,3%)	Garcia-Villanova (1987)

* Αριθμός θετικών δειγμάτων από τα δείγματα που αναλύθηκαν, ποσοστό επί τοις εκατό θετικών δειγμάτων στις παρενθέσεις.

Πηγή: Beuchat, 2002

Από τον πίνακα του Beuchat (2002) παρατηρούμε ότι υψηλό ποσοστό θετικών δειγμάτων σε *L. monocytogenes* σε αγγούρι, και μαρούλι παρατηρούνται στην Μαλαισία, το Πακιστάν και τη Σρι Λάνκα Στις χώρες αυτές επικρατούν παρόμοιες κλιματικές συνθήκες κατά τη διάρκεια του έτους με υψηλές θερμοκρασίες και μεγάλη σχετική υγρασία. Συγκεκριμένα ο μέσος όρος της θερμοκρασίας στην Μαλαισία κατά τη διάρκεια του έτους είναι 27,5^{o}C με μέγιστο μέσο όρο θερμοκρασιών τους 33°C κατά του μήνες Φεβρουάριο-Ιούνιο και ελάχιστο μέσο όρο θερμοκρασιών τους 22 ^{o}C του μήνες Ιανουάριο, Ιούλιο, Σεπτέμβριο και Δεκέμβριο. Όσον αφορά το μέσο ποσοστό σχετικής υγρασίας που καταγράφεται για την Μαλαισία κατά τη διάρκεια ενός έτους, είναι 62,6%.

Στην Σρι Λάνκα ο μέσος όρος της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια του έτους είναι 27°C με μέγιστο μέσο όρο θερμοκρασιών τους 31°C κατά του μήνες Φεβρουάριο-Μάϊο και ελάχιστο μέσο όρο θερμοκρασιών τους 22 ^{o}C του μήνες Ιανουάριο και Φεβρουάριο. Όσον αφορά το μέσο ποσοστό σχετικής υγρασίας που καταγράφεται για την Σρι Λάνκα κατά τη διάρκεια του έτους είναι 79,8% (climatetemp.info, 2011).

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization, FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά παρουσιάζουν τον υψηλότερο μικροβιολογικό κίνδυνο σε σχέση με άλλα φρέσκα προϊόντα (FAO/WHO, 2008).

Οι οργανισμοί αυτοί κατέληξαν σε αυτό το συμπέρασμα βάση του αριθμού των γαστρεντερικών ασθενειών που σχετίζονταν με αυτά τα προϊόντα.

Από το 1990 τα φρέσκα προϊόντα αποτελούν την τέταρτη κυριότερη αιτία τροφογενών ασθενειών στις ΗΠΑ με το μαρούλι να είναι υψηλά στη λίστα των τροφίμων αυτών (CFSAN, 2006).

2.2.1. *Listeria monocytogenes*

Η *L. monocytogenes* είναι ένα παθογόνο ψυχρότροφο βακτήριο στο έδαφος και από εκεί επιμολύνει και τα λαχανικά (Beuchat, 1996).

Η *L. monocytogenes* έχει αποδειχτεί πως επιβιώνει και αναπτύσσεται σε μία ποικιλία φρέσκων μη επεξεργασμένων και ελάχιστα επεξεργασμένων λαχανικών, όπως το τεμαχισμένο μαρούλι (Francis & O'Beirne, 2005), κατά τη διατήρηση σε θερμοκρασίες ψύξης.

Κατά τους Jay *et al*. (2005) έχει αποδειχθεί ότι σε κατεψυγμένα λαχανικά όπως είναι το μπρόκολο, το κουνουπίδι τα σπαράγγια και το μαρούλι είναι πιθανό να αναπτυχθεί η *L. monocytogenes*. Μπορεί επίσης να αναπτυχθεί σε μαρούλι το οποίο έχει υποστεί συνθήκες επεξεργασίας όπως είναι ο τεμαχισμός, η επίδραση χλωρίου, η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας και η επίδραση της θερμοκρασίας (Beuchat & Brackett, 1990).

Στον παρακάτω πίνακα εμφανίζονται παραδείγματα φρέσκων λαχανικών στα οποία ανιχνεύτηκε ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes*.

Πίνακας 2.2. Φρέσκα λαχανικά, στα οποία έχει βρεθεί *L. monocytogenes*.

Λαχανικό	**Χώρα προέλευσης**	**Αριθμός θετικών δειγμάτων***	**Πηγή**
Φρέσκα φασολάκια	Μαλαισία	6/7 (85,7%)	Arumugaswamy *et al*. (1994)
Λάχανο	Καναδάς	2/92 (2,2%)	Schlech *et al*. (1983)
	ΗΠΑ	1/92 (1,1%)	Heisick *et al*. (1989a)
Αγγούρι	Μαλαισία	4/5 (80%)	Vahidy (1992)
	Πακιστάν	1/15 (6,7%)	Heisick *et al*. (1989b)
	ΗΠΑ	2/92 (2,2%)	Arumugaswamy *et al*. (1994)
Φυλλώδη λαχανικά	Μαλαισία	5/22 (22,7%)	Arumugaswamy *et al*. (1994)
Πατάτες	ΗΠΑ	19/70 (27,1%)	Heisick *et al*. (1989a)
	ΗΠΑ	28/132 (21,2%)	Heisick *et al*. (1989b)
Συσκευασμένες σαλάτες	Βόρεια Ιρλανδία	3/21 (14,3%)	Harvey and Gilmour (1993)
	Μεγάλη Βρετανία	4/60 (13,3%)	Sizmur and Walker (1988)
Ραπανάκια	ΗΠΑ	25/68 (36,8%)	Heisick *et al*. (1989a)
	ΗΠΑ	19/132 (14,4%)	Heisick *et al*. (1989b)
Λαχανικά σαλάτας	Γερμανία	6/263 (2,3%)	Breer and Baumgartner (1992)
	Βόρεια Ιρλανδία	7/66 (10,6%)	Harvey and Gilmour (1993)
	Ολλανδία	11/25 (44%)	Beckers *et al*. (1989)
Τομάτες	Πακιστάν	2/15 (13,3%)	Vahidy (1992)
Λαχανικά	Ιταλία	7/102 (6,9%)	Gola *et al*. (1990)
	Ισπανία	8/103 (7,8%)	de Simon *et al*. (1992)
	Ταϊβάν	6/49 (12,2%)	Wong *et al*. (1990)
	Μεγάλη Βρετανία	4/64 (6,2%)	MacGowan *et al*. (1994)

** Συνολικός αριθμός θετικών δειγμάτων: 170/1.495 (11,4%)*

Πηγή: Beuchat (1996)

Οι Steinbruegge *et al*. (1988) μελέτησαν διάφορα χαρακτηριστικά της *L. monocytogenes* σε μαρούλι και χυμό μαρουλιού όσον αφορά την επιβίωσή της και την ανάπτυξη της σε αυτό το προϊόν. Παρατηρήθηκε ότι ο μικροοργανισμός δεν είχε σταθερή συμπεριφορά. Συγκεκριμένα ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* μετά από 14 μέρες αυξήθηκε κατά πολλούς λογάριθμους (10^8-10^9 cfu/g) σε μαρούλι το οποίο αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασίες 5^oC και 25^oC, ενώ έγιναν μελέτες στο τέλος της περιόδου αποθήκευσης στις οποίες δεν ανιχνεύτηκε καθόλου ο μικροοργανισμός. Ανάπτυξη του μικροοργανισμού παρατηρήθηκε και στους 5^oC στο χυμό μαρουλιού. Η *L. monocytogenes* είναι δυνατό να αναπτυχθεί στο μαρούλι σε διάφορες φάσεις της επεξεργασίας (Beuchat, 1996).

Σύμφωνα με ανάλυση 165 μελετών που έγινε από τους Crepet *et al*. (2007) η συχνότητα να εμφανιστούν παθογόνοι μικροοργανισμοί σε λαχανικά σαλάτας είναι συνήθως μικρότερη από 5% με χαμηλότερη συχνότητα στα φυλλώδη λαχανικά σαλάτας σε σχέση με άλλα λαχανικά.

2.2.2. Άλλα παθογόνα βακτήρια

Κατά τους Heaton & Jones (2008) τα φυλλώδη λαχανικά επιμολύνονται συχνότερα από τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli*.
Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε, η *E. coli* ανιχνεύθηκε πιο συχνά σε μαϊντανό (21/30, 70%) και άνηθο (12/30, 40%), ενώ αντιθέτως ο πληθυσμός της *E. coli* ήταν μικρότερος στο μαρούλι τύπου iceberg (3,3%) (Aycicek *et al*., 2006).
Κατά τους Heaton & Jones (2008) η *Salmonella* spp. αποτελεί τον σημαντικότερο αιτιολογικό παράγοντα που προκαλεί μολύνσεις σε φρέσκα προϊόντα. Συγκεκριμένα στην Μεγάλη Βρετανία την περίοδο 1992-2000 αποτέλεσε το 41% των περιστατικών που εμφανίστηκαν, ενώ κατά την περίοδο 1973-1997 στις Η.Π.Α αποτέλεσε το 48% των περιστατικών.
Η πιο συχνή αιτία γαστρεντερικών ασθενειών παγκοσμίως, οφείλεται στο *Campylobacter jejuni* το οποίο σύμφωνα με μελέτες προσβάλει ετησίως 50 χιλιάδες άτομα σε Αγγλία και Ουαλία και 2 εκατομμύρια άτομα στις Η.Π.Α (Evans *et al*., 2003).
Ένας άλλος παθογόνος μικροοργανισμός που έχει ανιχνευθεί σε πολλά φρέσκα προϊόντα είναι η *Aeromonas* spp.. Τέτοιου είδους προϊόντα είναι το μαρούλι, το αγγούρι, το μπρόκολο, το καρότο, το σέλινο, τα κολοκυθάκια, τα μανιτάρια και οι πιπεριές (Heaton & Jones, 2008).

2.3. Τρόποι επιμόλυνσης λαχανικών με παθογόνα

Μια δίαιτα πλούσια σε φρέσκα φρούτα και λαχανικά είναι σημαντική για τη διατήρηση καλής υγείας. Παρόλα αυτά, τα φρέσκα προϊόντα μπορεί κάποιες φορές να αποτελέσουν πηγή τροφογενών ασθενειών. Το βακτήριο *E. coli* O157:H7 έχει ανιχνευθεί σε μη παστεριωμένους χυμούς, και η *L. monocytogenes* έχει ανιχνευθεί σε λάχανο. Εάν όμως τηρηθούν κάποιοι βασικοί κανόνες υγιεινής οι περιπτώσεις

επιμόλυνσης των λαχανικών μπορούν να μειωθούν σημαντικά. Επιμολύνσεις των προϊόντων είναι δυνατό να συμβούν σε όλα τα στάδια παραγωγής και επεξεργασίας των προϊόντων (De Roever, 1998). Κατά τον Beuchat (2002) τα προϊόντα είναι πιθανό να επιμολυνθούν από το χώμα, τα περιττώματα, (είτε προέρχονται από τον άνθρωπο είτε από ζώα), το νερό, τον πάγο, τα ζώα και τον εξοπλισμό συγκομιδής, επεξεργασίας και μεταφοράς.

Το νερό αποτελεί πιθανή πηγή μόλυνσης αφού κατά την πλύση διάφορων λαχανικών σε δεξαμενές πλύσης, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στο νερό μπορούν να προσκολληθούν στους φυτικούς ιστούς. Επομένως κατά την πλύση απομακρύνονται έντομα, χώμα, υπολείμματα μικροβιοκτόνων και γενικότερα πιθανές πηγές επιμόλυνσης αλλά το νερό μπορεί και να επιμολύνει τα προϊόντα (Lapidot *et al.*, 2006).

Το στάδιο του τεμαχισμού και κοπής αποτελούν σημαντικές πηγές επιμόλυνσης των ελάχιστα επεξεργασμένων προϊόντων. Βρέθηκε πως ο πληθυσμός των μεσόφιλων βακτηρίων αυξάνεται κατά τον τεμαχισμό από 10^3-10^4 και κατά την κοπή από 10^5-10^6 cfu/g για μεγάλη ποικιλία λαχανικών (Garg *et al*., 1990). Λόγω της αυξημένης διάθεσης θρεπτικών συστατικών και των μεγαλύτερων επιφανειών, έχουμε αυξημένη βακτηριακή ανάπτυξη και αλλοίωση (Brackett, 1992). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα με τις επεξεργασίες αυτές να έρχονται σε επαφή οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στην επιφάνεια των λαχανικών με τους τραυματισμένους φυτικούς ιστούς (Garg *et al*., 1990, Nguyen-the & Carlin, 1994).

Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, ο μηχανικός τραυματισμός που προκαλείται στα κύτταρα περιορίζει τη διάρκεια ζωής των ελάχιστα επεξεργασμένων φρούτων και λαχανικών και παρέχει στα παθογόνα περισσότερα σημεία πιθανής διείσδυσης στο προϊόν (King & Bolin, 1989). Επιπλέον έχει προσδιοριστεί με μικροσκόπηση ότι σε άπλυτα φύλλα μαρουλιού ανιχνεύθηκε μεγάλο πλήθος βακτηρίων και στις δύο επιφάνειες του μαρουλιού (Adams *et al*., 1989).. Κατά την διεργασία του πλυσίματος με νερό μεγάλο πλήθος βακτηρίων απομακρύνεται από τις επιφάνειες του μαρουλιού, ωστόσο έχει μελετηθεί ότι ένας σημαντικός αριθμός βακτηρίων παραμένει και μετά το πλύσιμο στα κύτταρα της επιδερμίδας του μαρουλιού (Adams *et al*., 1989). Τα βακτήρια που βρίσκονται στην επιφάνεια των φύλλων συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένα τμήματα, πιο συχνά στα στομάτια, τις βάσεις των τριχιδίων (trichomes), στα σημεία ένωσης των επιδερμικών κυτταρικών τοιχωμάτων, και στις πτυχώσεις των αγγείων (Gleeson & O'Beirne, 2005). Από τη στιγμή που τα παθογόνα

βακτήρια διεισδύουν στον τραυματισμένο ιστό, εμποδίζεται η απομάκρυνσή ή η καταστροφή τους με συνήθη πλύσιμο (Takeuchi & Frank, 2001, Baur *et al*., 2005). Οι Gleeson & O'Beirne (2005) πραγματοποίησαν μια μελέτη με σκοπό να εκτιμηθούν οι επιδράσεις διαφορετικών μεθόδων τεμαχισμού στη ανάπτυξη και επιβίωση των *E.coli,* της *L.innocua*, και της φυσιολογικής μικροχλωρίδας, κατά την συντήρηση σε λαχανικά σε MAP (τεμαχισμένα καρότα, τεμαχισμένο μαρούλι τύπου iceberg και ημικεφαλωτού τύπου).

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η μέθοδος τεμαχισμού που χρησιμοποιήθηκε δεν είχε σημαντική επίδραση στο αρχικό επίπεδο εμβολιασμού. Συγκεκριμένα, η *L.innocua* αναπτύχθηκε καλύτερα και η *E. coli* επιβίωσε καλύτερα στα λαχανικά που τεμαχίστηκαν από λεπίδες που προκάλεσαν τη μεγαλύτερη φθορά στις επιφάνειες κοπής. Κατά το χειροκίνητο τεμαχισμό με μαχαίρι που δεν ήταν ιδιαίτερα κοφτερό ή με μηχάνημα με λεπίδες τα αποτελέσματα έδειξαν μεγαλύτερα επίπεδα *E. coli* και *L. innocua* κατά τη συντήρηση, σε σχέση με τον χειροκίνητο τεμαχισμό με κοφτερό μαχαίρι και τον τεμαχισμό των λαχανικών με το χέρι (Gleeson & O'Beirne, 2005).

2.4. Πιθανές αιτίες για τους αυξημένους αριθμούς τροφολοιμόξεων

Η ικανότητα που έχουν τα βακτήρια να επιζούν σε στρεσογόνες συνθήκες μπορεί να οδηγήσει στην προσαρμογή τους όσον αφορά στην ανάπτυξη και την επιβίωσή τους ή στο να γίνουν πιο τοξικά. Η αύξηση των εισαγωγών, όσον αφορά το παγκόσμιο εμπόριο, ώστε να ικανοποιούνται οι επιθυμίες των καταναλωτών για ευρεία ποικιλία εξωτικών φρούτων και λαχανικών καθόλη τη διάρκεια του έτους και τα διεθνή ταξίδια έχουν οδηγήσει σε αυξημένη επαφή των ανθρώπων με παθογόνα, στα οποία δεν είχαν εκτεθεί παλαιότερα (Beuchat, 2002, Heaton & Jones, 2008).

Η διανομή ελάχιστα επεξεργασμένων φρούτων και λαχανικών από κεντρικές μονάδες επεξεργασίας, καθώς και οι διάφορες πρακτικές συντήρησης και εμπορίας είναι δυνατό να οδηγήσουν σε αυξημένη συχνότητα τροφολοιμόξεων.

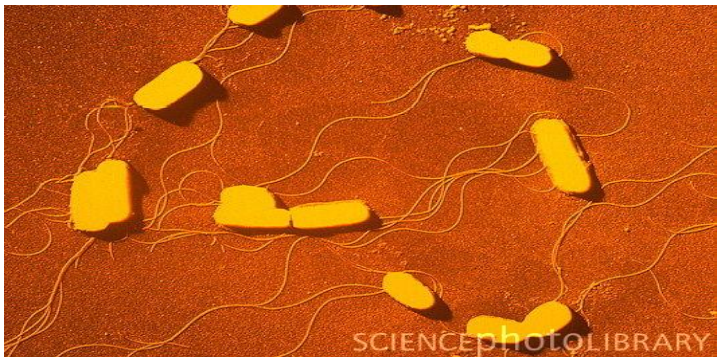
Έπειτα από μελέτες υπολογίστηκαν οι κίνδυνοι ασθενειών που μπορούν να προκύψουν από διάφορες ομάδες τροφίμων. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν μικρή αναλογία κινδύνου για τα λαχανικά σαλάτας (Adak *et al*., 2005). Ωστόσο δημιουργήθηκαν κάποια βελτιωμένα προγράμματα επίβλεψης για αναγνώριση τυχών επιμολύνσεων των προϊόντων από παθογόνους μικροοργανισμούς

με τα φρέσκα προϊόντα να θεωρούνται ολοένα και περισσότερο ως μέσα των επιμολύνσεων (Heaton & Jones, 2008).

3. *Listeria monocytogenes*

3.1 Εισαγωγή

Αναφορές έδειξαν ότι η *L. monocytogenes* απομονώθηκε από τμήματα ιστού ασθενών στην Γερμανία το 1891, από συκώτι κουνελιού στη Σουηδία το 1911 και από υγρό του νωτιαίου μυελού ασθενών που έπασχαν από μηνιγγίτιδα το 1917 και ξανά το 1920 (McCarthy, 1990). Ωστόσο οι Murray, Webb και Swann ήταν οι πρώτοι που το 1929 απομόνωσαν ένα μικρό θετικό κατά Gram ραβδόμορφο βακτήριο, το οποίο θεωρήθηκε υπεύθυνο για ξέσπασμα σε ζώα, μεταξύ αυτών κουνέλια και ινδικά χοιρίδια το 1924. Τον μικροοργανισμό αυτόν τον ονόμασαν *Bacterium monocytogenes.* Την ίδια περίπου περίοδο το 1927, ο Pirie απομόνωσε και περιέγραψε τον ίδιο μικροοργανισμό από τρωκτικά (gerbils) στη Νότια Αφρική. Ονόμασε το βακτήριο *Listerella hepatolytica*, ωστόσο κατά το 1940 προτάθηκε ο μικροοργανισμός να αλλάξει όνομα σε *L. monocytogenes* (McCarthy, 1990). Η πρώτη έκθεση για ανθρώπινη λιστερίωση ήταν το 1929, ενώ το πρώτο σύμπτωμα κατά την εγκυμοσύνη αναφέρθηκε κατά το 1936 (Gray and Killinger, 1966). Έχει αναφερθεί ότι ο μικροοργανισμός είναι παθογόνος σε ένα ευρύ φάσμα άγριων και κατοικίδιων ζώων, ενώ έχει απομονωθεί από 50 είδη θηλαστικών, πουλιά, αμφίβια, ψάρια, οστρακόδερμα, έντομα και ερπετά (Ryser and Marth, 1991).



Σχήμα 3.1. Απεικόνιση κυττάρων της *L. monocytogenes*.

3.2. Ταξινόμηση της *Listeria*

Η *Listeria* είναι ένα Gram θετικό, προαιρετικά αναερόβιο, μη σπορογόνο ραβδόμορφο βακτήριο, καταλάση θετικό και ζυμώνει τους υδατάνθρακες. Τα βακτήρια του γένους αυτού τα βρίσκουμε στα κόπρανα του ανθρώπου και των ζώων, στο έδαφος και στα χόρτα (Δεληγκάρης, 1980).

Έξι είδη *Listeria* έχουν αναγνωριστεί, και η ταξινόμησή τους, με κάποια χαρακτηριστικά διαφοροποίησης, φαίνεται στον **Πίνακα 3.1**.

Με τη χρήση τεχνικής PCR για την εξέταση γενετικής συσχέτισης μεταξύ των *L. innocua* και *L. welshimeri*, βρέθηκε πως τα δύο αυτά είδη μοιάζουν σε μεγάλο βαθμό, και πως το L. grayi είναι ομοιογενές και σχετίζεται ξεκάθαρα με τα άλλα πέντε είδη (Vaneechoutte *et al*., 1998).

Πίνακας 3.1. Ταξινόμηση των ειδών της Listeria και χαρακτηριστικά διαφοροποίησής τους

***In vitro* χαρακτηριστικό διαφοροποίησης**	**Είδη *Listeria***					
	monocytogenes	**ivanovii**	**innocua**	**welshimeri**	**seeligeri**	**grayi**
β-αιμόλυση σε άγαρ που περιέχει αίμα	+	++	-	-	±	-
Παραγωγή λιπάσης	+	+	-	-	+	-
Δραστηριότητα πεπτιδάσης αμινοξέων	-	+	+	+	+	+
Παραγωγή οξέος από:						
D-μαννιτόλη	-	-	-	-	-	+
L-ραμνόζη	+	-	+	±	-	±
D-ξυλόζη	-	+	-	+	+	-
α-μεθύλιο D-mannoside	+	-	+	+	±	±
CAMP test* με:						
Staphylococcus aureus	+	-	-	-	+	-
Rhodococcus equi	-	+	-	-	-	-

*ενίσχυση της αντίδρασης αιμόλυσης
+: θετική αντίδραση, -: αρνητική αντίδραση, ±: ποικίλη ή ασθενής αντίδραση
[Το **CAMP** (Christie-Atkins-Munch-Petersen) test θεωρείται από πολλούς ως ένα καθοριστικό τεστ για τη *L. monocytogenes* (Jay, Loessner & Golden, 2005]

Πηγή: Motarjemi & Adams (2006)

3.3. Ανάπτυξη

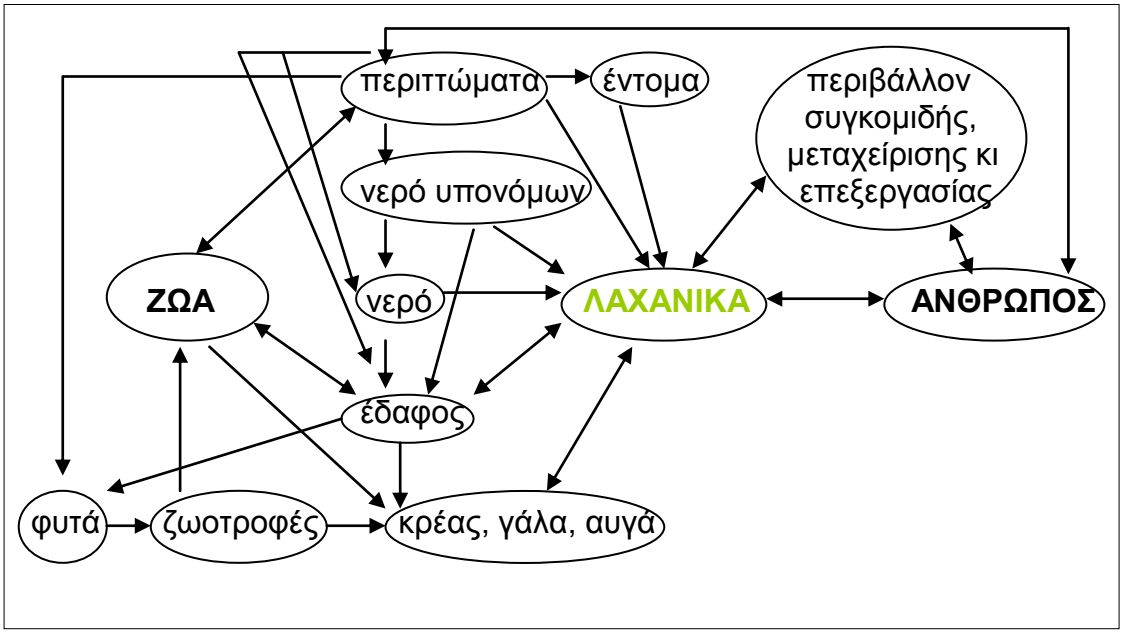
Οι θρεπτικές απαιτήσεις της *Listeria* είναι οι τυπικές των Gram θετικών βακτηρίων, και αναπτύσσεται καλά σε πολλά κοινά υποστρώματα, (brain heart infusion, trypticase soy, tryptose broths). Παρόλο που οι περισσότερες θρεπτικές απαιτήσεις έχουν περιγραφεί για τη *L. monocytogenes*, θεωρείται πως είναι παρόμοιες και για τα άλλα είδη.

Η *L. monocytogenes* εκφράζει μια τυπική κινητικότητα στους 20-25°C, αλλά όχι στους 35°C. Είναι ψυχρότροφος μικροοργανισμός και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 0°C έως 45°C με βέλτιστη θερμοκρασία γύρω στους 37 ^{o}C. Όσον αφορά την θερμοανθεκτικότητα της το θερμικό σημείο θανάτου είναι στους 58-59°C για 10min (Δεληγκάρης, 1980). Επιπλέον η *L. monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε εύρος pH από 4,4-9,4 (Miller, 1992).

Οι επιδράσεις της θερμοκρασίας, του pH, της ενεργότητας νερού και του διαθέσιμου οξυγόνου στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* έχουν μελετηθεί εκτενώς και υπάρχουν μαθηματικά μοντέλα που είναι διαθέσιμα για τον προσδιορισμό της αλληλεπίδρασης των παραγόντων αυτών σε σχέση με το ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Koutsoumanis *et al*., 2004).

3.4. Διάδοση της *L.monocytogenes* και μετάδοση στον άνθρωπο

Η *Listeria* βρίσκεται σε αφθονία στη φύση και είναι πιθανό να βρεθεί σε φυτά σε αποσύνθεση και στο έδαφος, σε περιττώματα ζώων, σε ακαθαρσίες σε υπονόμους, σε ζωοτροφές και στο νερό (Jay, Loessner & Golden, 2005). Κάποιοι από τους τρόπους με τους οποίους η *L. monocytogenes* διασπείρεται στο περιβάλλον, παράλληλα με τις διάφορες πηγές οργανισμών σε σχέση με τον άνθρωπο παρουσιάζεται στο **Σχήμα 3.2**.



πηγή: Νάστου (2011)

Σχήμα 3.2. Πιθανές οδοί μέσω των οποίων γίνεται η μετάδοση της *L. monocytogenes* στους ανθρώπους μέσω των λαχανικών

Ο μικροοργανισμός είναι ανθεκτικός σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η υψηλή αλατότητα και η οξύτητα, πράγμα που σημαίνει ότι του επιτρέπει να επιβιώσει κάτω από αντίξοες συνθήκες και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από τα υπόλοιπα μη σπορογόνα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για τροφογενείς ασθένειες (McCarthy, 1990; Ryser and Marth, 1991).

Η *L. monocytogenes* μπορεί να επιμολύνει τρόφιμα στο στάδιο της επεξεργασίας τους και να επιβιώσει για μεγάλες χρονικές περιόδους σε αυτά τα τρόφιμα. Έχει απομονωθεί από τρόφιμα, όπως ακατέργαστο και παστεριωμένο γάλα, τυριά (ιδιαίτερα σε ποικιλίες με μαλακή ωρίμανση), παγωτό, φρέσκα λαχανικά, ζυμούμενα κρεατοσκευάσματα και μαγειρεμένα λουκάνικα, νωπά και μαγειρεμένα πουλερικά, νωπό κρέας, και φρέσκα και καπνιστά θαλασσινά (Buchanan *et al*., 1989; Farber and Peterkin, 1991; FDA/FSIS, 2001; Ryser and Marth, 1991, 1999). Ακόμη κι όταν η *L. monocytogenes* είναι παρούσα σε χαμηλά επίπεδα σε ένα επιμολυσμένο τρόφιμο, η ικανότητά της να αναπτύσσεται κατά τη συντήρηση με ψύξη σημαίνει πως τα επίπεδά της μπορούν να αυξηθούν κατά τη διάρκεια της ψύξης των τροφίμων στα οποία μπορεί να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός.

Παρόλο που έχει δοθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην επικράτησή της στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, λόγω των πρώτων τροφολοιμόξεων που εκδηλώθηκαν, η *L. monocytogenes* φαίνεται να επιβιώνει και να αναπτύσσεται και σε μία ποικιλία φρέσκων λαχανικών (Berrang, Brackett & Beuchat, 1989) και σε ελάχιστα επεξεργασμένα λαχανικά (minimally processed vegetables, MPV), όπως τεμαχισμένο μαρούλι (Beuchat & Brackett, 1990, Farber, Wang, Cai & Zhang, 1998, Francis & O'Beirne, 1997, Jacxsens, Devlieghere, Falcato & Debevere, 1999, Francis & O'Beirne, 2005, Carrasco *et al*, 2008), κομμένο λάχανο (Beuchat, Brackett, Hao & Conner, 1986, Kallender *et al*., 1991) και φρέσκα φασολάκια κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε θερμοκρασίες ψυγείου.

3.5. Τοξικές ιδιότητες

Από τα είδη της *Listeria*, η *L. monocytogenes* είναι το παθογόνο στέλεχος για τον άνθρωπο. Παρόλο που η *L. ivanovii* μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε πειράματα σε ποντίκια, το κάνει σε πολύ μικρότερο βαθμό από τη *L. monocytogenes*. Οι *L. innocua*, *L. welshimeri* και *L. seeligeri* είναι μη παθογόνα, παρόλο που η τελευταία παράγει αιμολυσίνη (hemolysin). Ο πιο σημαντικός παράγοντας τοξικότητας που σχετίζεται με τη *L. monocytogenes* είναι η τοξίνη λιστεριολυσίνη Ο (listeriolysin O, LLO) (Jay, Loessner & Golden, 2005).

Γενικά, τα παθογόνα/τοξιγόνα στελέχη της *L. monocytogenes* προκαλούν β-αιμόλυση στο άγαρ αίματος και παράγουν οξύ από τη ραμνόζη αλλά όχι από την ξυλόζη. Τα στελέχη των οποίων η αιμόλυση μπορεί να ενισχυθεί είτε με προ-καθαρισμένη εξω-ουσία είτε με άμεση χρήση της καλλιέργειας είναι δυνητικά παθογόνα. Όσον αφορά στην αιμόλυση, υπάρχει πληθώρα στοιχείων που δείχνουν πως τα τοξικά στελέχη αυτού του είδους παράγουν μία συγκεκριμένη ουσία (LLO) που είναι υπεύθυνη για τη β-αιμόλυση στα ερυθροκύτταρα και την καταστροφή των φαγοκυττάρων που τα περιβάλλουν. Η λιστεριολυσίνη Ο ενεργεί συνεργατικά με την αιμολυσίνη που παράγεται από τον *S. aureus* για να προκαλέσει αυξημένη αιμόλυση στο blood agar. Αυτή η αντίδραση αποτελεί τη βάση μιας χρήσιμης διαγνωστικής δοκιμής των *L. monocytogenes* και *L. innocua*, και είναι γνωστό ως δοκιμή CAMP από τα αρχικά των Christie, Atkins και Munch-Peterson που περιέγραψαν αρχικά το φαινόμενο με τους στρεπτόκοκκους Β ομάδας (Adams & Moss, 2000).

Η LLO ανιχνεύτηκε σε όλα τα στελέχη της *L. monocytogenes*, συμπεριλαμβανομένων και κάποιων μη-αιμολυτικών, αλλά όχι στα *L. welshimeri* και *L. grayi*. Ακόμη, τα *L. ivanovii* και *L. seeligeri* παράγουν άλλες εξωτοξίνες που είναι παρόμοιες, αλλά όχι πανομοιότυπες με την LLO. Μεγάλες ποσότητες παράγονται από τη *L. ivanovii*, ενώ μικρές μόνο ποσότητες από τη *L. seeligeri*.

3.6. Λιστερίωση

Η ασθένεια που προκαλείται από την *L. monocytogenes* ονομάζεται λιστερίωση (listeriosis), και σήμερα γνωρίζουμε πως η λιστερίωση στον άνθρωπο οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη μετάδοση του μικροοργανισμού μέσω των τροφίμων. Η πρώτη περίπτωση τροφογενούς λιστερίωσης αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1953, όταν κατά την γέννηση δίδυμων νεκρών εμβρύων υπήρξε σύνδεση με την κατανάλωση ακατέργαστου γάλακτος από αγελάδα με μαστίτιδα που οφείλονταν σε λιστέρια, από την μητέρα των εμβρύων (Potel, 1953). Πολλά και μεγάλα ξεσπάσματα λιστερίωσης συνέβησαν στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη κατά το 1980, και οδήγησαν στην αναγνώριση της σημασίας των τροφίμων ως πρωταρχική πηγή μετάδοσης της *L. monocytogenes* στον άνθρωπο (Broome, Gellin and Schwartz, 1990; Bille, 1990).
Ενώ οι τρόποι μετάδοσης της *L. monocytogenes* μπορεί να περιλαμβάνουν μετάδοση από τη μητέρα στο παιδί, από ζώο σε άνθρωπο και ενδονοσοκομειακή μετάδοση, θεωρείται γενικά πως οι περισσότερες περιπτώσεις λιστερίωσης σε ανθρώπους ενέχουν τροφογενή μετάδοση. Η λιστερίωση είναι μια σχετικά σπάνια ασθένεια και η συχνότητα εμφάνισής της στον άνθρωπο ανά έτος είναι από 0,1 έως 11,3 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο κατοίκους, όπου για παράδειγμα 0,3 έως 7,5 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο ανθρώπων είναι στην Ευρώπη και 3 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο ανθρώπων είναι στην Αυστραλία (Notermans *et al*., 1998).
Η σοβαρότητα της ασθένειας (ρυθμός θνησιμότητας 20-30%) και ο πολύ συχνός συσχετισμός της με βιομηχανικά επεξεργασμένα τρόφιμα, ιδιαίτερα κατά την εκδήλωση της ασθένειας, οδηγούν στο συμπέρασμα πως το κοινωνικό και οικονομικό αντίκτυπο της λιστερίωσης είναι από τα σημαντικότερα σε σχέση με τις υπόλοιπες τροφογενείς ασθένειες (FAO, 2004).

Το 2000, ο CDC ανέφερε πως, από όλα τα τροφογενή παθογόνα που εξετάστηκαν, η *L. monocytogenes* παρουσίασε το δεύτερο υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας (21%) και το μεγαλύτερο ρυθμό εισαγωγών στο νοσοκομείο (90,5%) (CDC, 2000). Πρόσφατες εκτιμήσεις έχουν κατατάξει τη λιστερίωση ως τη δεύτερη και την τέταρτη πιο συχνή αιτία θανάτων από τροφογενείς μολύνσεις στις ΗΠΑ, και στην Αγγλία και Ουαλία, αντίστοιχα (**Πίνακας 3.2.**).

Πίνακας 3.2. Εκτίμηση των πέντε πιο κοινών αιτιών θανάτου από τροφογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς στις ΗΠΑ, και στην Αγγλία & Ουαλία.

	Σύνολο θανάτων από τροφολοιμώξεις ετησίως	
	Συνολικός αριθμός περιπτώσεων	Θάνατοι
ΗΠΑ (στοιχεία από Mead *et al*., 1999)		
Σύνολο περιπτώσεων	76.000.000	5.194
Salmonella	1.412.498	843
Listeria	2.518	761
Toxoplasma	225.000	571
Norovirus	23.000.000	190
Campylobacter	2.453.926	136
Αγγλία & Ουαλία* (από Adak *et al*., 2002)		
Σύνολο περιπτώσεων	1.338.772	480
Salmonella	41.616	119
Clostridium perfringens	84.081	89
Campylobacter	358.466	86
Listeria	194	68
VTEC O157	995	22

* *Ενδογενείς τροφογενείς ασθένειες*

Πηγή: Motarjemi & Adams (2006)

Παρά τις δυσκολίες στην έρευνα σχετικά με τη λιστερίωση, έχει σημειωθεί επιτυχία από τις αρχές του ’80 με τα συστήματα παρακολούθησης ασθενειών (disease surveillance systems), την ανάπτυξη και εφαρμογή τεχνικών απομόνωσης της *L. monocytogenes* και την ταυτοποίηση των συνήθων πηγών ξεσπασμάτων λιστερίωσης. Στην Αγγλία και Ουαλία παρατηρήθηκε μείωση των περιπτώσεων λιστερίωσης κατά το 2010 συγκριτικά με τα προηγούμενα έτη όπως ανακοίνωσε ο οργανισμός προστασίας της υγείας (Health Protection Agency, 2011).

Συγκεκριμένα το 2010 υπήρξε μια μείωση του αριθμού των υποθέσεων λιστερίωσης (156 περιπτώσεις) στις χώρες αυτές από το μέσο όρο των 199 περιπτώσεων ανά έτος μεταξύ του 2005-2009. Ωστόσο ο αριθμός των περιπτώσεων που αναφέρθηκαν κατά το 2011 (έως και την 12η εβδομάδα) είναι υψηλότερος σε σχέση με το 2010 για την ίδια περίοδο. Συγκεκριμένα στον πίνακα που ακολουθεί φαίνεται η διακύμανση των περιπτώσεων λιστερίωσης για συγκεκριμένο τύπο ασθενών.

Πίνακας 3.3. Περιπτώσεις λιστερίωσης για συγκεκριμένο τύπο ασθενών της εβδομάδες 1-12 από το 2005-2011 σε Αγγλία και Ουαλία.

ΤΥΠΟΣ ΑΣΘΕΝΗ	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΧΩΡΙΣ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ	26	16	37	34	35	19	28
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ	6	6	6	4	7	4	3
ΣΥΝΟΛΟ	32	22	43	38	42	23	31

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟ: HPA (2011)

Οι ερευνητές κατέληξαν πως η λιστερίωση είναι μία σπάνια ασθένεια στον άνθρωπο, παρόλη την συχνή έκθεση στους μικροοργανισμούς που την προκαλούν.

3.6.1. Συμπτώματα

Η λιστερίωση στον άνθρωπο δε χαρακτηρίζεται από μοναδικά συμπτώματα, αφού η πορεία της ασθένειας εξαρτάται από την κατάσταση του ατόμου-φορέα. Τα συμπτώματα στα υγιή άτομα, όταν εμφανιστούν, είναι αυτά της οξείας γαστρεντερίτιδας με πυρετό, και εκδηλώνονται για 1-2 ημέρες (Motarjemi & Adams, 2006). Σε έγκυες γυναίκες η λιστερίωση συχνά εμφανίζεται με γρίπη, η οποία οδηγεί σε μόλυνση του εμβρύου και τα αποτελέσματα συνήθως είναι αποβολή, θνησιγένεια ή πρόωρη γέννηση. Όταν μολύνεται ένα νεογέννητο κατά τον τοκετό, τα συμπτώματα της λιστερίωσης είναι αυτά της μηνιγγίτιδας, και συνήθως ξεκινούν 1-4 εβδομάδες μετά τη γέννηση, παρόλο που έχει αναφερθεί και επώαση 4 ημερών.
Η λιστερίωση εμφανίζεται πιο συχνά είτε πολύ νωρίς ηλικιακά είτε μετά την ηλικία των 60 ετών. Σύμφωνα με στοιχεία από τις ΗΠΑ, τα ηλικιωμένα άτομα (πάνω από 60 ετών) ήταν 2,6 φορές πιο ευπαθή σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, ενώ άτομα σε περιγεννητική κατάσταση (έγκυες, έμβρυα, βρέφη) ήταν 14 φορές πιο ευπαθή (FAO, 2004).

Καταστάσεις που καταστέλλουν το ανοσοποιητικό σύστημα επηρεάζουν επίσης την ευπάθεια σε διάφορους βαθμούς, γεγονός που επιβεβαιώνει τη φυσιολογική παρατήρηση πως όταν το ανοσοποιητικό σύστημα κάποιου είναι κατεσταλμένο, ο κίνδυνος λιστερίωσης σε οποιαδήποτε δόση αυξάνεται.
Συγκεκριμένα, έρευνα που πραγματοποίησε ο HPA (2010) έδειξε ότι ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο διατρέχουν πενταπλάσιο κίνδυνο να πάθουν λιστερίωση σε σχέση με ασθενείς που νοσούν από διαφορετικές ασθένειες, ενώ το υψηλότερο ποσοστό λιστερίωσης παρατηρήθηκε σε ανθρώπους που έπασχαν από καρκίνο του αίματος οι οποίοι εμφάνισαν 17,6 φορές υψηλότερη ευπάθεια σε σχέση με άλλους ασθενείς.
Όταν ευπαθείς ενήλικες φέρουν την ασθένεια, η μηνιγγίτιδα και η σήψη είναι τα πιο κοινά αναγνωρίσιμα συμπτώματα. Το αυχενικό, η αρθρίτιδα, η ηπατίτιδα, η ενδοφθαλμίτιδα, δερματικές αλλοιώσεις, η περιτονίτιδα, και η γενικευμένη λεμφαδενοπάθεια σχετίζονται με το σύνδρομο σε ενήλικες, κι έτσι η ασθένεια μπορεί να προσομοιάζει με την μολυσματική μονοπυρήνωση. Ακόμη, μπορεί να προκληθεί πνευμονία σε ασθενείς στους οποίους έχει γίνει μεταμόσχευση νεφρού (Motarjemi & Adams, 2006).

3.6.2. Παθογένεια

Όταν η *L. monocytogenes* εισέρχεται στον άνθρωπο από το στόμα, δημιουργεί αποικίες στο εντερικό σύστημα με μηχανισμούς που δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Από το εντερικό σύστημα, ο μικροοργανισμός εισβάλει στους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του πλακούντα στις εγκύους, και εισέρχεται στο αίμα, μέσω του οποίου φτάνει σε άλλα ευπαθή κύτταρα του σώματος. Ως ενδοκυτταρικό παθογόνο, πρέπει πρώτα να εισέλθει στα ευπαθή κύτταρα, και στη συνέχεια πρέπει να καταλάβει κάποιο μέσο για να πολλαπλασιαστεί μέσα στα κύτταρα αυτά. Στην περίπτωση των φαγοκυττάρων, η είσοδος πραγματοποιείται σε δύο στάδια: άμεσα μέσα στα φαγοσωμάτια και από τα φαγοσωμάτια μέσα στο κυτταρόπλασμα των φαγοκυττάρων (Jay, Loessner & Golden, 2005).
Αρκετές δεκαετίες παλαιότερα είχε δειχτεί πως τα εκχυλίσματα φαινολών-νερού από το κύτταρο της *L. monocytogenes* ευνοούν την παραγωγή μονοκυττάρων (monocytes), και εξαιτίας αυτού του παράγοντα που προκαλεί μονοκύττωση

(monocytosis-producing activity, MPA, factor), δόθηκε στο μικροοργανισμό αυτό το όνομα “monocytogenes” (Jay, Loessner & Golden, 2005).

4. Νομοθεσία σχετικά με την *L. monocytogenes* στα τρόφιμα

Κάποιες χώρες έχουν θεσπίσει νομικά όρια για τον αριθμό των μικροοργανισμών που επιτρέπεται στα τρόφιμα, ιδιαίτερα στα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα, ενώ άλλες προτείνουν οδηγίες ή κριτήρια που δεν έχουν νομική ισχύ (Jay, Loessner & Golden, 2005).

Οι οδηγίες της Μεγάλης Βρετανίας για κάποια έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα καθιερώνουν τέσσερις ομάδες ποιότητας, που βασίζονται σε αριθμούς της *L. monocytogenes*. Η μη ανίχνευση σε 25g είναι ικανοποιητική, $\leq 10^2$/25g είναι σχεδόν ικανοποιητική, 10^2-10^3 είναι μη ικανοποιητική, και αριθμοί $>10^3$ καθιστούν το προϊόν μη αποδεκτό (Gilbert, 1992).

Κάθε τρόφιμο έτοιμο για κατανάλωση πρέπει να μην περιέχει *L. monocytogenes*, και για το σκοπό αυτό πρέπει να λαμβάνονται όλα τα κατάλληλα μέτρα. Μέχρι τα τέλη του 2005, η εθνική νομοθεσία στην Ελλάδα και τις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες εφάρμοζε την αρχή της "μηδενικής ανοχής" (zero tolerance), δηλαδή όριζε την απουσία *L. monocytogenes*, συνήθως σε ποσότητα 25g τελικού προϊόντος. Όμως η νέα ισχύουσα νομοθεσία στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα που θεσπίστηκε με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής ορίζει τα 100 κύτταρα/g (cfu/g) ως ανώτατο επιτρεπτό όριο.

Όσον αφορά στην Ευρωπαϊκή Ένωση, την 1η Ιανουάριο του 2006, η Οδηγία (Commission Regulation, EC) 2073/2005 σχετικά με τα μικροβιολογικά κριτήρια των τροφίμων μπήκε σε ισχύ για όλα τα κράτη της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EC, 2005). Για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, στα οποία μπορεί να αναπτυχθεί η *L. monocytogenes*, ο νέος Κανονισμός απαιτεί την απουσία του παθογόνου (σε 25g) «προτού το τρόφιμο εγκαταλείψει τον άμεσο έλεγχο του χειριστή της επιχείρησης τροφίμων, που το παρήγαγε», αλλά επιτρέπεται μέχρι 100 cfu/g για «προϊόντα στην αγορά κατά τη διατήρησή τους στα ράφια των καταστημάτων». Η απαίτηση αυτή σε συνδυασμό με σχετικά μεγάλη παρουσία της *L. monocytogenes* στα φρέσκα λαχανικά, έχει αυξήσει τις προσπάθειες της Βιομηχανίας Τροφίμων για ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων για τον έλεγχο των παθογόνων στα προϊόντα αυτά.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως δεν είναι σωστό να συμπεράνουμε ότι όλα τα τρόφιμα που βρέθηκαν εκτός των ορίων που έχουν θεσπιστεί σε κάθε χώρα, και έχουν ανακληθεί, θα προκαλούσαν λιστερίωση εάν πωλούνταν. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, δεν προκαλούν ασθένεια όλα τα στελέχη αυτού του μικροοργανισμού, και όλοι οι

καταναλωτές δεν χειρίζονται με τον ίδιο τρόπο τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα κρέατος και πουλερικών πριν την κατανάλωση, ούτε είναι το ίδιο ευπαθείς ως προς το συγκεκριμένο βακτήριο.

Συμπερασματικά, πρέπει να αναφερθεί πως μεγάλη σημασία έχει η σωστή εφαρμογή του προγράμματος HACCP από τις Βιομηχανίες Τροφίμων και όλους τους χώρους μαζικής εστίασης, καθώς και προσπάθεια για αυξημένη απολύμανση ώστε να μειωθούν οι επιμολύνσεις στο ελάχιστο. Επιπλέον η διασφάλιση ορθών γεωργικών και κατασκευαστικών εφαρμογών αποτελεί μια από τις κύριες μεθόδους ελέγχου των φρέσκων προϊόντων για επιμόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς (Samara & Koutsoumanis, 2009).

5. Σχετική υγρασία

Στον ατμοσφαιρικό αέρα περιέχονται και υδρατμοί που προέρχονται από την εξάτμιση υγρών επιφανειών, κυρίως των θαλασσών. Η παρουσία αυτών των υδρατμών στον αέρα καλείται υγρασία. Υγρασία είναι η μάζα του ατμού που μεταφέρεται από μια μονάδα μάζας ενός αερίου χωρίς ατμούς. Επομένως η υγρασία σύμφωνα με τον ορισμό αυτό, εξαρτάται μόνο από τη μερική πίεση του ατμού στο μίγμα όταν η συνολική πίεση είναι καθορισμένη (McCabe *et al*., 2008). Η υγρασία της ατμόσφαιρας καλείται 'απόλυτη υγρασία' και 'σχετική υγρασία' (Wikipedia).
Με τον όρο σχετική υγρασία (RH) εννοούμε το ποσοστό της ποσότητας ή του βάρους των υδρατμών που περιέχονται στον αέρα, με το βάρος ή την ποσότητα των υδρατμών του αέρα που έχει κορεστεί κάτω από την επίδραση ίδιων θερμοκρασιών. Κορεσμένος είναι ο αέρας που περιλαμβάνει τη μέγιστη ποσότητα υδρατμών. Ο τρόπος έκφρασης της σχετικής υγρασίας είναι επί τοις %. Σε ξηρό αέρα το ποσοστό σχετικής υγρασίας είναι 0%, ενώ για κορεσμένο αέρα η σχετική υγρασία είναι 100% (McCabe *et al*, 2008). Όταν μειώνεται η θερμοκρασία αέρος η σχετική υγρασία αυξάνεται και αντιστρόφως (Weatheronline).
Η σχετική υγρασία αποτελεί βασικό κλιματολογικό παράγοντα και χαρακτηρίζει τον βαθμό ξηρότητας μιας περιοχής. Αποτελεί στοιχείο ευμετάβλητο ακόμα και μεταξύ τόπων που απέχουν λίγο μεταξύ τους. Η μέγιστη τιμή της παρατηρείται κατά την ψυχρή περίοδο του έτους, ενώ η ελάχιστη κατά την θερινή περίοδο. Η Αττική θεωρείται από τις ξηρότερες περιοχές της Ευρώπης. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζεται η μέση σχετική υγρασία σε δύο μεγάλες πόλεις της Ελλάδος, Αθήνα και Θεσσαλονίκη, κατά την περίοδο 2008-2011.

Πίνακας 5.1. Κλιματικά δεδομένα κατά τη διάρκεια του έτους στην Αθήνα.

ΑΘΗΝΑ	ΙΑΝ	ΦΕΒ	ΜΑΡ	ΑΠΡ	ΜΑΙ	ΙΟΥΝ	ΙΟΥΛ	ΑΥΓ	ΣΕΠ	ΟΚΤ	ΝΟΕ	ΔΕΚ
Μέση θερμοκρασία (^oC)	9,5	10,5	12	16	21	25	28	28	24	20	16	11,5
Μέση μέγιστη θερμοκρασια (^oC)	13	14	15	20	25	30	33	33	29	24	19	15
Μέση ελάχιστη θερμοκρασία (^oC)	6	7	8	11	16	20	23	23	19	15	12	8
Μέση σχετική υγρασία (%)	74	70	67	63	59	53	47	47	56	67	73	75

Πηγή: climatetemp.info (2011)

Όπως παρατηρείται η σχετική υγρασία στην Αθήνα κυμαίνεται από 47% έως 75%. Το υψηλότερο ποσοστό υγρασίας παρατηρείται κατά τους χειμερινούς μήνες από τα τέλη του φθινοπώρου μέχρι την άνοιξη ενώ το χαμηλότερο ποσοστό υγρασίας κατά τους θερινούς μήνες του έτους.

Πίνακας 5.2. Κλιματικά δεδομένα κατά τη διάρκεια του έτους στην Θεσσαλονίκη.

ΘΕΣ/ΝΙΚΗ	ΙΑΝ	ΦΕΒ	ΜΑΡ	ΑΠΡ	ΜΑΙ	ΙΟΥΝ	ΙΟΥΛ	ΑΥΓ	ΣΕΠ	ΟΚΤ	ΝΟΕ	ΔΕΚ
Μέση θερμοκρασία (^oC)	5,5	7,5	10	15	20	24	27	26,5	23	18	13	7,5
Μέση μέγιστη θερμοκρασια (^oC)	9	12	14	20	25	29	32	32	28	22	16	11
Μέση ελάχιστη θερμοκρασία (^oC)	2	3	5	10	14	18	21	21	17	13	9	4
Μέση σχετική υγρασία (%)	76	71	68	67	65	56	51	52	61	68	76	77

Πηγή: climatetemp.info (2011)

Στη Θεσσαλονίκη η σχετική υγρασία κυμαίνεται από 51% έως 77%. Όπως και για την πόλη της Αθήνας και στη Θεσσαλονίκη το υψηλότερο ποσοστό υγρασίας παρατηρείται από τον μήνα Οκτώβριο έως το μήνα Μάρτιο, ενώ το χαμηλότερο ποσοστό παρατηρείται τους μήνες του καλοκαιριού. Η διαφορετικότητα των τιμών

σχετικής υγρασίας ανάμεσα στις δυο πόλεις όπως φαίνεται από τους μέσους όρους, αποδεικνύει ότι η σχετική υγρασία είναι στοιχείο ευμετάβλητο.

Όσον αφορά τα τρόφιμα ο έλεγχος της σχετικής υγρασίας στους χώρους αποθήκευσης υπό ψύξη είναι απαραίτητος για την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής. Σε τιμές σχετικής υγρασίας μεγαλύτερες από την βέλτιστη τιμή προκαλείται ανάπτυξη ευρωτομυκήτων και άλλων μικροοργανισμών αλλοίωσης σε όλα τα τρόφιμα, ενώ είναι υπαίτια και για το σχίσιμο της σάρκας ορισμένων φρούτων. Αντίθετα σχετική υγρασία που έχει τιμές χαμηλότερες από τη βέλτιστη τιμή προκαλεί αφυδάτωση και συρρίκνωση των φρούτων, άσχημη εμφάνιση των ζωικών ιστών, ορισμένες μεταβολές στην υφή των φρούτων και γενικά απώλεια βάρους λόγω αφυδάτωσης σε όλα τα προϊόντα (Μαρκάκης, 1996). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται η συνιστώμενη θερμοκρασία, σχετική υγρασία και διάρκεια αποθήκευσης τροφίμων σε ψύξη.

Πίνακας 5.3. Συνιστώμενη θερμοκρασία, σχετική υγρασία και διάρκεια αποθήκευσης τροφίμων σε ψύξη.

ΤΡΟΦΙΜΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (^oC)	ΣΧΕΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ (%)	ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ
Αγγούρι	7-9	90-95	10-14 ημέρες
Αχλάδια	-1-0	90-95	2-7 μήνες
Βερίκοκα	0	85-90	1-2 βδομάδες
Ελιές φρέσκες	7-10	85-90	4-6 βδομάδες
Καρότα	0	90-95	4-5 μήνες
Καρπούζια	2-4	85-90	2-3 βδομάδες
Κεράσια	-1-0	90-95	2-3 βδομάδες
Κουνουπίδι	0	85-90	2-3 βδομάδες
Λάχανο	0	90-95	3-4 βδομάδες
Λεμόνια κίτρινα	0-4	85-90	3-6 βδομάδες
Μαρούλι	0	90-95	2-3 βδομάδες
Μήλα	-1-0	88-90	3-8 μήνες
Μπανάνες κίτρινες	14-16	85-95	7-11 ημέρες
Πεπόνια	7-9	85-90	1-2 βδομάδες
Πορτοκάλια	0-9	85-90	6-12 βδομάδες
Ροδάκινα	-1-0	85-90	2-4 βδομάδες
Φασολάκια	6-8	85-90	8-10 ημέρες
Φράουλες	0	85-90	7-9 ημέρες
Φρούτα ξερά	0	50-60	9-12 μήνες

Τροποποίηση από: Μαρκάκης (1996)

Για τα φρούτα και λαχανικά οι συνιστώμενες τιμές σχετικής υγρασίας ποικίλουν ανάλογα με το είδος του τροφίμου, ωστόσο είναι ανώτερες από 85%.

Η σχετική υγρασία καθορίζεται κυρίως από τη διαφορά θερμοκρασίας του αέρα και της επιφάνειας των ψυκτικών στοιχείων. Μια μικρή διαφορά θερμοκρασίας της τάξεως 0-1°C είναι απαραίτητη για τη διατήρηση ικανοποιητικά υψηλής σχετικής υγρασίας (Μαρκάκης, 1996).

Όλα τα προϊόντα χάνουν νερό εξαιτίας της εξάτμισης και ο ρυθμός απώλειας υγρασίας εξαρτάται από την φύση της επιδερμίδας, την παρουσία ρωγμών στην επιδερμίδα, το σχήμα και το μέγεθος του προϊόντος καθώς και τη σχετική υγρασία του αέρα (Γεωργιάδης, 2001).

Τα φυλλώδη λαχανικά εξαιτίας της μεγάλης τους επιφάνειας έχουν πολύ υψηλό ρυθμό εξάτμισης που έχει ως αποτέλεσμα να χάνουν τα λαχανικά την φρεσκάδα τους. Έτσι γίνεται προσπάθεια διατήρησης του ρυθμού εξάτμισης σε χαμηλά επίπεδα και αυτό επιτυγχάνεται με το να συντηρούμε τα προϊόντα σε υψηλή σχετική υγρασία. Ωστόσο η σχετική υψηλή υγρασία μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μυκήτων και βακτηρίων στα τρόφιμα. Έτσι χρησιμοποιούνται ατμόσφαιρες με ποσοστό υγρασίας που να παρεμποδίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών και να διατηρεί το τρόφιμο φρέσκο.

Για τα φυλλώδη λαχανικά χρησιμοποιείται ποσοστό σχετικής υγρασίας 90-95% και για τα φρούτα και τα υπόλοιπα λαχανικά ποσοστό σχετικής υγρασίας 85-90% που θεωρούνται ιδανικές τιμές (Γεωργιάδης, 2001).

Η ανάπτυξη των βακτηρίων μεταβάλλεται εξαιτίας των αλλαγών της σχετικής υγρασίας και της διαθεσιμότητας του νερού στην επιφάνεια των φυτών. Για παράδειγμα, μεταβολή της σχετικής υγρασίας από 100% σε 60% προκάλεσε μείωση του πληθυσμού της *Salmonella enterica* σε φύλλα μαϊντανού (Brandl and Mandrell, 2002).

Τροφικές δηλητηριάσεις και ανακλήσεις βιομηχανικών προϊόντων, έχουν προκαλέσει μια ευρύτερη ανησυχία για την διαχείριση της σχετικής υγρασίας και της θερμοκρασίας που χρησιμοποιούνται κατά την μεταφορά και αποθήκευση των προϊόντων. Η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία αποτελούν σημαντικά κριτήρια για τον καθορισμό των κρίσιμων ορίων σε προγράμματα παρακολούθησης που σχετίζονται με το HACCP στην βιομηχανία τροφίμων (Paull, 1999).

Οι Dreux *et al.* (2007) μελέτησαν την επίδραση της σχετικής υγρασίας στην επιβίωση της *L. monocytogenes* σε φύλλα μαϊντανού. Παρατηρήθηκε ότι σε χαμηλές τιμές σχετικής υγρασίας (32-64%) η αρχική συγκέντρωση ενοφθαλμίσματος *L. monocytogenes* μειώθηκε στα φύλλα μαϊντανού σε 4 μέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

Στην συνέχεια και για υψηλότερες τιμές σχετικής υγρασίας (έως 100%) παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* από 10^2 σε 10^5 (*L. monocytogenes*/ φύλλο μαϊντανού) μεταξύ της τέταρτης έως και την έβδομη μέρα μετά τον ενοφθαλμισμό.

Σε χαμηλές τιμές σχετικής υγρασίας ο πληθυσμός *L. monocytogenes* μειώθηκε σε φύλλα μαϊντανού, ενώ για τιμές σχετικής υγρασίας κοντά στο 100% παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* αυξανόταν. Η μείωση που παρατηρήθηκε για χαμηλές τιμές σχετικής υγρασίας πιθανόν οφειλόταν στο στρες που προκλήθηκε εξαιτίας της χαμηλής διαθεσιμότητας νερού (Dreux *et al.*, 2007).

Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε και η *Salmonella*, η οποία σε χαμηλές τιμές σχετικής υγρασίας δεν αυξήθηκε σε φύλλα κόλιανδρου, φασόλια και στο καλαμπόκι (Brandl and Mandrell, 2002). Τα βακτήρια των φυτών μειώνονται σε περίοδο ξηρασίας, ενώ αυξάνονται σε περιόδους βροχοπτώσεων (Hirano and Upper, 2000).

6. Υλικά και μέθοδοι

6.1.Αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής ήταν η μελέτη της επίδρασης διαφορετικών τιμών σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας σε φρέσκα έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά, ως προς την επιβίωση/ανάπτυξη του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes.*
Οι θερμοκρασίες που μελετήθηκαν ήταν 10, 20, 30 ^{o}C σε σχέση με τιμές σχετικής υγρασίας 53 και 90% και διαφορετικούς χρόνους επώασης.

6.2. Προετοιμασία πριν τον ενοφθαλμισμό

6.2.1. Προετοιμασία δειγμάτων λαχανικών

Μαρούλι τύπου Ρωμάνα αγοράστηκε από τοπικό κατάστημα την ημέρα του πειράματος. Πριν τον τεμαχισμό, αφαιρέθηκε η περιττή υγρασία που μπορεί να είχε το μαρούλι, ανακινώντας το με απότομη κίνηση. Αφαιρέθηκαν τα εξωτερικά φύλλα και η κεφαλή, και κατόπιν κόπηκε με αποστειρωμένο μαχαίρι και υπό ασηπτικές συνθήκες κυκλικό τεμάχιο του φύλλου, ίσο με το μέγεθος ενός τρυβλίου (ακτίνα: 4,5 cm), προσέχοντας να μην συμπεριληφθεί στο δείγμα το κεντρικό νεύρο του φύλλου. Το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο τρυβλίο, με την επάνω επιφάνεια του φύλλου να βρίσκεται στην ανοιχτή πλευρά του τρυβλίου, ώστε να είναι δυνατός ο εμβολιασμός του με το παθογόνο βακτήριο.
Αγγούρι ευρωπαϊκού τύπου αγοράστηκε από τοπικό κατάστημα την ημέρα του πειράματος. Πριν τον τεμαχισμό, αφαιρέθηκε η περιττή υγρασία/σκόνη που μπορεί να είχε το αγγούρι, καθαρίζοντας την εξωτερική επιφάνεια ασηπτικά. Με αποστειρωμένο μαχαίρι και υπό ασηπτικές συνθήκες, αφαιρέθηκε η φλούδα του, η οποία κόπηκε σε διαστάσεις ίσες με το μέγεθος ενός τρυβλίου (ακτίνα: 4,5 cm). Τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο τρυβλίο με το εξωτερικό τμήμα της φλούδας να βρίσκεται στην επάνω πλευρά, ώστε να είναι δυνατός ο εμβολιασμός της με το παθογόνο.
Μαϊντανός με επίπεδα φύλλα αγοράστηκε από τοπικό κατάστημα την ημέρα του πειράματος. Πριν τον τεμαχισμό, αφαιρέθηκε η περιττή υγρασία που μπορεί να είχε ο μαϊντανός ανακινώντας με απότομη κίνηση. Με αποστειρωμένο ψαλίδι και υπό ασηπτικές συνθήκες, κόπηκαν φύλλα βάρους 2 g και συγκεντρώθηκαν σε

αποστειρωμένο τρυβλίο. Η ποσότητα αυτή ήταν ικανή να καλύψει πλήρως την επιφάνεια του τρυβλίου.
Τέλος, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή σε όλα τα δείγματα των λαχανικών ώστε να μην περιέχουν τραυματισμένους ιστούς, αφού είναι γνωστό πως σε τραυματισμένα τμήματα ιστών των λαχανικών μπορεί να εγκλωβιστεί μεγάλος αριθμός βακτηρίων (Akbas & Ölmez, 2007). Αυτό συμβαίνει επειδή η κομμένη (τραυματισμένη) επιφάνεια αυξάνει σημαντικά την επιφάνεια που είναι διαθέσιμη για βακτηριακή ανάπτυξη.

6.2.2. Προετοιμασία ενοφθαλμίσματος

Χρησιμοποιήθηκαν 3 στελέχη *L. monocytogenes*: Scott A, NCTC 10527 και NCTC 11994. Μία ημέρα πριν την έναρξη του πειράματος, απομονώθηκε κάθε στέλεχος ξεχωριστά από Palcam (Merck, Germany), και καθένα τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 10 ml TSB (tryptic soy broth) (Merck, Germany). Η διαδικασία αυτή έγινε για να ανακτήσουν οι μικροοργανισμοί τη ζωτικότητά τους, και να καταστούν άμεσα έτοιμοι για ανάπτυξη. Οι τρεις δοκιμαστικοί σωλήνες με τα ενοφθαλμίσματα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο επώασης στους 37°C για 24 h.
Μετά από 24 h, οι δοκιμαστικοί σωλήνες βγήκαν από τον κλίβανο και ανακινήθηκαν σε Vortex. Από κάθε ενοφθάλμισμα λήφθηκε ποσότητα 1 ml και τοποθετήθηκε ασηπτικά σε γυάλινο αποστειρωμένο φιαλίδιο (cocktail 3 στελεχών). Αφού ανακινήθηκε σε Vortex, 1 ml από το μίγμα των στελεχών μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα φυγοκέντρου (eppendorf tube) και τοποθετήθηκε σε μικροφυγόκεντρο eppendorf (eppendorf Centrifuge 5418). Αφού φυγοκεντρήθηκε για 15 min σε 3.000 rcf, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό και απορρίφθηκε. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε 1 ml Ringers solution (Oxoid, UK) στο σωλήνα φυγοκέντρου, όπου είχε παραμείνει το ίζημα (βακτηριακά κύτταρα), και επανατοποθετήθηκε στο eppendorf (3.000 rcf για 15 min). Μετά το πέρας των 15 min, αφαιρέθηκε και πάλι το υπερκείμενο υγρό και τοποθετήθηκε στο σωλήνα φυγοκέντρου που είχε παραμείνει το ίζημα, 1 ml Ringers solution. Ο σωλήνας φυγοκέντρου ανακινήθηκε σε Vortex και μεταφέρθηκαν 100 μl του υγρού σε δοκιμαστικό σωλήνα με 9 ml Ringers solution. Τέλος, αφού ομογενοποιήθηκε σε Vortex, έγιναν 4 διαδοχικές αραιώσεις, ώστε η τελική συγκέντρωση των μικροβιακών κυττάρων της καλλιέργειας να είναι της τάξης του 10^5 – 10^6 cfu/ml.

Από την τελευταία αραίωση, τοποθετήθηκαν 100 μl σε κάθε δείγμα. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε κλιβάνους στην κατάλληλη θερμοκρασία και σχετική υγρασία. Μετρήσεις του πληθυσμού της *L. monocytogenes* στο εμβολίασμα σε κάθε πειραματική διαδικασία έδειξαν πως η συγκέντρωση των μικροβιακών κυττάρων ήταν της τάξης του 10^3 cfu/cm^2.

6.3. Πειραματική Διαδικασία

6.3.1.Πειραματική διαδικασία της επιβίωσης της *L.monocytogenes* σε λαχανικά διατηρημένα σε διαφορετικές θερμοκρασίες με επίδραση διαφορετικής σχετικής υγρασίας.

Μετά τον ενοφθαλμισμό τους, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο, στον οποίο είχαν ρυθμιστεί η σχετική υγρασία (53 και 90%) και η θερμοκρασία (10, 20 και 30°C). Η δειγματοληψία έγινε σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα ανάλογα με τις συνθήκες. Την ημέρα του πειράματος, τα δείγματα αφαιρέθηκαν ασηπτικά από τα τρυβλία και τοποθετήθηκαν σε σακούλες stomacher. Προστέθηκαν στη σακούλα 50 ml Ringers και τοποθετήθηκε στο Stomacher 400 (Seward) σε Normal speed για 30 sec.

6.4. Καταμέτρηση αποικιών *L. monocytogenes*

Μετά την ομογενοποίηση σε stomacher, ποσότητα 1 ml από το ομογενοποιημένο δείγμα, αραιώθηκε δεκαδικά και 0,1 ml τοποθετήθηκε στην επιφάνεια τρυβλίων σε εκλεκτικό υπόστρωμα με αντιβιοτικά Palcam Listeria Selective Agar (Merck, Germany). Αφού διατηρήθηκαν τα τρυβλία σε επωαστικό κλίβανο 37°C για 48 h, έγινε καταμέτρηση των αποικιών της *L. monocytogenes*.
Για κάθε πειραματική διαδικασία, έγιναν δύο πειράματα με δύο επαναλήψεις. Για τον υπολογισμό των βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των δύο επαναλήψεων από κάθε αραίωση. Η επιλογή του κατάλληλου τρυβλίου που χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση, έγινε με βάση τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο. Ο αριθμός των αποικιών στα τρυβλία που επιλέχθηκαν ήταν μεταξύ 30 και 300.

6.5. Στατιστική ανάλυση

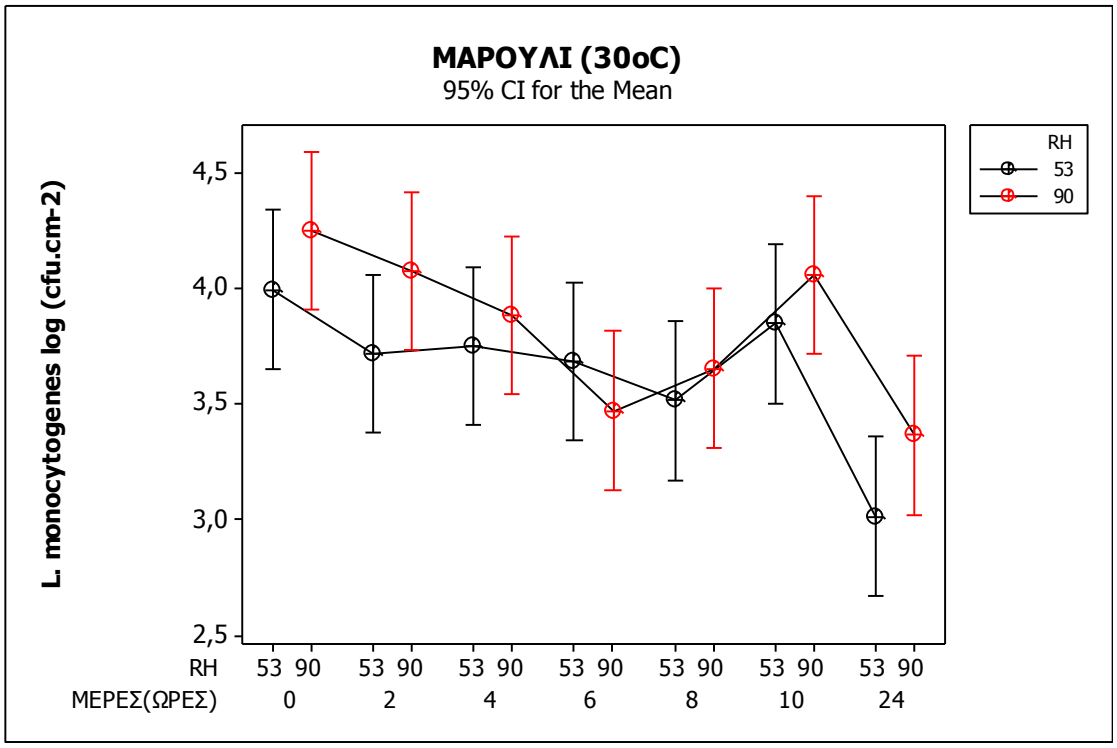
Για τη στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το Minitab Statistical Software, Release 16. Η διαδικασία του γενικού γραμμικού μοντέλου (general linear model, GLM) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA). Το Tukey test χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση πολλαπλών συγκρίσεων μεταξύ των μέσων όρων και τον προσδιορισμό στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.

7. Αποτελέσματα

Τα λαχανικά εμβολιάστηκαν με το βακτήριο *L. monocytogenes* και μελετήθηκε η επιβίωση της σε 53 και 90% τιμές σχετικής υγρασίας και σε θερμοκρασία επώασης 10, 20 και 30°C σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε δεκαδικούς λογαρίθμους (log_{10}cfu/cm^2, για το μαρούλι και το αγγούρι και log_{10}cfu/g για το μαϊντανό).

7.1. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε μαρούλι διατηρημένο στους 30°C για 24h σε 53 και 90%ποσοστά σχετικής υγρασίας

Στο παρακάτω σχήμα εμφανίζεται η μείωση του πλυθησμού της *L. monocytogenes* σε μαρούλι που διατηρήθηκε στους 30 °C για 24 h σε ποσοστά υγρασίας 53 και 90% αντίστοιχα.



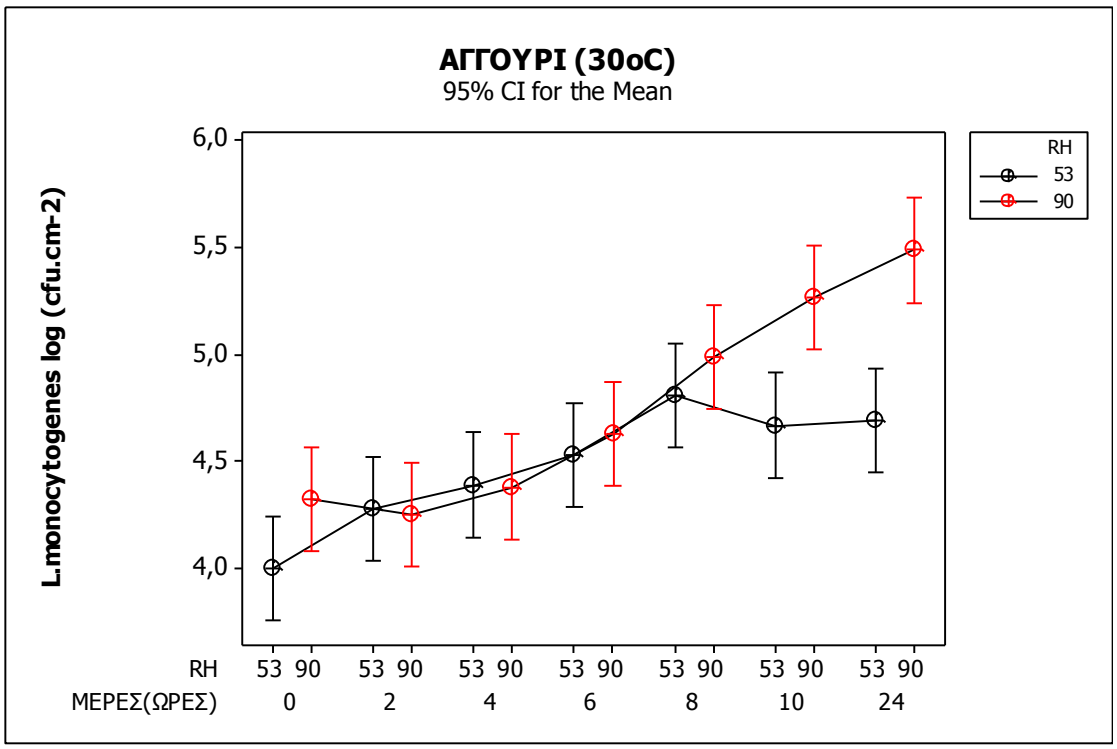
Σχήμα 7.1. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαρούλι διατηρημένο στους 30 ^{o}C για 24 h σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας

Στο μαρούλι διατηρημένο στους 30 °C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μετά από 24 h πειράματος σε ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό που

ενοφθαλμίστηκε (πτώση κατά 1 log) και μετά από 2 h πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 53% παρουσίασε σημαντική μείωση σε σχέση με όλα τα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 0,2,4,6,8 και 10 h ενώ σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 90% παρουσίασε σημαντική μείωση σε σχέση με τα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 0, 2, 4 και 10 h.

7.2. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε αγγούρι διατηρημένο στους 30 ^{o}C για 24h σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας.

Στο παρακάτω σχήμα εμφανίζεται η αύξηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε αγγούρι που διατηρήθηκε στους 30 ^{o}C για 24h σε ποσοστά υγρασίας 53 και 90% αντίστοιχα.



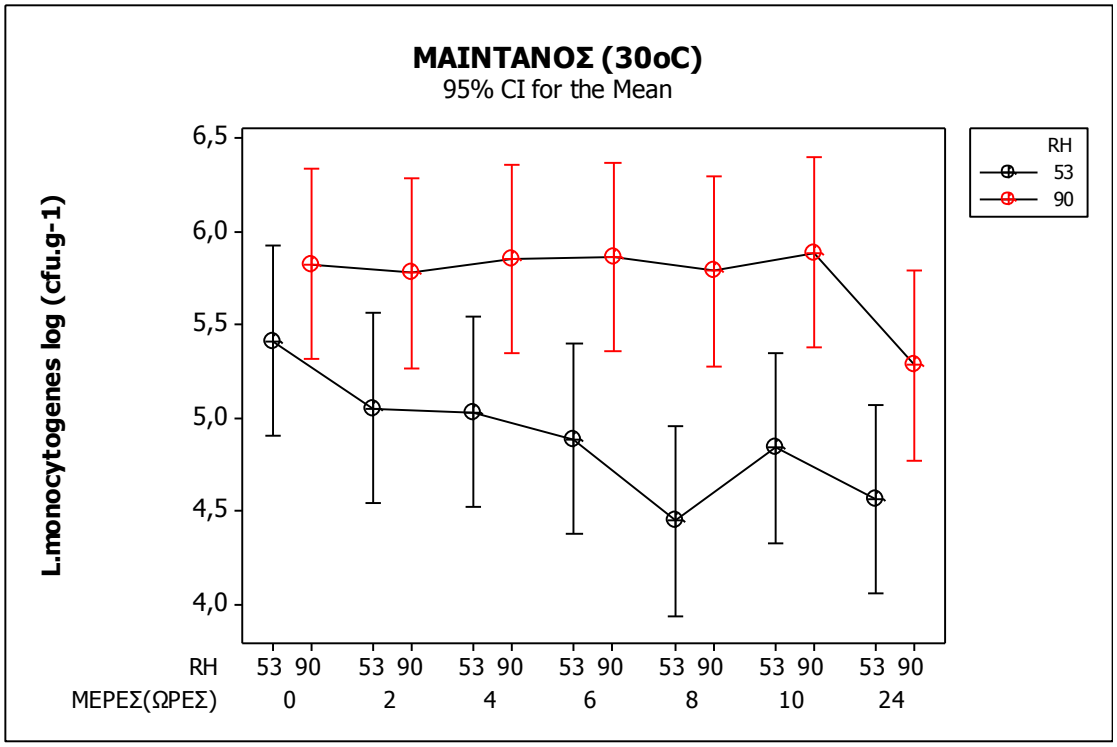
Σχήμα 7.2. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε αγγούρι διατηρημένο στους 30 ^{o}C για 24 h σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας.

Στο αγγούρι διατηρημένο στους 30 ^{o}C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) αύξηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μετά από 24 h πειράματος σε ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό κατά 0,7 log και 1,1 log αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* σε

ποσοστό σχετικής υγρασίας 53% παρουσίασε σημαντική αύξηση σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό που ενοφθαλμίστηκε (T = 0 h) ενώ σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 90% παρουσίασε σημαντική αύξηση σε σχέση με τα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 0, 2, 4 6 και 8 h.
Επίσης σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των τιμών σχετικής υγρασίας 53 και 90% μετά από 10 και 24h πειράματος.

7.3. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε μαϊντανό διατηρημένο στους 30 °C για 24h σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας.

Στο παρακάτω σχήμα εμφανίζεται η μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαϊντανό που διατηρήθηκε στους 30 °C για 24h σε ποσοστά υγρασίας 53 και 90% αντίστοιχα.

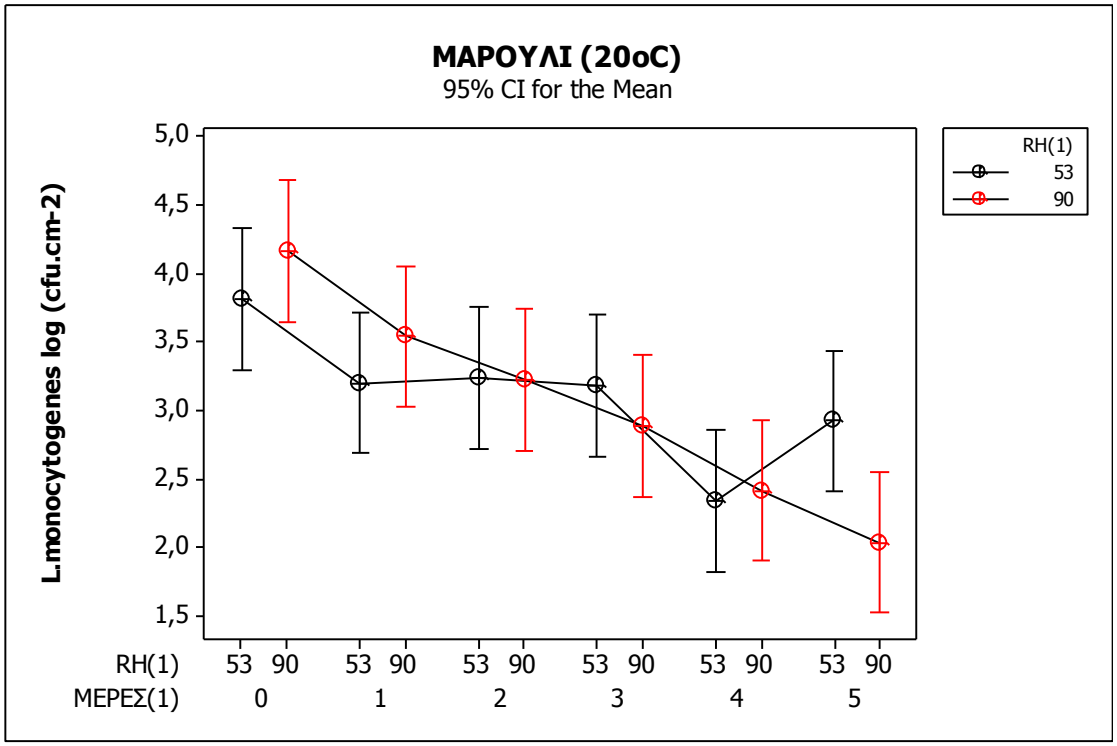


Σχήμα 7.3. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαϊντανό διατηρημένο στους 30 °C για 24 h σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας.

Στον μαϊντανό διατηρημένο στους 30 ^{o}C παρατηρήθηκε στατιστικά ($p<0,05$) σημαντική μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% για τα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 6, 8 και 10 h. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών χρονικών διαστημάτων δειγματοληψίας στα δυο ποσοστά σχετικής υγρασίας που μελετήθηκαν.

7.4. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε μαρούλι διατηρημένο στους 20 ^{o}C για χρόνο επώασης 5 ημερών σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας.

Στο παρακάτω σχήμα εμφανίζεται η μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαρούλι που διατηρήθηκε στους 20 ^{o}C για 5 ημέρες σε ποσοστά υγρασίας 53 και 90% αντίστοιχα.



Σχήμα 7.4. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαρούλι διατηρημένο στους 20 ^{o}C για 5 ημέρες σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας.

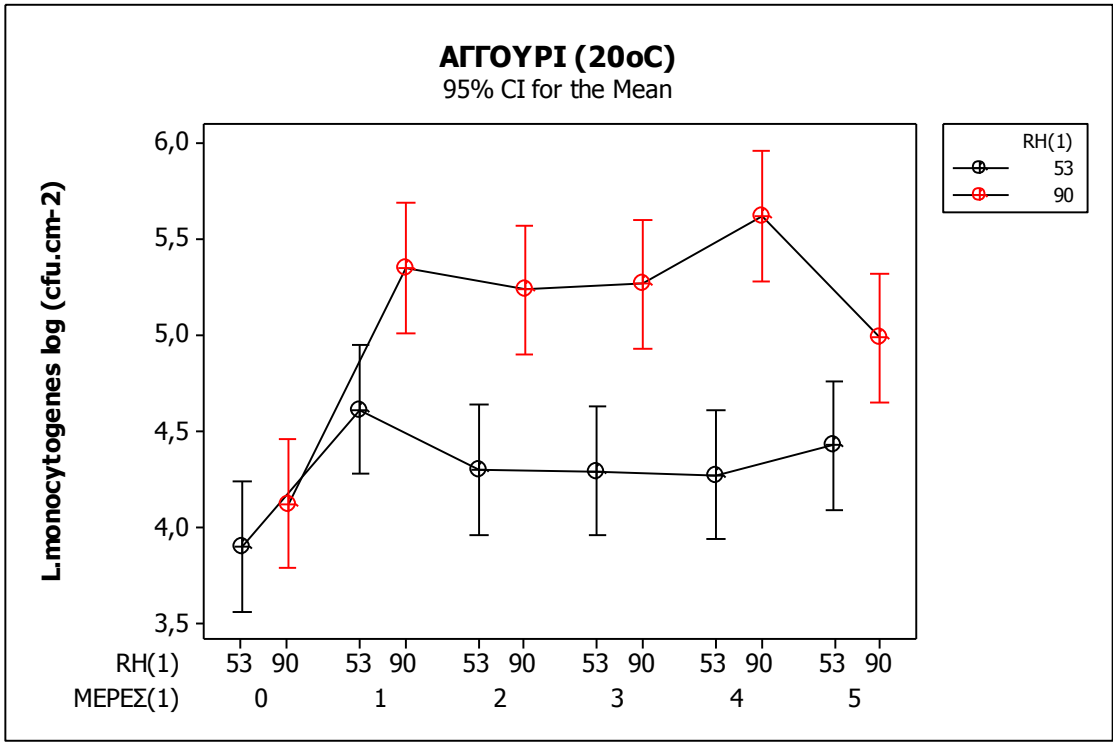
Στο μαρούλι διατηρημένο στους 20 ^{o}C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μετά από 5 ημέρες πειράματος σε

ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό κατά 0,9 log και 2,1 log αντίστοιχα.

Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 53% παρουσίασε σημαντική μείωση σε σχέση με το αρχικό χρονικό διάστημα της δειγματοληψίας (T = 0 ημέρες) ενώ σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 90% παρουσίασε σημαντική μείωση σε σχέση με τα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 0, 1, 2 και 3 ημέρες.

7.5. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε αγγούρι διατηρημένο στους 20 ^{o}C για χρόνο επώασης 5 ημερών σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας.

Στο παρακάτω σχήμα εμφανίζεται η αύξηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε αγγούρι που διατηρήθηκε στους 20 ^{o}C για 5 ημέρες σε ποσοστά υγρασίας 53 και 90% αντίστοιχα.



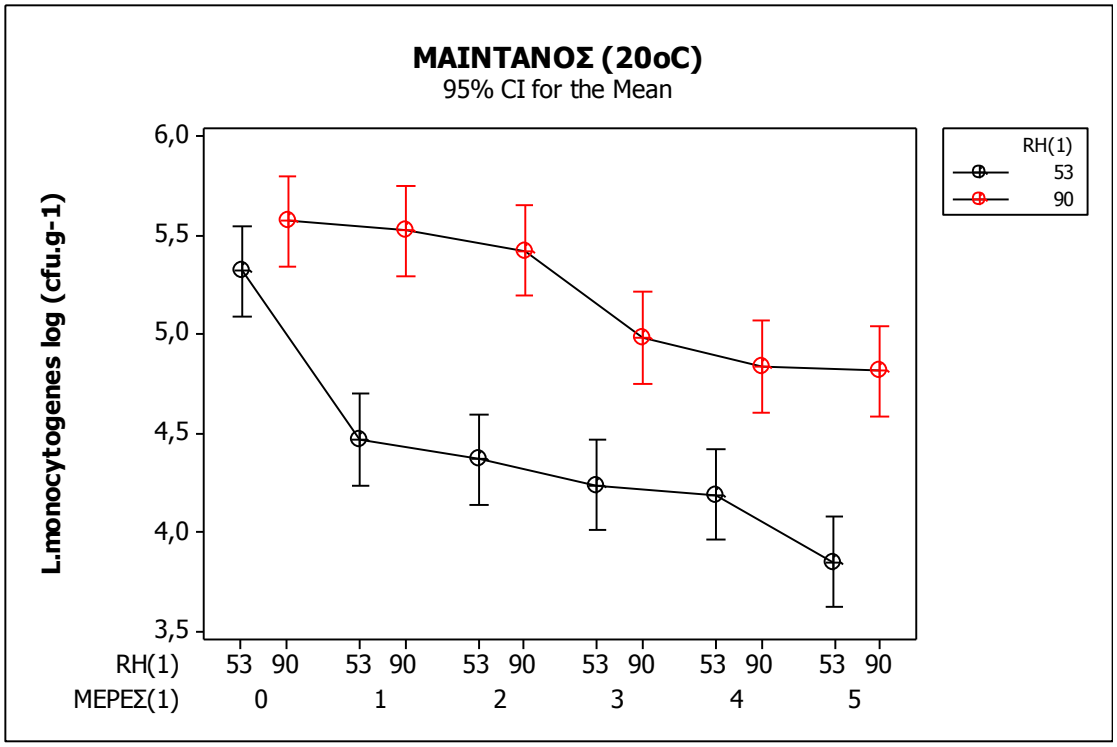
Σχήμα 7.5. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε αγγούρι διατηρημένο στους 20 ^{o}C για 5 ημέρες σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας.

Στο αγγούρι διατηρημένο στους 20 °C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) αύξηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μετά από 5 ημέρες πειράματος σε

ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό κατά 0,5 log και 0,8 log αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 53% παρουσίασε σημαντική αύξηση σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό που ενοφθαλμίστηκε (T = 0 ημέρες) ενώ σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 90% παρουσίασε σημαντική αύξηση σε σχέση με τα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 0 και 4 ημέρες.
Επίσης σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των δυο τιμών 53 και 90% σχετικής υγρασίας μετά από 5 ημέρες πειράματος σε σχέση με τα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 1, 2, 3 και 4 ημέρες.

7.6. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε μαϊντανό διατηρημένο στους 20 ^{o}C για χρόνο επώασης 5 ημερών σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας.

Στο παρακάτω σχήμα εμφανίζεται η μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαϊντανό που διατηρήθηκε στους 20 ^{o}C για 5 ημέρες σε ποσοστά υγρασίας 53 και 90% αντίστοιχα.



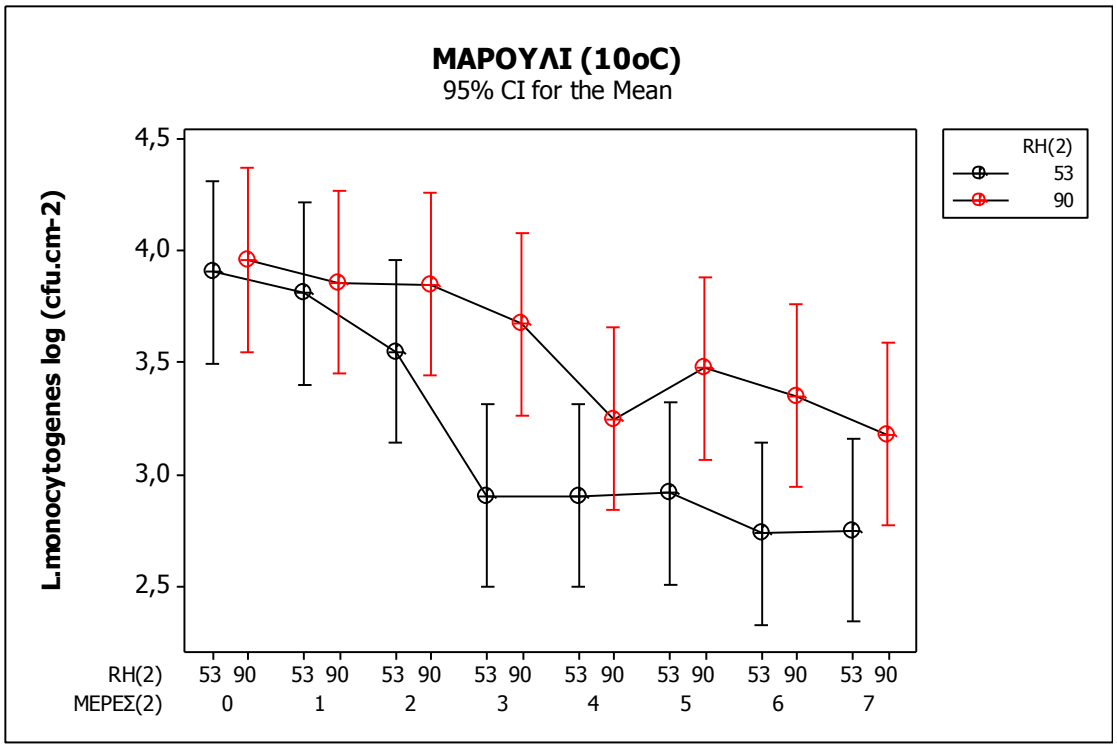
Σχήμα 7.6. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαϊντανό διατηρημένο στους 20 ^{o}C για 5 ημέρες σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας.

Στον μαϊντανό διατηρημένο στους 20 ^{o}C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μετά από 5 ημέρες πειράματος σε ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό που ενοφθαλμίστηκε (1,5-0,7 log αντίστοιχα). Ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 53% παρουσίασε σημαντική μείωση στα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 0, 1 και 2 ημέρες ενώ σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 90% παρουσίασε σημαντική μείωση στα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 0, 1 και 2 ημέρες.

Επίσης σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των δυο τιμών 53 και 90% σχετικής υγρασίας σε σχέση με τα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 1, 2, 3, 4 και 5 ημέρες.

7.7. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε μαρούλι διατηρημένο στους 10 ^{o}C για χρόνο επώασης 7 ημερών σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας.

Στο παρακάτω σχήμα εμφανίζεται η μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαρούλι που διατηρήθηκε στους 10 ^{o}C για 7 ημέρες σε ποσοστά υγρασίας 53 και 90% αντίστοιχα.

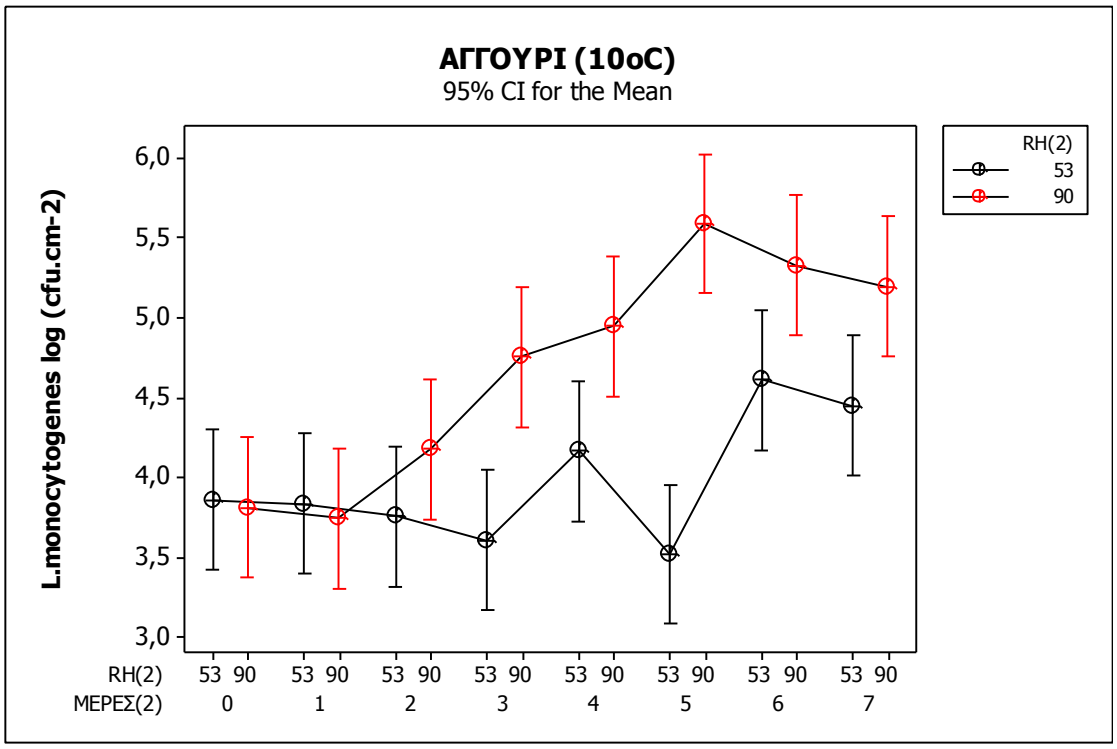


Σχήμα 7.7. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαρούλι διατηρημένο στους 10 ^{o}C για 7 ημέρες σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας.

Στο μαρούλι διατηρημένο στους 10 ^{o}C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μετά από 7 ημέρες πειράματος σε ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό που ενοφθαλμίστηκε (1,2 log και 0,8 log). Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 53% παρουσίασε σημαντική μείωση σε σχέση και στο χρονικό διάστημα δειγματοληψίας T = 1.

7.8. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε αγγούρι διατηρημένο στους 10 ^{o}C για χρόνο επώασης 7 ημερών σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας.

Στο παρακάτω σχήμα εμφανίζεται η αύξηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε αγγούρι που διατηρήθηκε στους 10 ^{o}C για 7 ημέρες σε ποσοστά υγρασίας 53 και 90% αντίστοιχα.



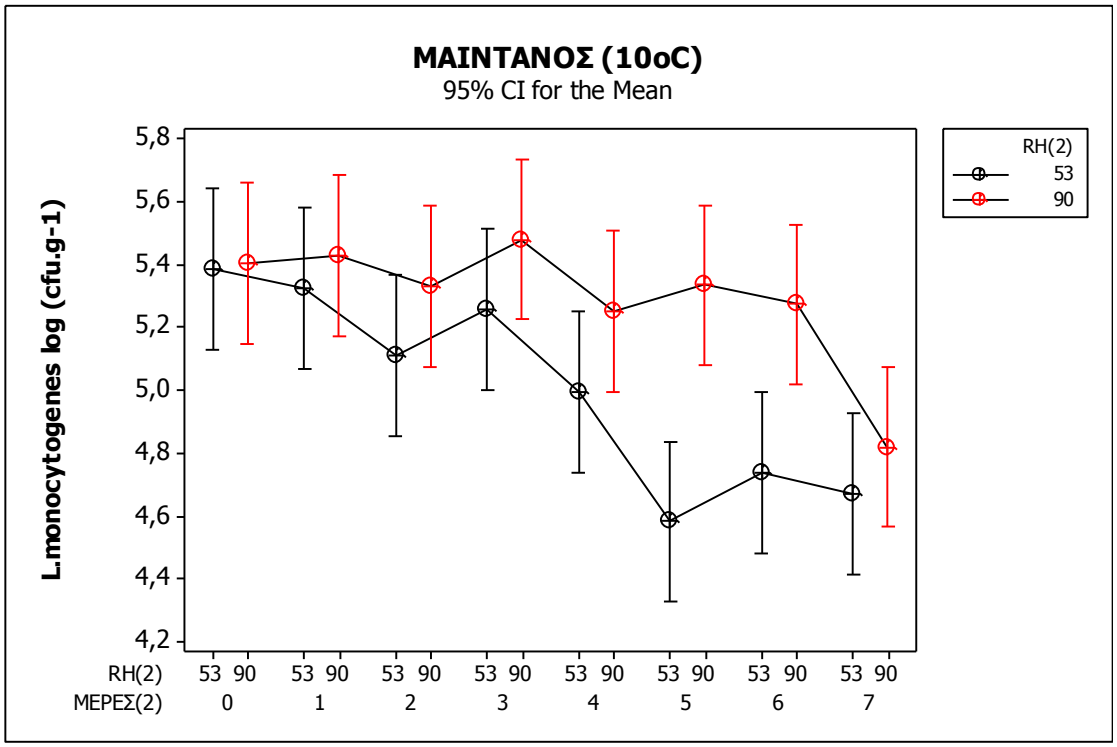
Σχήμα 7.8. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε αγγούρι διατηρημένο στους 10 ^{o}C για 7 ημέρες σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας.

Στο αγγούρι διατηρημένο στους 10 ^{o}C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) αύξηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μετά από 7 ημέρες πειράματος σε ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό που ενοφθαλμίστηκε (0,6-1,3 log αντίστοιχα). Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 53% παρουσίασε σημαντική αύξηση μετά από 7 ημέρες πειράματος (αύξηση κατά 0,9 log) σε σχέση το χρονικό διάστημα δειγματοληψίας T = 5 ημέρες ενώ σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 90% παρουσίασε σημαντική αύξηση σε σχέση με τα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 0, 1 και 2 ημέρες.

Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών 53 και 90% σχετικής υγρασίας στα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 3 και 5 ημέρες.

7.9. Επιβίωση της *L. monocytogenes* σε μαϊντανό διατηρημένο στους 10 ^{o}C για χρόνο επώασης 7 ημερών σε 53 και 90% ποσοστά σχετικής υγρασίας.

Στο παρακάτω σχήμα εμφανίζεται η μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαϊντανό που διατηρήθηκε στους 10 ^{o}C για 7 ημέρες σε ποσοστά υγρασίας 53 και 90% αντίστοιχα.



Σχήμα 7.9. Διακύμανση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε μαϊντανό διατηρημένο στους 10 ^{o}C για 7 ημέρες σε 53 και 90% ποσοστό σχετικής υγρασίας.

Στο μαϊντανό διατηρημένο στους 10 ^{o}C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μετά από 7 ημέρες πειράματος σε ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό που ενοφθαλμίστηκε (0,8-0,6 log αντίστοιχα). Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 53% παρουσίασε σημαντική μείωση στα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 0, 1, 2 και 3 ημέρες

ενώ σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 90% παρουσίασε σημαντική μείωση σε σχέση με τα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 0, 1, 2, 3, 4, 5 και 6 ημέρες.
Επίσης σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των τιμών 53 και 90% σχετικής υγρασίας στα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 5 και 6 ημέρες.

8.Συζητηση

Είναι γνωστό πως η θερμοκρασία είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την μικροβιακή ανάπτυξη στα τρόφιμα. Η επιβίωση και ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών διαφέρει ανάλογα με είδος του μικροοργανισμού, το τρόφιμο, καθώς και τις συνθήκες διατήρησης/αποθήκευσης, όπως η θερμοκρασία, ο χρόνος και η σχετική υγρασία (Tian *et al*., 2012, Paul R.E., 1999). Επομένως ο έλεγχος της θερμοκρασίας είναι σημαντικός παράγοντας για τη διάρκεια ζωής αλλά και τη διατήρηση της ποιότητας των φρούτων και λαχανικών (Smyth *et al*., 1998), ειδικά των φρεσκοκομμένων προϊόντων που είναι λιγότερο ανθεκτικά σε διακυμάνσεις της θερμοκρασίας (Matthews, 2006).

Στο μαρούλι διατηρημένο στους 10 °C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μετά από 7 ημέρες πειράματος σε ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό κατά 1,2 log και 0,8 log αντίστοιχα. Σύμφωνα με τους Oliveira *et al* (2012) κατά την αποθήκευση τεμαχισμένου μαρουλιού στους 10 °C για μέρες 8 μέρες ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* αυξήθηκε από 3.5 log_{10} σε 6 log_{10} μετά από 8 μέρες.. Σε μελέτη που έγινε από τους Carrasco *et al*., (2008) σε μαρούλια ενοφθαλμισμένα με 3 log cfu/g *L. monocytogenes* και διατηρημένα στους 5^0C ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* παρέμεινε στα ίδια επίπεδα μέχρι και την 6η μέρα εξέτασης ενώ ο πληθυσμός του παθογόνου αυξήθηκε κατά 2.66 log cfu/g μετά από 14 ημέρες επώασης των δειγμάτων στους 5^0C.
Άρα συμπεραίνουμε ότι ο έλεγχος της σχετικής υγρασίας σε μαρούλι διατηρημένο στους 10 °C για 1 εβδομάδα φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ανάπτυξης/μείωσης του πληθυσμού της *L. monocytogenes.*

Σύμφωνα με τον Paull R.E. (1999) η συνιστώμενη θερμοκρασία είναι 10 °C και η συνιστώμενη σχετική υγρασία συντήρησης 95% για το αγγούρι. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα σε θερμοκρασία 10 °C στο αγγούρι παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* αυξάνεται σημαντικά ($p<0,05$) μετά από 7 ημέρες πειράματος σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό που ενοφθαλμίστηκε (1,3 log). Στη συγκεκριμένη θερμοκρασία και τιμή σχετικής υγρασίας σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας ευνοείται η ανάπτυξη του ψυχρότροφου

βακτηρίου *L. monocytogenes*, άρα θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία στην απολύμανση του εξωτερικού μέρους του αγγουριού, ιδιαίτερα για τις ευπαθείς ομάδες, μιας και πρόκειται για ένα λαχανικό που καταναλώνεται είτε με τη φλούδα είτε χωρίς.

Σύμφωνα με τον Parthasarathy *et al*., (2008) η συνιστώμενη θερμοκρασία συντήρησης για τον μαϊντανό είναι 0 °C και η συνιστώμενη σχετική υγρασία συντήρησης 95% - 100%. Στον μαϊντανό διατηρημένο στους 10 ^{o}C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μόνο μετά από 7 ημέρες πειράματος σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό που ενοφθαλμίστηκε ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων δειγματοληψίας T = 1,2,3,4,5,6. Άρα σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας εάν ο μαϊντανός είναι επιμολυσμένος με ~ 5 log cfu/g αυτός ο πληθυσμός θα διατηρηθεί και στο ψυγείο για 6 μέρες σε 90% σχετική υγρασία.

Οι Koseki and Isobe (2005) έδειξαν ότι σε μαρούλι διατηρημένο στους 20^{0}C ενοφθαλμισμένο με 3,4 log cfu/g *L. monocytogenes,* ο πληθυσμός αυξήθηκε κατά περίπου 2 log cfu/g σε 24 h και διατηρήθηκε σε αυτά τα επίπεδα στις 48 h μέτρησης, σύμφωνα με το υπολογιστικό μοντέλο Baranyi.
Στο μαρούλι διατηρημένο στους 20 ^{o}C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μετά από 5 ημέρες πειράματος σε ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό (0,9 log και 2,1 log αντίστοιχα). Άρα συμπεραίνουμε ότι ο έλεγχος της σχετικής υγρασίας σε μαρούλι διατηρημένο στους 20 °C για 1 εβδομάδα φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ανάπτυξης/μείωσης του πληθυσμού της *L. monocytogenes.*

Στο αγγούρι διατηρημένο στους 20 °C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) αύξηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μετά από 5 ημέρες πειράματος σε ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό κατά 0,5 log και 0,8 log αντίστοιχα. Επίσης σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των δυο τιμών 53 και 90% σχετικής υγρασίας μετά από 5 ημέρες πειράματος σε σχέση με τα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 1, 2, 3 και 4 ημέρες. Επειδή εν γνώση μας δεν υπάρχει σχετική βιβλιογραφία για να συγκρίνουμε τα παραπάνω αποτελέσματά, ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στο γεγονός πως η τιμή της

σχετικής υγρασίας παίζει σημαντικό ρόλο στη συγκεκριμένη θερμοκρασία για το αγγούρι. Συγκεκριμένα στο 53% σχετική υγρασία παρατηρήθηκε μικρότερος πληθυσμός κατά 1.4 log cfu/cm^{2}σε σχέση με το 90% σχετική υγρασία μετά από 4 μέρες πειράματος.

Στον μαϊντανό διατηρημένο στους 20 ^{o}C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μετά από 5 ημέρες πειράματος σε ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό που ενοφθαλμίστηκε (1,5-0,7 log αντίστοιχα). Σύμφωνα με τον Dreux *et al*. (2007) σε πείραμα που έκαναν σε φύλλα μαϊντανού, σε ποσοστό σχετικής υγρασίας 32-64% ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* (4 log/g) έπεσε κάτω από το όριο ανιχνευσιμότητας της τεχνικής μετά από μια μέρα πειράματος και δεν επανείλθε ξανά καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος ακόμα και όταν αυξήθηκε η σχετική υγρασία στο 100%. Στο 53% σχετική υγρασία μετά από μια μέρα πειράματος στους 20 ^{o}C παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* κατά 0,9 log cfu/g και συνέχισε την πτωτική πορεία αλλά σε καμία περίπτωση δεν έπεσε κάτω από 3,7 log cfu/g. Επίσης σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε σε όλη τη διάρκεια του πειράματος μεταξύ των δυο τιμών 53 και 90% σχετικής υγρασίας. Άρα και στον μαϊντανό διατηρημένο στους 20 ^{o}C μεγάλη έμφαση πρέπει να δοθεί στη διατήρηση χαμηλής τιμής σχετικής υγρασίας αν και ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* σε κανένα από τα πειράματα που έγιναν δεν έπεσε κάτω από το όριο ανιχνευσιμότητας.

Στο μαρούλι διατηρημένο στους 30 °C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μετά από 24 h πειράματος σε ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό που ενοφθαλμίστηκε (πτώση κατά 1 log). Σε αντίθεση, οι Koseki and Isobe (2005) σε μαρούλι συντηρημένο σε θερμοκρασία 25 ^{0}C και ενοφθαλμισμένο με 3,4 log cfu/g *L. monocytogenes*, παρατήρησαν ότι ο πληθυσμός του παθογόνου άρχισε να αυξάνει μετά από 5h συντήρησης παρουσιάζοντας ανάπτυξη κατά 1 log cfu/g μετά από 9 h συντήρησης και μέγιστη ανάπτυξη (κατά 1,8 log cfu/g) μετά από 15 h συντήρησης σύμφωνα με το υπολογιστικό μοντέλο Baranyi. Άρα παρόλο που δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ποσοστών σχετικής υγρασίας στη συγκεκριμένη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια του πειράματος μας συμπεραίνουμε ότι ο έλεγχος της

σχετικής υγρασίας είναι σημαντική παράμετρος αφού βοηθά στη μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μιας και αυτή θεωρείται άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του συγκεκριμένου παθογόνου.

Στο αγγούρι διατηρημένο στους 30 ^{o}C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) αύξηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* μετά από 24 h πειράματος σε ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό κατά 0,7 log και 1,1 log αντίστοιχα. Επίσης σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των τιμών σχετικής υγρασίας 53 και 90% μετά από 10 και 24 h πειράματος.

Στον μαϊντανό διατηρημένο στους 30 ^{o}C παρατηρήθηκε στατιστικά ($p<0,05$) σημαντική μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε ποσοστά σχετικής υγρασίας 53 και 90% για τα χρονικά διαστήματα δειγματοληψίας T = 6, 8 και 10 h.

Επειδή εν γνώση μας δεν υπάρχει σχετική βιβλιογραφία για να συγκρίνουμε τα παραπάνω αποτελέσματα, ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στο γεγονός πως η τιμή της σχετικής υγρασίας παίζει σημαντικό ρόλο στις παραπάνω θερμοκρασίες για το αγγούρι και τον μαϊντανό.
Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι για τον ίδιο χρόνο επώασης σε χαμηλό ποσοστό σχετικής υγρασίας 53% ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* είναι μειωμένος σε σχέση με σχετική υγρασίας 90%. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί ότι σε χαμηλά ποσοστά υγρασίας μειώνεται η διαθεσιμότητα νερού (ξήρανση), οι μικροοργανισμοί περνούν σε φάση στρες με αποτέλεσμα να εμποδίζεται/καθυστερεί η ανάπτυξή τους (Brandl and Mandrell, 2002).

Ως γενικό συμπέρασμα παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* σε μαρούλι και μαϊντανό ακολουθεί πτωτική πορεία και στα δυο ποσοστά σχετικής υγρασίας και στις τρεις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν ενώ στο αγγούρι παρουσιάζει ανάπτυξη στις παραπάνω παραμέτρους. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε κάποια συγκεκριμένα συστατικά που μπορεί να υπάρχουν στην φλούδα του αγγουριού και στα οποία μπορεί να προσκολλάται και/ή να χρησιμοποιεί η *L. monocytogenes* σε σχέση με τα άλλα δυο φυλλώδη λαχανικά.
Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τόσο η θερμοκρασία όσο και το ποσοστό σχετικής υγρασίας καθώς και το είδος του υπό εξέταση λαχανικού είναι σημαντικοί

παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη/επιβίωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes*.

Το γεγονός πως η *L. monocytogenes* εμφανίζεται συχνά και προκαλεί τροφολοιμώξεις στα παραπάνω λαχανικά σε τροπικές χώρες όπως η Μαλαισία (Ponniah *et al*., 2010), το Πακιστάν και τη Σρι Λάνκα μπορεί και να οφείλεται ότι στις χώρες αυτές επικρατούν κατά τη διάρκεια του έτους υψηλές θερμοκρασίες και σχετική υγρασία.

9. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδρασης διαφορετικών τιμών σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας σε φρέσκα έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά, πιο συγκεκριμένα στο μαρούλι, το αγγούρι και τον μαϊντανό, ως προς την επιβίωση/ανάπτυξη του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes*.

Η παραπάνω έρευνα θα μπορούσε να επεκταθεί σε περισσότερα λαχανικά μελετώντας τις ίδιες συνθήκες.

Επιπλέον θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθουν διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης και διαφορετικά ποσοστά σχετικής υγρασίας στα ίδια λαχανικά.

Λόγω της προσπάθειας που γίνεται από την βιομηχανία τροφίμων για εύρεση νέων μεθόδων απολύμανσης κατά των παθογώνων μικροοργανισμών στα λαχανικά, θα μπορούσαν να μελετηθούν διάφορες μέθοδοι στα έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά, όπως πλύση των λαχανικών με νερό διαφορετικών θερμοκρασιών, ανάδευση και χρήση απολυμαντικών μέσων όπως αιθέραια έλαια.

Επιπλέον στο πείραμα μας μελετήθηκε η επίδραση του παθογόνου *L. monocytogenes*. Σε μελλοντικά πειράματα μπορούν να μελετηθούν και άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως η *Salmonella* και η *Escherichia coli*.

10. Βιβλιογραφία

Adak G.K., Meakins S.M., Yip H., Lopman B.A., O'Brien S.J. 1996–2000 (2005). Disease risks from foods, England and Wales. *Emerging Infectious Disease*, **11**, 365–372.

Adams M.R., Hartley A.D., & Cox L.J. (1989). Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. *Food Microbiology*, **6**, 69–77.

Adams M.R. and Moss M.O. (2000). Food Microbiology. *Royal Society of the Chemistry*, Cambridge, UK, 479 pp.

Akbas M.Y., Ölmez H. (2007). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. *Letters in Applied Microbiology*, **44**, 619-624.

Aycicek H., Oguz U., Karci K. (2006). Determination of total aerobic and indicator bacteria on some raw eaten vegetables from wholesalers in Ankara, Turkey. *International Journal of Hygiene & Environmental Health*, **209**, 197–201.

Baur S., Klaiber R., Wei H., Hammes W.P., Carle R. (2005). Effect of temperature and chlorination of pre-washing water on shelf-life and physiological properties of ready-to-use iceberg lettuce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **6**, 171– 182.

Berrang M.E., Brackett R.E., Beuchat L.R. (1989). Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. *Journal of Food Protection*, **52**, 702–705.

Beuchat L.R., Brackett R.E., Hao D.Y.-Y., Conner D.E. (1986). Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage juice. *Canadian Journal of Microbiology*, **32**, 791–795.

Beuchat L.R., Brackett R.E. (1990). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. *Journal of Food Science*, **55**, 755–758.

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

Beuchat L.R. (1999). Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. *Journal of Food Protection*, **62**, 845–849.

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

Bille J. (1990). Epidemiology of listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. pp71-74, Miller, Smith and Somkuti inc.

Brackett R.E. (1992). Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. *Journal of Food Protection*, **55**, 808–814.

Brandl M.T. and Mandrell R.E. (2002). Fitness of Salmonella enterica serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Applıed Environmental Microbiology*, **68**, 3614–3621.

Broome C.V., Gellin B. & Schwartz B. (1990). Epidemiology of listeriosis in the United States. pp. 61–65, in: Miller, Smith & Somkuti.

Buchanan R.L., Stahl H.G., Bencivengo M.M. & del Corral R. (1989). Comparison of lithium chloride-phenylethanol-moxalactain and modified Vogel Johnson agars for detection of Listeria species in retail-level meats, poultry and seafood. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**, 599–603.

Buchanan R.L., Phillips J.G. (2000). Updated models for the effects of temperature, initial pH, NaCl, and NaNO2 on the aerobic and anaerobic growth of *Listeria monocytogenes*. *Quantitative Microbiology*, **2**, 103–128.

Burnett S.L. and Beuchat L.R. (2002). Comparison of methods for fluorescent detection of viable, dead, and total Escherichia coli O157:H7 cells in suspensions and on apples using confocal scanning laser microscopy following treatment with sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, **74**, 37–45.

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

Carpentier B., Chassaing D. (2004). Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology*, **97**, 111–122.

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

CDC (2000), FoodNet 2000, Foodborne Diseases Active Surveillance Network, CDC's Emerging Infections Program, 1999 surveillance results, Preliminary report.

CDC, report. 2000. Foodborne outbreak response and surveillance unit. http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb/fbo2000/bacterial00.htm).

CFSAN, (2006), Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). Available at: http://www.fda.gov/food/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidancedocuments/produceandplanproducts/ucm064458.htm.

Climatetemp.info. (2008-2011). Available at: http://www.athens.climatetemp.info/

Climatetemp.info. (2008-2011). Available at: http://www.thessaloniki.climatetemp.info/

Climatetemp.info. (2008-2011). Available at: http://www.climatetemp.info/sri-lanka/

Climatetemp.info. (2008-2011). Available at: http://www.climatetemp.info/malaysia/

Corbo M.R., Speranza B., Campaniello D., D'Amato D. and Sinigaglia M. (2010). Fresh-cut fruits preservation: current status and emerging technologies. A.Mendez-Vilas Edition**,** Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, pp.1143-1154.

Crépet A., Albert I., Dervin C., Carlin F. (2007). Estimation of microbial contamination of food from prevalence and concentration data: application to *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. *Applied Environmental Microbiology*, **73**, 250–258.

De Roever C. (1998). Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control*, **6**, 321–347.

Dreux N., Albagnac C., Federighi M., Carlin F., Morris C.E. and Nguyen-the C. (2007). Viable but non-culturable Listeria monocytogenes on parsley leaves and absence of recovery to a culturable state. *Journal of Applied Microbiology*, 1364-5072.

Escudero M.E., Velazques L., Di Genero M.S. and De Guzman A.S. (1999). Effectiveness of various disinfectants in the elimination of *Yersinia enterocolitica* on fresh lettuce. *Journal of Food Protection*, **62**, 665–669.

European Commission (EC), 2005, Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs. 2005. OJ L 338, 1–26.

European Commission (EC), (2005), Rapid alert system for food and feed, Annual Report 2005. Available at http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm.

Evans M.R., Ribeiro C.D., Salmon R.L. (2003). Hazards of healthy living: bottled water and salad vegetables as risk factors for *Campylobacter infection*. *Emerging Infectious Diseases*, **9**, 1219–1225.

Farber J.M. & Peterkin P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*: A foodborne pathogen. *Microbiology Reviews*, **55**, 476–511.
Farber J.M., Wang S.L., Cai Y., Zhang S. (1998). Changes in populations of *Listeria monocytogenes* inoculated on packaged fresh-cut vegetables. *Journal of Food Protection*, **61**, 192–195.

FDA/FSIS [U.S. Food and Drug Administration/Food Safety and Inspection Agency (USDA)], (2001), Draft Assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods, Center for Food Safety and Applied Nutrition (FDA) and Food Safety Inspection Service (USDA). Available at: www.foodsafety.gov/~dms/lmrisk.html

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/World Health Organization (WHO), (2004), Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, Technical Report, Microbiological Risk Assessment Series 5.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/World Health Organization (WHO), (2008), Microbiological Risk Assessment Series: Microbiological hazards in fresh fruit and vegetables. Available at www.fao.org/ag/agn/agns/jemra_riskassessment_freshproduce_en.asp.

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

Francis G.A. & O_Beirne D. (2001). Effects of vegetable type, package atmosphere and storage temperature on growth and survival of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **26**, 1–6.

Francis G.A., O'Beirne D. (2005). Variation among strains of *Listeria monocytogenes*: differences in survival on packaged vegetables and in response to heat and acid conditions. *Food Control*, **16**, 687–694.

Fuster-Valls N., Hernadez-Herrero M., Marin-De-Mateo M., Rodriguez-Jerez J.J. (2008). Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*, **19**, 308–314.

Garg N., Churey J.J., Splittstoesser D.F. (1990). Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. *Journal of Food Protection*, **53**, 701–703.

Gilbert R.J. (1992). Provisional microbiological guidelines for some ready-to-eat foods sampled at point of sale: Notes for PHLS Food Examiners. *Public Health Laboratory Service*, **9**, 98–99.

Gleeson E., O'Beirne D. (2005). Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food Control*, **16**, 677–685.

Gray M.L. & Killinger A.H. (1966). *Listeria monocytogenes* and *Listeria* infections. *Bacteriological Reviews*, **30**, 309–382.

Health Protection Agency (HPA), (2010). Cancer patients are at an almost five-fold increased risk of developing listeria.
Available at:
http://www.hpa.org.uk/NewsCentre/NationalPressReleases/2010PressReleases/101215Cancerpatientsriskfromlisteria/

Health Protection Agency (HPA), (2011). Decrease in listeriosis incidence in England and Wales in 2010.
Available at: http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2011/news1311.htm#list#wnv

Heaton J.C., Jones K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*, **104**, 613-626.

Hirano S.S. and Upper C.D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on Pseudomonas syringae-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology Molecular Biology Review*, **64**, 624–653.

IFPA (International Fresh-cut Produce Association) and PMA (The Produce Marketing Association) (1999), Handling guidelines for the fresh-cut produce industry (3rd ed.), Alexandria, VA: IFPA, p. 5.

Jacxsens L., Devlieghere F., Falcato P., Debevere J. (1999). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas* spp. on freshcut produce packaged under equilibrium-modified atmosphere. *Journal of Food Protection*, **62**, 1128–1135.

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

Kallender K.D., Hitchins A.D., Lancette G.A., Schmieg J.A., Garcia G.R., Solomon H.M. & Sofos J.N. (1991). Fate of G.A. Francis D. O'Beirne / Food Control 16 (2005) 687–694 693 Listeria monocytogenes in shredded cabbage stored at 5°C and 25°C under a modified atmosphere. *Journal of Food Protection*, **54**,
302–304.

King A.D., Jr., & Bolin H.R. (1989). Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. *Food Technology*, **43**, 132–135, 139.

King A.D., Magnuson J.A., Török T., Goodman N. (1991). Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. *Journal of Food Science*, **56**, 459-461.

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

Koutsoumanis K.P., Sofos J.N. (2004a). Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* after habituation at different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology*, **38**, 321–326.

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

Lapidot A., Romling U., Yaron S. (2006). Biofilm formation and the survival of *Salmonella Typhimurium* on parsley. *International Journal of Food Microbiology*, **109**, 229–233.

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

Loncarevic S., Johannessen G.S. and Rorvik L.M. (2005). Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. *Letters in Applied Microbiology*, **41**, 186–189.

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

Matthews K.R. (2006). Microbiology of fresh produce. Washington, D.C.: ASM Press. 124 p.

McAuliffe O., Hill C., & Ross R. P. (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lacticin 3147-producing starter culture. *Journal of Applied Microbiology*, **86**, 251–256.

McCabe W.L., Smith J.C. and Harriott P. (2008). Unit Operations of Chemical Engineers. 6th Edition, McGraw-Hill, pp. 688-690.

McCarthy S.A. (1990). Listeria in the environment. pp. 25-29, in: Miller, Smith & Somkuti inc.

McMeekin T.A., Bowman J., McQuestin O., Mellefont L., Ross T., Tamplin M. (2008). The future of predictive microbiology: strategic research, innovative applications and great expectations. *International Journal of Food Microbiology*, **128**, 2–9.

Miller A.J. (1992). Combined water activity and solute effects on growth and survival of Listeria monocytogenes Scott A. *Journal of Food Protection*, **55**, 414–418.

Molinos A.C., Abriouel H., Omar B.N., Valvidia E., Lucas-Lopez R., Maqueda M., Cañamero M.M. and Gálvez A. (2005). Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 7781–7787.

Motarjemi Y., Adams M. (2006). Emerging foodborne pathogens, CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge England.

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

Notermans S., Dufrenne J., Teunis P. and Chackraborty T. (1998). Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **61**, 244–248.

Oliveira M, Usall J, Solsona C, Alegre I, Vi˜nas I, Abadias M. (2010). Effects of packaging type and storage temperature on the growth of foodborne pathogens on shredded 'Romaine' lettuce. *Food Microbiology*, **27**, 375–80.

Oliveira M., Vinas I., Anguera M. and Abadias M. (2012). Fate of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in the presence of natural background microbiota on conventional and organic lettuce. *Food Control*, **25**, 678-683.

Ölmez H., Kretzschmar U. (2009). Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT - Food Science and Technology*, **42**, 686–693.

Parish M.E., Beuchat L.R., Suslow T.V., Harris L.J., Garrett E.H., Farber J.N., Busta F.F. (2003). Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2**, 161–173.

Parthasarathy V.A., Chempakam B., Zachariah J. (2008). Chemistry of spices, CAB International, UK, p. 378-392.

Paull R.E. (1999). Effect of temperature and relative humidity on fresh commodity quality. *Postharvest Biology and Technology*, **15**, 263–277.

Pirie J.H.H. (1927). A new disease of veldt rodents "Tiger Rover Disease". *Publications of the South African Institute of Medical Research*, **3**, 163–186.

Ponniah J., Robin T., Paie M.S., Radu S., Ghazali F.M., Kqueen C.Y., Nishibuchi M., Nakaguchi Y and Malakar P.K. (2010). *Listeria monocytogenes* in raw salad vegetables sold at retail level in Malaysia. *Food Control*, **21,** 774-778.

Potel J. (1953). Aetiologie der Granulomatosis Infantisepticum. Wissenshaftliche Zeitschrift der Martin Luther Universitat Halle-Wittenberg, **2**, 341–349.

Randazzo C.L., Pitino I., Scifò G.O., Caggia C. (2009). Biopreservation of minimally processed iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. *Food Control*, **20**, 756–763.

Richardson S.D., Thurston A.D., Caughran T.V., Collette T.W., Patterson K.S. and Lykins B.W. (1998). Chemical by-products of chlorine and alternative disinfectants. *Food Technology*, **52**, 58–61.

Rose L.J., Donlan R., Banerjee S.N., Arduino M.J. (2003). Survival of *Yersinia pestis* on environmental surfaces. *Applied. Environmental. Microbiology*, **69**, 2166–2171.

Ryser E.T. and Marth E.H. (1991). Listeria, Listeriosis, and Food Safety, pp632. New York.

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

Sivapalasingam S., Friedman C.R., Cohen L. and Tauxe R.V. (2004). Fresh produce: A growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*, **67**, 2342–2353.

Smyth AB, Song J, Cameron AC. (1998). Modified atmosphere packaged cut iceberg: effect of temperature and O2 partial pressure on respiration and quality. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **46**, 4556–62.

Snowdon A.L. (2010). Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables, Vol.2, Manson Publishing Ltd, UK., p.217.

Steinbruegge E.G., Maxcy R.B. and Liewen M.B. (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* on ready to serve lettuce. *Journal of Food Protection*, **51**, 596-599.

Takeuchi K., Matute C.M., Hassan A.N., Frank J.F. (2000). Comparison of the attachment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Pseudomonas fluorescens* to lettuce leaves. *Journal of Food Protection*, **63**, 1433– 1437.

Takeuchi K., Frank, J.F. (2001). Quantitative determination of the role of lettuce leaf structures in protecting *Escherichia coli* O157:H7 from chlorine disinfection. *Journal of Food Protection*, **64**, 147–151.

Tian J.Q., Bae Y.M., Choi N.Y., Kang D.Y., Heu S. and Lee S.Y. (2012). Survival and Growth of Foodborne Pathogens in Minimally Processed Vegetables at 4 and 15◦C. *Journal of Food Science*, **71**, 1.

Vaneechoutte M., Boerlin P., Tichy H-V., Bannerman E., Jäger B., Bille J. (1998). Comparison of PCR-based DNA fingerprinting techniques for the identification of *Listeria* species and their use for atypical *Listeria* isolates. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**, 127–139.

Weatheronline Ltd. (1999-2012) Available at:
http://www.weatheronline.gr/reports/wxfacts/Humidity.htm

Wikipedia on parsley. Available at: http://en.wikipedia.org/wiki/Parsley

Zhang S., Farber J.M. (1996). The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh cut vegetables. *Food Microbiology*, **13**, 311–321.

Γεωργιάδης Ν. & Ραφαηλίδης Σ. (2001). Τεχνολογία και έλεγχος ποιότητας φρούτων-λαχανικών. Μέρος Α, τμήμα τεχνολογίας τροφίμων, Θεσσαλονίκη, σελ.56-57.

Δεληγκάρης Ν. (1980). Μικροβιολογία τροφίμων, Τεύχος Β, Σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων-Διατροφής, Θεσσαλονίκη, σελ.208-209.

Ζούμη Μ.Μ. (2009). Βιολογική καλλιέργεια μαρουλιού (*Lactuca Sativa L.)* στην Κρήτη. Τμήμα θερμοκηπιακών καλλιεργειών και ανθοκομίας, Τ.Ε.Ι. Κρήτης.

Θανόπουλος Χ. (2008). Τεχνικές βιολογικής καλλιέργειας αρωματικών λαχανικών: Μαϊντανός. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Μαρκάκης Π. (1996). Στοιχεία Τεχνολογίας Τροφίμων, Τρίαινα Εκδοτική, Αθήνα, σελ. 87-92.

Νάστου Α. (2011). Επίδραση διαφόρων παραγόντων στην επιβίωση του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε φρέσκα έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Σιώμος Α.Σ. (2004-2005). Ειδική Λαχανοκομία Ι, Μέρος Β, Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, σελ. 1-17.

Φανουράκη Α. (2004). Εναλλακτικοί μέθοδοι έναντι του βρωμιούχου μεθυλίου για την αντιμετώπιση των μυκητολογικών ασθενειών των κολοκυνθοειδών σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες. Τμήμα Φυτικής παραγωγής, Πανεπιστήμιου Ηρακλείου, Κρήτης.