

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων

Π.Μ.Σ. «Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών σε
έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες με βάση τη
μαγιονέζα με διαφορετικά ρεολογικά και
φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

ΛΑΜΠΡΙΝΗ ΔΙΑΜΑΝΤΗ



ΑΘΗΝΑ 2014

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΔΑΜΠΡΙΝΗ ΔΙΑΜΑΝΤΗ

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Ο νέος τίτλος είναι:

**Μελέτη της επίδρασης του αρχικού pH της βάσης
σαλάτας και της συγκέντρωσης της πατάτας στην
επιβίωση του παθογόνου *Salmonella* spp. σε έτοιμες
προς κατανάλωση πατατοσαλάτες**

Επιβλέπων καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης (Επίκουρος Καθηγητής)

Εξεταστική-Συμβουλευτική Επιτροπή:

- Γιαννιώτης Σταυριανός (Καθηγητής)
- Στοφόρος Νικόλαος (Αναπληρωτής Καθηγητής)
- Σκανδάμης Παναγιώτης (Επίκουρος Καθηγητής)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	<u>Σελ.</u>
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Σαλάτες τύπου-deli	10
1.1.1. Εισαγωγή.....	10
1.1.2. Κανονική μικροβιακή κατάσταση μαγιονέζας και βάσης σαλάτας.....	10
1.1.3. Αλλοίωση μαγιονέζας και βάσης σαλάτας.....	12
1.2. Σαλμονέλωση	13
1.2.1. Εισαγωγή.....	13
1.2.2. Επικρατέστεροι ορότυποι που προκαλούν σαλμονέλωση.....	15
1.2.3. Χαρακτηριστικά.....	17
1.2.4. Περιβάλλον.....	18
1.2.5. Παθογένεια και συμπτώματα.....	19
1.2.6. Συσχετισμός με τα τρόφιμα.....	20
1.2.7. Πρόληψη και έλεγχος.....	22
1.2.8. Επιβίωση του παθογόνου <i>Salmonella</i> spp. υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης.....	23
1.3. Βασικά χαρακτηριστικά των σαλατών τύπου-deli που επηρεάζουν την επιβίωση του παθογόνου <i>Salmonella</i> spp.	26
1.3.1. Θερμοκρασία συντήρησης.....	28
1.3.2. Το pH.....	29
1.3.2.1. Ορισμός.....	29
1.3.2.2. Το pH των τροφίμων.....	30
1.3.2.3. Το pH και η μικροβιακή αύξηση.....	30
1.3.3. Οργανικά οξέα.....	32
1.3.3.1. Εισαγωγή.....	32
1.3.3.2. Μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης.....	33
1.3.3.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την δραστικότητα των οξέων.....	36

1.3.3.4. Τύποι οξέων.....	39
1.3.4. Συντηρητικά.....	40
1.3.4.1. Εισαγωγή.....	40
1.3.4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την δράση των συντηρητικών.....	41
1.3.4.3. Σορβικό κάλιο.....	42
1.4. Μοντελοποίηση της μικροβιακής συμπεριφοράς.....	44
1.5. Σκοπός της μελέτης.....	47
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	48
2.1. Αναλώσιμα υλικά.....	49
2.2. Μικροβιακά στελέχη.....	51
2.3. Πειραματική διαδικασία.....	52
2.3.1. Ανανέωση και καθαρισμός των μικροοργανισμών.....	53
2.3.2. Υποστρώματα-συνθήκες.....	54
2.3.3. Ενοφθαλμισμός.....	54
2.3.4. Μικροβιακές αναλύσεις.....	55
2.3.5. Μέτρηση pH.....	56
2.4. Πειραματικός σχεδιασμός.....	57
2.4.1. Πειραματικός σχεδιασμός των προπειραμάτων.....	57
2.4.2. Πειραματικός σχεδιασμός του κύριου πειράματος.....	60
2.5. Ανάπτυξη μοντέλου.....	65
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	67
3.1. Αποτελέσματα προπειραματικής διαδικασίας.....	68
3.1.1. Προπείραμα Α'.....	68
3.1.2. Προπείραμα Β'.....	71
3.1.3. Προπείραμα Γ'.....	72
3.1.4. Προπείραμα Δ'.....	78
3.1.5. Προπείραμα Ε'.....	83
3.2. Αποτελέσματα πειραματικής διαδικασίας.....	86
3.2.1. Επίδραση του αρχικού pH της βάσης σαλάτας στην επιβίωση του παθογόνου.....	87
3.2.2. Επίδραση της συγκέντρωσης πατάτας στην επιβίωση του παθογόνου.....	97
3.2.3. Επίδραση του οργανικού οξέος στην επιβίωση του παθογόνου.....	98

3.2.4. Επίδραση της παρουσίας ή μη συντηρητικού στην επιβίωση του παθογόνου.....	100
3.3. Δευτερογενές μοντέλο.....	102
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	107
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α'.....	111
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β'.....	115
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	123

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου κ. Σκανδάμη Παναγιώτη, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου για την σύνθεση του θέματος και για την πολύτιμη καθοδήγησή του σε όλα τα στάδια της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω την έκφραση των θερμότερων ευχαριστιών μου στο Δρ. Μανιό Σταύρο, μέλος του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την ανεκτίμητη βοήθεια και την καθοριστική συμβολή του στην εκπόνηση αυτής της μελέτης, καθώς και για την προθυμία και συμμετοχή του στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή κ. Γιαννιώτη Σταυριανό και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Στοφόρο Νικόλαο που συμμετείχαν στην εξεταστική επιτροπή.

Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας και τη δημιουργία ενός ευχάριστου περιβάλλοντος στον εργαστηριακό χώρο αλλά και όσους έμμεσα ή άμεσα συνεισέφεραν στην ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τόσο την οικογένεια μου όσο και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξη τους μέχρι την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής μελέτης, την οποία και αφιερώνω στους γονείς μου.

Λαμπρινή Γ. Διαμαντή

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν η συγκριτική αξιολόγηση της επιβίωσης του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε ογδόντα διαφορετικά δείγματα πατατοσαλάτας, τα οποία διαφοροποιούνται μεταξύ τους από (i) το αρχικό pH της βάσης σαλάτας, (ii) τη συγκέντρωση της πατάτας που προστίθεται, (iii) το είδος του οργανικού οξέος που χρησιμοποιείται ως μέσο όξυνσης και, (iv) την παρουσία ή απουσία του συντηρητικού.

Οι βάσεις σαλάτας παρασκευάστηκαν με τέσσερα διαφορετικά αρχικά pH, (3.6, 3.9, 4.1 και 4.4), τα οποία ρυθμίστηκαν με οξικό ή γαλακτικό οξύ και με την προσθήκη ή μη σορβικού καλίου σε ποσότητα 0.1%. Τα δείγματα είχαν συνολικό βάρος 30 g σε πέντε διαφορετικές αναλογίες πατάτας/βάση σαλάτας (0/1, 0.5/1, 1/1, 2/1 και 3/1). Μετά την παρασκευή τους εμβολιάστηκαν με πέντε στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. Όλα τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 5 °C και οι πληθυσμοί του παθογόνου, οι οποίοι επέζησαν μετρήθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό XLD και TSA.

Παρατηρήθηκε στα δείγματα χωρίς πατάτα μεγαλύτερη επιβίωση του παθογόνου σε υψηλότερες τιμές pH (π.χ., 6-30 ημέρες σε pH 4.4), σε σχέση με βάσεις σαλάτας με χαμηλότερο pH (π.χ., 0.5-1 ημέρες σε pH 3.6). Επίσης, η προσθήκη της πατάτας αύξησε το pH στα τελικά προϊόντα (κατά 0.2 έως 1.4), ανάλογα με την αναλογία πατάτας/βάσης σαλάτας και το μέσο όξυνσης, γεγονός που είχε άμεση επίδραση στην επιβίωση του παθογόνου.

Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι το σορβικό κάλιο μείωσε την επιβίωση του παθογόνου σε σύγκριση με τα δείγματα που δεν είχαν συντηρητικό. Επιπλέον, όταν χρησιμοποιήθηκε το γαλακτικό οξύ, το pH των τελικών προϊόντων αυξήθηκε 0.6-1.4, ανάλογα με την συγκέντρωση της πατάτας, ενώ αντίστοιχα στα δείγματα με οξικό οξύ είχαμε αύξηση του pH 0.2-1.0. Συνεπώς το γαλακτικό οξύ αυξάνει περισσότερο το τελικό pH των προϊόντων και συνεπώς έχει μικρότερη βακτηριοκτόνο δράση σε σύγκριση με τα δείγματα με οξικό οξύ.

Συμπερασματικά, η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. φάνηκε να επηρεάζεται πρωτίστως από το τελικό pH των προϊόντων και

δευτερευόντως από την συγκέντρωση της πατάτας που συντέλεσε στην διαμόρφωση αυτού του pH.

Τα αποτελέσματα μπορούν να φανούν χρήσιμα στην βιομηχανία τροφίμων για την ανάπτυξη νέων ή τη βελτίωση ήδη υπαρχόντων προϊόντων, με ηπιότερο όξινο χαρακτήρα και λιγότερο όξινη γεύση, χωρίς τον υποβιβασμό του επιπέδου ασφαλείας τους έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp.

Λέξεις κλειδιά: *Salmonella* spp., πατατοσαλάτα, βάση σαλάτας, πατάτα, pH, μοντέλο

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the survival of the pathogen *Salmonella* spp. in eighty different samples of potato salad. The latter are formed by (i) the initial pH of the cream base, (ii) the concentration of potato added, (iii) the type of the organic acid used as an acidulant and, (iv) the presence or absence of preservative.

The cream bases were prepared with four different initial pH levels, 3.6, 3.9, 4.1 and 4.4, which were adjusted with acetic or lactic acid and with the addition or not of potassium sorbate in an amount of 0.1 %. The samples had a total weight of 30 g in five different proportions of potato/cream base: 0/1, 0.5/1, 1/1, 2/1 and 3/1. When they were prepared and were inoculated with five strains of the pathogen *Salmonella* spp. All samples were stored at 5 °C and the surviving populations of the pathogen were regularly enumerated on XLD and TSA dishes.

It was observed that in the samples without potato, the survival of the pathogen increased at higher pH values (e.g., 6-30 days at pH 4.4), compared to cream bases with lower pH levels (e.g., 0.5-1 days at pH 3.6). The addition of potato caused increase in the pH of the final products by 0.2 to 1.4 values, depending on the ratio of potato/cream base and the type of acidulant. The latter had an immediate impact on the survival of the pathogen.

Additionally, it was found that potassium sorbate reduced the survival of the pathogen in comparison to the samples without a preservative. When lactic acid was used, the pH of the final product increased by 0.6-1.4, depending on the potato concentration, respectively in the samples with acetic acid the pH have increased by 0.2-1.0. Thus, the lactic acid has increased more the final pH of the products and resulting in lower antimicrobial activity compared to the samples with acetic acid.

The overall results showed that the survival of the pathogen *Salmonella* spp. was affected primarily by the final pH of the products and subsequently by the potato concentration that was used to achieve the formation of this pH. The results can be used by the food industry to develop new or improve the formulation of already existing products, in order to assess their safety level against the pathogen *Salmonella* spp.

Keywords: *Salmonella* spp., potato salad, cream base, potato, pH, model

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Σαλάτες τύπου-deli

1.1.1. Εισαγωγή

Ως deli-τύπου χαρακτηρίζονται οι σαλάτες που είναι έτοιμες προς κατανάλωση, χωρίς να χρειάζεται περαιτέρω προετοιμασία ή μαγείρεμα. Ανάλογα με το είδος τους, αποτελούνται κυρίως από ολόκληρα ή τεμαχισμένα λαχανικά (ωμά ή μαγειρεμένα), προϊόντα ζωικής προέλευσης (τυρί, αβγά, γιαούρτι κ.α.) και διάφορες έτοιμες σάλτσες (μαγιονέζα) (Smittle, 2000).

Η φύση των προϊόντων αυτών χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερα ευαλλοιώτη, λόγω της μεγάλης ποικιλίας συστατικών που περιέχουν και καθώς ο χρόνος ζωής τους περιορίζεται σε ορισμένες ημέρες. Εντούτοις, η προσθήκη συντηρητικών (σορβικό κάλιο, βενζοϊκό νάτριο), έχει αυξήσει τον χρόνο ζωής περίπου σε 60 ημέρες, σε θερμοκρασία συντήρησης 4 °C. Παράλληλα, το χαμηλό pH (3.6–4.7) του περιβάλλοντος των σαλατών δρα συνεργικά στην μακροχρόνια διατήρηση της ποιότητας τους και εξασφαλίζει, σε ένα μεγάλο ποσοστό την ασφάλεια των προϊόντων έναντι της ανάπτυξης και επιβίωσης πολλών παθογόνων μικροοργανισμών (Smittle, 2000).

1.1.2 Κανονική μικροβιακή ποιότητα μαγιονέζας και βάσης σαλάτας.

Τα ωμά τρόφιμα είναι δυνατόν να είναι φυσικά αποικισμένα με ακίνδυνους μικροοργανισμούς, αλλά επίσης μικροοργανισμούς που τα επιμολύνουν σε οποιοδήποτε στάδιο από την στιγμή της παραγωγής μέχρι την στιγμή της κατανάλωσης. Το επίπεδο του πληθυσμού της αποικίας ενός μικροοργανισμού που βρίσκεται αρχικά στο τρόφιμο εξαρτάται από τις εσωτερικές και εξωτερικές συνθήκες στις οποίες αυτό εκτίθεται.

Η μαγιονέζα και η βάση σαλάτας είναι προϊόντα που προκύπτουν από γαλάκτωμα νερό-σε-λάδι, τα οποία σχηματίζονται με λάδι, νερό, ξύδι ($\approx 0.25\%$ οξικό

οξύ) ή χυμό λεμονιού, ζάχαρη, αλάτι, άμυλο, αυγό, μπαχαρικά και κομμάτια λαχανικών. Η μαγιονέζα και η βάση σαλάτας έχουν συνήθως pH που κυμαίνεται από 3.5 έως 4.0. Κάποια από αυτά τα προϊόντα μπορεί να περιέχουν χαμηλές θερμίδες και να είναι λιγότερο όξινα, δηλαδή να περιέχουν λιγότερο οξύ, λιγότερο λάδι και περισσότερο νερό, με αποτέλεσμα να έχουν pH 4.5 ή και υψηλότερο.

Οι μικροοργανισμοί μπορεί να εισαχθούν στα προϊόντα μέσω των συστατικών τους, του εξοπλισμού και του αέρα. Παρ' όλα αυτά, οι περισσότεροι μικροοργανισμοί πεθαίνουν όταν τα προϊόντα αποθηκεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου. Εξάίρεση αποτελούν οι οξυανθεκτικοί μικροοργανισμοί, όπως είναι οι μούχλες (*Goetrichum* και *Aspergillus* spp.), μύκητες (*Saccharomyces* spp.), αρκετά είδη του *Lactobacillus* (*L. fructivorans*, *L. brevis*) και μερικά είδη *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *B. mesentericus*). (Silliker, 1980; Vanderzant & Splittstoesser, 1992; Smittle & Flowers, 1982).

Κανονικά, το μέγεθος του πληθυσμού τους δεν θα έπρεπε να ξεπερνούν τα 10 cfu/g. Εάν έχει εισαχθεί κάποιος παθογόνος μικροοργανισμός (π.χ., *Salmonella* spp. μέσω των αυγών), αναμένεται να αποβιώσει γρήγορα. Η επιβίωση τους διευκολύνεται σε προϊόντα με χαμηλές θερμίδες και υψηλό pH που διατηρούνται σε θερμοκρασία ψύξης.

Το μικροβιακό φορτίο ενός τροφίμου προκύπτει από τους μικροοργανισμούς που εισέρχονται από διάφορες πηγές, καθώς και από την ανάπτυξη των επιμολύνσεων. Είναι φυσιολογικό ένα τρόφιμο που παράγεται υπό κατάλληλες συνθήκες υγιεινής και συντηρείται σωστά, να έχει και χαμηλότερο μικροβιακό φορτίο. Η απλή μικροβιακή παρουσία δεν μειώνει την ποιότητα των τροφίμων, εκτός από την περίπτωση ορισμένων παθογόνων. Για την υποβάθμιση της ποιότητας ενός τροφίμου απαιτείται η ανάπτυξη αποικιών ικανού μεγέθους ή ο πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών.

1.1.3. Αλλοίωση στη μαγιονέζα και στη βάση σαλάτας.

Συνήθως αυτά τα προϊόντα περιέχουν κάποιες μούχλες, ζύμες, σπόρια των μικροοργανισμών *Bacillus* και *Clostridium*, καθώς και οξυανθεκτικά βακτήρια όπως *Lactobacillus*. Τα οξυευαίσθητα βακτήρια δεν μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα, λόγω του χαμηλού pH.

Η μαγιονέζα, που περιέχει 65% ή περισσότερο βρώσιμο έλαιο και 0.5% οξικό οξύ, έχει μια ενεργότητα νερού περίπου 0.92 και pH 3.6-4.0. Ενώ η βάση σαλάτας περιέχει 30% ή περισσότερο βρώσιμο έλαιο και 0.9-1.2% οξικό οξύ, έχει a_w 0.92 και pH 3.2-3.9.

Οι κυριότεροι παράγοντες που ελέγχουν την ανάπτυξη των μικροβίων είναι το αδιάστατο οξικό οξύ, το χαμηλό pH και η σχετικά χαμηλή ενεργότητα νερού. Ωστόσο, ορισμένοι οξυανθεκτικοί μικροοργανισμοί μπορεί να αυξηθούν και να προκαλέσουν αλλοίωση.

Οι βάσεις σαλάτας με χαμηλό θερμιδικό δείκτη, στις οποίες προστίθενται το έλαιο και το οξικό οξύ σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις, έχουν υψηλές τιμές pH και a_w . Έτσι, πολλοί είναι οι μικροοργανισμοί που μπορούν να αναπτυχθούν σε αυτά τα προϊόντα. Συνεπώς προκειμένου να ενισχυθεί η διάρκεια ζωής και η ασφάλεια τους, συνιστάται η αποθήκευσή τους υπό ψύξη (Vanderzant & Splittstoesser, 1992; Smittle & Flowers, 1982; Bean *et al.*, 1990).

1.2. Σαλμονέλωση

1.2.1. Εισαγωγή

Οι τροφικές λοιμώξεις προκαλούνται από την κατανάλωση μολυσμένης τροφής (και νερού) με παθογόνα βακτήρια. Μία πολύ σημαντική τροφιμογενής λοίμωξη είναι η σαλμονέλωση που προκαλείται από την *Salmonella enterica*.

Πριν από τη δεκαετία του 1940, η *S. typhi* και *S. paratyphi* ήταν οι κύριες αιτίες της σαλμονέλωσης σε όλο τον κόσμο. Ωστόσο, με την παστερίωση του γάλακτος και με τη χλωρίωση του πόσιμου νερού, η εξάπλωση του τυφοειδούς και παρατυφοειδούς πυρετού μέσω των τροφίμων και του νερού μειώθηκε πολύ, τουλάχιστον στις ανεπτυγμένες χώρες. Μετά την ανάπτυξη αποτελεσματικών τεχνικών για την απομόνωση και την ταυτοποίηση των υπόλοιπων ορότυπων του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. από δείγματα τροφίμων και του περιβάλλοντος, έγινε εμφανές ότι η παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης της τροφιμογενής σαλμονέλωσης που προκαλείται από άλλους ορότυπους του παθογόνου *Salmonella* spp. είναι αρκετά υψηλή. Τη δεκαετία του 1950, αναγνωρίστηκε ότι η τροφιμογενής σαλμονέλωση υπήρξε η κύρια αιτία όλων των τροφιμογενών ασθενειών από παθογόνα βακτήρια και ιούς. Η τροφιμογενής σαλμονέλωση εξακολουθεί να είναι η κύρια αιτία των τροφιμογενών βακτηριακών και ιογενών ασθενειών στις Ηνωμένες Πολιτείες και άλλες ανεπτυγμένες χώρες, παρά το γεγονός ότι επί του παρόντος επιστημονικές πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με τους οικοτόπους, τον τρόπο μετάδοσης τους στα τρόφιμα, τα χαρακτηριστικά αύξησης και τις παραμέτρους επιβίωσης, και έχουν ακόμα αναπτυχθεί μέθοδοι για τον έλεγχο της τροφιμογενής μόλυνσης. Τα μέτρα ελέγχου φαίνεται να λειτουργούν για αρκετά άλλα τροφιμογενή παθογόνα στις Ηνωμένες Πολιτείες, όπως *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* και *Vibrio parahaemolyticus*. Επίσης, περιστατικά από τους παθογόνους *Staphylococcus aureus* και *Listeria monocytogenes* δείχνουν μείωση από το 1990. Το γεγονός αυτό είναι λίγο αινιγματικό διότι δεν υπάρχουν αποτελέσματα ακόμα για το παθογόνο *Salmonella* spp. Μεταξύ 1969 και 1976, ο μέσος αριθμός των καταγεγραμμένων κρουσμάτων τροφιμογενής

σαλμονέλωσης ήταν περίπου 37 ανά έτος στις Ηνωμένες Πολιτείες. Ενώ, μεταξύ των ετών 1983 και 1987, ο μέσος όρος αριθμός των κρουσμάτων ανά έτος ήταν πάνω από 68. Συνολικά έχουν προκύψει 16 εκατομμύρια ετήσιες περιπτώσεις τυφοειδούς πυρετού, 1.3 δισεκατομμύρια περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας και 3 εκατομμύρια θάνατοι παγκοσμίως εξαιτίας του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. (Bhunia, 2008). Είναι δύσκολο να επισημανθούν τα ακριβή αίτια της αύξησης θανάτων. Ίσως να σχετίζεται με το μεγάλο αριθμό των οροτύπων που πολύ συχνά βρίσκονται σε φορείς σε ζωοτροφές, πτηνά, κατοικίδια ζώα, έντομα και στον άνθρωπο, καθώς και την ικανότητά τους να αναπτύσσονται στα τρόφιμα. Επίσης, μπορεί να οφείλεται σε έλλειψη καλών συστημάτων επιτήρησης από τους ρυθμιστικούς οργανισμούς, τον τρόπο ζωής μας και στις διατροφικές συνήθειες, δίνοντας σε αυτά τα παθογόνα βακτήρια ένα πλεονέκτημα (Bean *et al.*, 1990; Tauxe, 1991; Andrews & Baumler, 2005).

Αναφέρεται ότι η σημερινή αύξηση της σαλμονέλωσης (συμπεριλαμβανομένης της τροφιμογενής σαλμονέλωσης) στις Ηνωμένες Πολιτείες θα μπορούσε να σχετίζεται με τέσσερις παράγοντες:

- (i) την αύξηση του αριθμού των ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου *Salmonella* spp. στα αντιμικροβιακά που έχουν απομονωθεί,
- (ii) την αύξηση σε άτομα με ανοσοανεπάρκεια που είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στο παθογόνο *Salmonella* spp.,
- (iii) την αύξηση στην μόλυνση του παθογόνου *Salmonella* Enteritidis που σχετίζεται με το αυγό, λόγω της αύξησης των ορνίθων ωοπαραγωγής με μολυσμένες ωοθήκες και
- (iv) την παραγωγή τροφίμων σε κεντρικές εγκαταστάσεις που μπορεί να οδηγήσουν σε εξαιρετικά μεγάλα και ευρεία κρούσματα σε περίπτωση μόλυνσης. Είναι απαραίτητο να κατανοήσουμε τη σημασία αυτών των παραγόντων στην αύξηση της σαλμονέλωσης και να αναπτυχθούν διορθωτικά μέτρα για τον έλεγχο της συχνότητας εμφάνισής της (Tauxe, 1991).

1.2.2. Επικρατέστεροι ορότυποι που προκαλούν σαλμονέλωση

Υπάρχουν πάνω από 2000 ορότυποι του παθογόνου *Salmonella* spp., ικανοί να προκαλέσουν σαλμονέλωση στον άνθρωπο. Πρόσφατα, ένα καλύτερο σύστημα ονοματολογίας αναπτύχθηκε για να ομαδοποιήσει αυτούς τους ορότυπους σε μερικά είδη, αντί να θεωρηθεί το καθένα ως ξεχωριστό. Οι ορότυποι του παθογόνου *Salmonella* spp. βρέθηκε ότι έχουν υψηλό βαθμό συγγένειας στο DNA και αποτελούν μία ενιαία ομάδα υβριδοποίησης. Το γένος *Salmonella* έχει μόνο ένα είδος, το παθογόνο *Salmonella enterica* και έξι υποείδη (Πίνακας 1).

Το γένος *Salmonella* ομαδοποιείται με βάση την ευαισθησία του σε συγκεκριμένους τύπους βακτηριοφάγων (PT) και ορίζεται ως PT4, PT8, PT13, PT13a, PT23, DTI04 (ορότυπος) κ.α. Επίσης, μπορεί να ταξινομηθεί βάσει της προτίμησης του ξενιστή.

Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει ορότυπους με περιορισμένες επιλογές ξενιστή που προσβάλλουν μόνο τον άνθρωπο, όπως ο *S. typhi*. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει ορότυπους που προσαρμόζονται στον ξενιστή και συνδέονται με ένα είδος ξενιστή, αλλά μπορεί να προκαλέσει νόσο και σε ορότυπους άλλων ξενιστών, όπως ο *S. pullorum* στα πουλερικά. Η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τους υπόλοιπους ορότυπους. Συνήθως, οι παθογόνοι *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis και *Salmonella* Heidelberg είναι οι τρεις συνηθέστεροι ορότυποι που προσβάλλουν τον άνθρωπο κάθε χρόνο (Gray & Fedorka-Crey, 2002; Boyen *et al.*, 2008).

Μεταξύ των έξι υποειδών, το *Salmonella enterica* subsp. *enterica* περιλαμβάνει τους περισσότερους ορότυπους που συνδέονται συχνά με την τροφιμογενή σαλμονέλωση. Ωστόσο, οι ορότυποι *Salmonella* Typhimurium και *Salmonella* Enteritidis προκαλούν την ασθένεια σε υψηλότερες συχνότητες σε όλο τον κόσμο. Πολλά κατοικίδια ζώα και ζωοτροφές μπορεί να είναι φορείς του ορότυπου *Salmonella* Typhimurium, ενώ ο ορότυπος *Salmonella* Enteritidis μπορεί να μολύνει τις ωοθήκες των πουλερικών και να μεταδοθεί μέσω των αυγών. Αυξημένος αριθμός του ορότυπου *Salmonella* Enteritidis έχει επίσης απομονωθεί από έκπλυση σφαγίου κοτόπουλου με δείγματα που συλλέχθηκαν μεταξύ 2000 και 2005, όπου οι κυρίαρχοι τύποι βακτηριοφάγων είναι PT13 και PT8 (Altekruse *et al.*, 2006).

Η αυξημένη χρήση αντιβιοτικών στις ζωοτροφές οδήγησε σε ανάπτυξη οροτύπων του παθογόνου *S. enterica* με ανθεκτικά στελέχη. Ένας ορότυπος που έχει

προκαλέσει ανησυχία είναι ο ανθεκτικός στα αντιβιοτικά *Salmonella* Typhimurium με τύπο βακτηριοφάγου (DT)104. Τα στελέχη αυτά είναι ανθεκτικά σε πολλά αντιβιοτικά. Επιπλέον, ένα πολύ ανησυχητικό στέλεχος είναι το DT204, το οποίο είναι ανθεκτικό σε περίπου 9 αντιβιοτικά. Υπάρχει η υποψία ότι η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά μπορεί να μεταφερθεί μεταξύ των στελεχών ή των οροποικιλιών με διάφορες μεθόδους γενετικού ανασυνδυασμού, ειδικά κάτω από επιλεκτική αντιβιοτική καταπόνηση (Daly *et al.*, 2000). Η ανθεκτικότητα που παρουσιάζει το DT104 οφείλεται σε χρωμοσωμική ενσωμάτωση ενός μέρους γονιδιώματος που φέρει γονίδια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά (Andrews & Baumler, 2005).

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, η τροφιμογενής σαλμονέλωση από *S. enterica* έχει αυξηθεί σημαντικά και η συχνότητα των κρουσμάτων είναι τόσο υψηλή όσο αυτών από *Salmonella* Typhimurium. Επίσης, ο ορότυπος *S. enterica* PT4 και διάφοροι άλλοι τύποι προκαλούν σαλμονέλωση σε υψηλή συχνότητα. Ο τρόπος εκτροφής των πουλερικών καθώς επίσης η αυξημένη κατανάλωση τους θα μπορούσαν να εξηγήσουν το γεγονός της αυξημένης μολυσματικότητας.

Πίνακας 1: Τα έξι υποείδη του γένους *Salmonella*.

1.	<i>Salmonella enterica</i> subsp. ¹ <i>enterica</i>
2.	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i>
3α.	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
3β.	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>
4.	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>
5.	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>bongori</i>

¹: Η αντιστοιχία μεταξύ αυτού του συστήματος και του συστήματος του Kauffman είναι ως εξής: το υποείδος 1 αντιστοιχεί στο υπογένος I, το υποείδος 2 αντιστοιχεί στο υπογένος II, τα υποείδη 3α και 3β αντιστοιχούν στην υποκατηγορία III και στο *Arizona hinshawii*, το υποείδος 4 αντιστοιχεί στο υπογένος IV και το υποείδος 5 αποτελείται από έξι άτυπους ορότυπους από τα υπογένη II και IV.

1.2.3. Χαρακτηριστικά

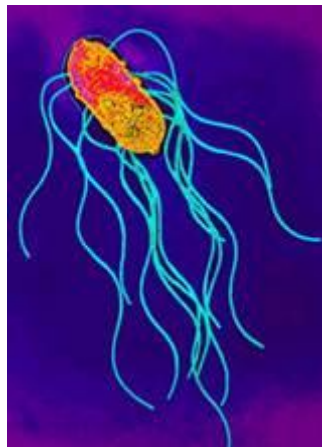
Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Salmonella* spp. είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο, αερόβιο ή προαιρετικά αναερόβιο, μη σποριογόνο, μαστιγοφόρο και ραβδοειδές, του οποίου το μέγεθος είναι 2-3 x 0.4-0.6 μm (Yousef & Carlstrom, 2003; Montville & Matthews, 2008) (Εικόνα 1).

Πρόκειται για μεσόφιλο μικροοργανισμό, του οποίου η θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται μεταξύ 35 και 37 °C, ωστόσο μπορεί να παρουσιάσει ανάπτυξη σε θερμοκρασίες από 5 έως 47 °C. Ορισμένοι μπορούν να αναπτυχθούν σε χαμηλές θερμοκρασίες από 2 έως 4 °C, αλλά και σε υψηλές όπως 54 °C (Gray & Fedorka-Cray, 2002). Επιπλέον, είναι θερμοευαίσθητος και θανατώνεται σε θερμοκρασία παστερίωσης (≥ 70 °C). Σε χαμηλό pH (pH < 4.5) παρουσιάζει ευαισθησία, ενώ αναπτύσσεται σε pH 4-9, με βέλτιστο pH ανάπτυξης να είναι γύρω στο 7 και χαμηλότερο pH ανάπτυξης από 4.05 (ρυθμισμένο με υδροχλωρικό και κιτρικό οξύ) έως 5.4 (ρυθμισμένο με οξικό οξύ). Τα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού απαιτούν υψηλή ενεργότητα νερού μεταξύ 0.99 έως 0.94, αλλά μπορεί να επιβιώσει σε $a_w < 0.2$ όπως στα ξηρά τρόφιμα, και να αναπτυχθεί σε άλμη πυκνότητας μέχρι 7 έως 8% NaCl. Η πλήρης παρεμπόδιση της ανάπτυξής του πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες < 7 °C, pH < 3.8 ή $a_w < 0.94$ (Hanes *et al.*, 2003; Bhunia, 2008).

Πρόκειται για οργανισμό με ικανότητα να μεταβολίζει την τροφή του, τόσο με την αναπνοή όσο και με τη ζύμωση. Αυξάνεται σε υποστρώματα που περιέχουν D-γλυκόζη, αλλά και άλλους υδατάνθρακες, τους οποίους καταβολίζει-ζυμώνει με την ταυτόχρονη παραγωγή αερίου. Γενικά, είναι αρνητικός στην δοκιμή της οξειδάσης, της ουρεάσης και της Voges-Proskauer και θετικός στην δοκιμή της καταλάσης, του μεθυλίου και της χρησιμοποίησης των κιτρικών αλάτων του Simmon (Holt, 1974). Ζυμώνει την δουλσιτόλη, αλλά όχι τη λακτόζη και χρησιμοποιεί το κιτρικό ως πηγή άνθρακα. Τέλος, παράγει υδρόθειο, αποκαρβοξυλική λυσίνη και ορνιθίνη, αλλά δεν παράγει ινδόλη (D'Aoust *et al.*, 1989; Anonymous, 1990; Ray & Sandine, 1992)

Τα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp μπορούν να επιβιώσουν υπό κατεψυγμένες και αποξηραμένες συνθήκες για μεγάλο χρονικό διάστημα, είναι ανθεκτικά και μπορούν να επιζήσουν ακόμη και όταν δεν υπάρχουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για το μεταβολισμό τους. Η ανθεκτικότητα του παθογόνου σε ορισμένες χρωστικές και χημικές ουσίες που αναστέλλουν την

ανάπτυξη άλλων βακτηρίων είναι πολύ σημαντική. Όπως σε όλα τα Gram-αρνητικά βακτήρια, το κυτταρικό του τοίχωμα περιέχει λιποπολυσακχαρίτες. Με την λύση των κυττάρων οι λιποπολυσακχαρίτες ελευθερώνονται και ενεργούν ως ενδοτοξίνες, οι οποίες αποτελούν το μηχανισμό παθογένειας του μικροοργανισμού (Holt *et al.*, 2000).



Εικόνα 1: Εικόνα του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella enterica*.

(Πηγή: http://www.nature.com/genomics/images/s_enterica.png)

1.2.4. Περιβάλλον

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Salmonella* spp. έχει ως φυσικό περιβάλλον το γαστρεντερικό σύστημα των οικόσιτων και άγριων ζώων, των πτηνών, των κατοικίδιων ζώων και των εντόμων. Μπορεί να προκαλέσει σαλμονέλωση στα ζώα και στα πτηνά και στη συνέχεια να παραμείνει σταθερός σε κατάσταση φορέα. Ο άνθρωπος μπορεί να αποτελέσει φορέα μετά από μόλυνση και να διατηρεί τον παθογόνο μικροοργανισμό για μεγάλο χρονικό διάστημα μέσω των κοπράνων. Επιπρόσθετα, ο παθογόνος μικροοργανισμός *Salmonella* spp. έχει απομονωθεί από το χώμα, το νερό και τις αποχετεύσεις που έχουν μολυνθεί με περιττώματα (D' Aoust *et al.*, 1989; Anonymous, 1990).

1.2.5. Παθογένεια και συμπτώματα

Η ανθρώπινη σαλμονέλωση είναι διαφορετική από τον τυφοειδή και παρατυφοειδή πυρετό που προκαλούνται από τους παθογόνους *S. typhi* και *S. paratyphi*, αντίστοιχα. Όλοι οι ορότυποι του παθογόνου θεωρούνται εν δυνάμει ανθρώπινοι παθογόνοι που μπορούν να προκαλέσουν σαλμονέλωση. Ωστόσο κάποιοι από αυτούς μολύνουν συγκεκριμένα μόνο τα ζώα και τα πτηνά. Η τροφιμογενής σαλμονέλωση χαρακτηρίζεται από γαστρεντερική διαταραχή που εκδηλώνεται κατά κύριο λόγο από διάρροια και κοιλιακές κράμπες. Η ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα για την αρχή της μόλυνσης είναι μικρότερη από 10^5 cfu/gr. Ωστόσο, η κατανάλωση μικρότερης ποσότητας κάποιων λοιμογόνων στελεχών είναι αρκετή για να προκληθεί η ασθένεια.

Γενικά, τα στελέχη που είναι ευαίσθητα στην οξύτητα του στομάχου, συνήθως χρειάζονται μεγαλύτερες αποικίες, προκειμένου να επιβιώσουν στο έντερο και να προκαλέσουν συμπτωματολογία. Αντίθετα, τα οξυανθεκτικά στελέχη μπορεί να χρειαστούν μικρότερες αποικίες για να προκαλέσουν την ασθένεια. Η μολυσματική δόση μειώνεται όταν το παθογόνο καταναλώνεται με τρόφιμα που εξουδετερώνουν την οξύτητα του στομάχου, όπως το γάλα, το τυρί, κ.α.. Η εξέλιξη της ασθένειας εξαρτάται επίσης από την φυσιολογική κατάσταση του ξενιστή. Τα ηλικιωμένα άτομα με υψηλό γαστρικό pH είναι ευάλωτα στη σαλμονέλωση.

Μετά την κατάποση, το παθογόνο αποικίζει το λεπτό και το παχύ έντερο. Έχει αναφερθεί ότι οι περισσότερες παθολογικές βλάβες βρίσκονται στο παχύ έντερο παρά στο λεπτό. Ο οργανισμός προσκολλάται στα κύτταρα του βλεννογόνου χρησιμοποιώντας μαστίγια ή άλλους παράγοντες προσκόλλησης, και στη συνέχεια εισβάλλει ενεργά στα κύτταρα του βλεννογόνου. Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Salmonella* spp. πολλαπλασιάζεται στο εσωτερικό των επιθηλιακών κυττάρων και των μακροφάγων και τελικά λύει τα κύτταρα. Αποτέλεσμα, είναι η δημιουργία φλεγμονής και σοβαρού οιδήματος στο σημείο της λοίμωξης η οποία οδηγεί σε βλάβη του βλεννογόνου. Τα φλεγμονώδη κύτταρα όπως τα ουδετερόφιλα, τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, κ.α. απελευθερώνουν προσταγλανδίνες. Οι τελευταίες αυξάνουν τα επίπεδα της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) στα κύτταρα του βλεννογόνου, αναστέλλοντας έτσι την πρόσληψη ιόντων Na^+ και απελευθερώνει ιόντα Cl^- . Η ανισορροπία των ηλεκτρολυτών διευκολύνει την απώλεια

υγρών με αποτέλεσμα τη διάρροια. Ο κυτταροτοξικός παράγοντας που παράγεται από τον παθογόνο μικροοργανισμό *Salmonella* spp. πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνος για τη φλεγμονή και τη βλάβη του ιστού με αποτέλεσμα την απώλεια υγρών και ηλεκτρολυτών. Η παραγωγή της εντεροτοξίνης σχετίζεται άμεσα με το ρυθμό αύξησης του παθογόνου.

Τα συμπτώματα εμφανίζονται μέσα σε 8 έως 42 ώρες, συνηθέστερα μεταξύ 24^{ης} με 36^{ης}. Έχουν διάρκεια περίπου 2 με 3 ημέρες, αλλά σε ορισμένα άτομα μπορεί να παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ένα προσβεβλημένο άτομο βρίσκεται σε κατάσταση φορέα αρκετούς μήνες μετά την ανάρρωση.

Τα συμπτώματα και η ένταση της μόλυνσης ποικίλλει (στα άτομα) παρόλο που μπορεί να έχει προκληθεί από το ίδιο τρόφιμο. Η κατάσταση της υγείας και η φυσική κατάσταση του ατόμου διαφοροποιεί τα συμπτώματα. Σε γενικές γραμμές, όμως προκαλούνται κοιλιακές κράμπες, διάρροια, ναυτία, έμετος, ρίγη, πυρετός και κατάπτωση. Η σαλμονέλωση μπορεί να αποβεί μοιραία, ειδικά για τις ευπαθείς ομάδες (άρρωστοι, βρέφη και ηλικιωμένοι) (Andrews & Baumler, 2005; D' Aoust *et al.*, 1989).

Η μοριακή και γενετική βάση για την προσκόλληση και εισβολή του βακτηρίου *Salmonella* spp. εντός των κυττάρων των ξενιστών και εν γένει η παθογένειά της είναι και σύνθετη και ξεχωριστή. Τουλάχιστον 60 γονίδια είναι υπεύθυνα για τη λοιμοτοξικότητα του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού (Groisman & Ochman, 1997).

1.2.6. Συσχετισμός με τα τρόφιμα

Οι τροφές ζωικής προέλευσης, δηλαδή το βόειο κρέας, το κοτόπουλο, τη γαλοπούλα, το χοιρινό κρέας, τα αυγά, το γάλα και τα προϊόντα που παράγονται από αυτά, έχουν συσχετισθεί με μεγάλο αριθμό κρουσμάτων. Επιπλέον, πολλοί διαφορετικοί τύποι των τροφίμων έχουν εμπλακεί τόσο σε σποραδικές περιπτώσεις όσο και σε επιδημίες (**Πίνακας 2.**). Αυτά τα τρόφιμα είχαν μολυνθεί άμεσα ή έμμεσα με περιττώματα από τους φορείς (ζώα, πουλιά και ανθρώπους) και είτε καταναλώθηκαν ωμά ή μαγειρεμένα λάθος, είτε μολύνθηκαν έπειτα από ανεπαρκή

θερμική επεξεργασία, επιτρέποντας στον παθογόνο να επιζήσει. Η διασταυρούμενη επιμόλυνση στο σπίτι και στα καταστήματα τροφίμων αποτελεί το κύριο σημείο της μόλυνσης των θερμαινόμενων τροφίμων με τον παθογόνο μικροοργανισμό *Salmonella* spp. Τα τελευταία χρόνια ο παθογόνος έχει επίσης απομονωθεί από πολλά τρόφιμα φυτικής προέλευσης, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά (λόγω της χρήσης λυμάτων ως λίπασμα ή το πλύσιμο των προϊόντων με μολυσμένο νερό), καθώς και από θαλασσινά, όπως ψάρια που συγκομίζονται από μολυσμένο νερό. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η επιμόλυνση μπορεί να συμβεί σε πολλαπλά στάδια της τροφικής αλυσίδας (Bean *et al.*, 1990; Tauxe, 1991; Bouchrif *et al.*, 2009).

Μολονότι υπάρχουν πάνω από 2000 ορότυποι του παθογόνου *Salmonella* spp., μόνο ένας μικρός αριθμός από αυτούς έχουν συσχετιστεί με τροφιμογενείς ασθένειες. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην γεωγραφική κατανομή των ορότυπων καθώς και την παθογένεια ενός ορότυπου ή ενός στελέχους. Ο άνθρωπος μολύνεται με τροφή ή νερό που έχει μολυνθεί από τον παθογόνο *Salmonella* spp. μέσω των ζώων-φορέων. Ωστόσο, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί *S. typhi* και *S. paratyphi A*, δεν έχουν ζώα-φορείς, άρα η λοίμωξη μπορεί να προκύψει με την κατανάλωση τροφίμων κακώς μεταχειρισμένων (Newell *et al.*, 2010). Ο παθογόνος *Salmonella* Typhimurium έχει συνδεθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες ως ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας της τροφιμογενούς σαλμονέλλωσης (πάνω από το 20% του συνόλου των περιπτώσεων). Ωστόσο, από τη δεκαετία του 1980, η τροφιμογενής σαλμονέλλωση από *Salmonella* Enteritidis έχει αυξηθεί, κυρίως λόγω μολυσμένων αυγών και έχει εμπλακεί στον ίδιο αριθμό περιπτώσεων με τον παθογόνο *Salmonella* Typhimurium. Η ακριβής αιτία της επικράτησης του παθογόνου *Salmonella* Enteritidis δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκτροφή ζώων και πτηνών, καθώς και για την επεξεργασία των τροφίμων ζωικής προέλευσης ότι παίζουν σημαντικό ρόλο, αλλά το βακτήριο *Salmonella* spp. μπορεί να εισέλθει σε οποιοδήποτε σημείο στην τροφική αλυσίδα (Wong *et al.*, 2002).

Πίνακας 2.: Τρόφιμα που έχουν συνδεθεί με κρούσματα σαλμονέλωσης στις Ηνωμένες Πολιτείες μεταξύ 1973 και 1987.

Τρόφιμο	Αριθμός κρουσμάτων
Βόειο κρέας	77
Κοτόπουλο	30
Γαλοπούλα	36
Χοιρινό	25
Αυγά	16
Γαλακτοκομικά προϊόντα	50
Ψάρια και οστρακοειδή	8
Προϊόντα αρτοποιίας	12
Φρούτα και λαχανικά	9
Ποτά	4
Κινέζικο φαγητό	2
Μεξικάνικο φαγητό	10
Άλλα τρόφιμα	191
Άγνωστο	320

1.2.7. Πρόληψη και έλεγχος

Οι ωμές τροφές ζωικής προέλευσης που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία πριν από την κατανάλωση μπορεί να έχουν μολυνθεί με τον παθογόνο μικροοργανισμό *Salmonella* spp. Ωστόσο, στις Ηνωμένες Πολιτείες (και σε άλλες ανεπτυγμένες χώρες), σύμφωνα με τις ρυθμιστικές απαιτήσεις, τα θερμικώς επεξεργασμένα και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, που περιέχουν τον παθογόνο *Salmonella* spp. θεωρούνται νοθευμένα και απαγορεύεται να πωληθούν. Πολλές βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων έχουν δημιουργήσει προγράμματα επιτήρησης ειδικά για τον έλεγχο της παρουσίας του παθογόνου *Salmonella* spp. στα προϊόντα τους, καθώς επίσης και για διάφορους άλλους παθογόνους. Επιπλέον, οι ρυθμιστικοί οργανισμοί έχουν προγράμματα για την εκπαίδευση των καταναλωτών στο σπίτι και των χειριστών τροφίμων σε χώρους μαζικής εστίασης, με σκοπό να ελέγξουν τον παθογόνο *Salmonella* spp. στα τρόφιμα. Μερικά από τα μέτρα περιλαμβάνουν το

σωστό μαγείρεμα των τροφών (τουλάχιστον σε θερμοκρασία και χρόνο παστερίωσης, δηλαδή 71.7 °C για 15 s) και την έγκαιρη ψύξη (3-4 °C ή κατάψυξη, εάν δεν χρησιμοποιηθεί μέσα σε 2 ώρες). Η πρόληψη της διασταυρούμενης μόλυνσης των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων με ωμά τρόφιμα μέσω σανίδων κοπής, εξοπλισμού, σκευών και χεριών επιτυγχάνεται μέσω της κατάλληλης εξυγίανσης και της προσωπικής υγιεινής, μέσω της αποφυγής χειρισμού ενός τροφίμου από κάποιο άρρωστο άτομο και τέλος μέσω της σωστής αναθέρμανσης ενός τροφίμου που είναι κατεψυγμένο για μεγάλο χρονικό διάστημα (D'Aoust *et al.*, 1989; Anonymous, 1990).

1.2.8. Επιβίωση του παθογόνου *Salmonella* spp. υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης

Τα περισσότερα τροφιμογενή παθογόνα (ιδιαίτερα τα εντερικά) και τα βακτήρια που προκαλούν αλλοιώσεις (κυρίως τα Gram-αρνητικά) είναι ευαίσθητα σε χαμηλό pH και πεθαίνουν γρήγορα σε τρόφιμα υψηλής οξύτητας ($\text{pH} \leq 4.5$) κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Επίσης, σε χαμηλό pH, τα κανονικά κύτταρα είναι ευαίσθητα σε πολύ χαμηλότερο επίπεδο άλλων αντιμικροβιακών μεταχειρίσεων (όπως υδροστατική πίεση, θερμοκρασία παστερίωσης ή συντηρητικά). Ωστόσο, εάν τα κύτταρα είναι αρχικά προσαρμοσμένα σε όξινες συνθήκες, γίνονται σχετικώς ανθεκτικά σε χαμηλότερο pH και σε ελάχιστα επίπεδα άλλων μεταχειρίσεων και μπορεί να επιβιώσουν στα τρόφιμα. Πρόσφατη εμφάνιση τροφιμογενών ασθενειών από την κατανάλωση χυμών φρούτων, αλλαντικών και όξινων τροφίμων που περιείχαν τους παθογόνους μικροοργανισμούς *Salmonella* spp., *E. coli* 0157:H7 και *L. monocytogenes* πιστεύεται ότι οφείλεται σε προσαρμοσμένα σε όξινες συνθήκες παθογόνα στελέχη που μπόρεσαν να επιβιώσουν σε χαμηλό pH και σε χαμηλή θερμική επεξεργασία.

Για να ξεπεραστεί ο κίνδυνος, είναι απαραίτητο να αποφεύγεται η έκθεση του τροφίμου (που περιέχει τα κύτταρα-στόχος) σε ήπιες μεταχειρίσεις. Αντ' αυτού, αρκετές ήπιες μεταχειρίσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα για να καταστρέψουν τα παθογόνα στελέχη (τεχνολογία εμποδίων).

Όλοι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί έρχονται αντιμέτωποι με διάφορα οργανικά και ανόργανα οξέα στα τρόφιμα ή στο γαστρεντερικό σύστημα και τα κύτταρα του ξενιστή. Αυτά τα οξέα έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση των μικροοργανισμών. Η όξινη αυτή καταπόνηση προκαλεί διάφορες μεταβολές στη δομή και στις λειτουργίες των κυττάρων όπως για παράδειγμα αλλαγή στη σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης, αύξηση της ροής των πρωτονίων και του καταβολισμού των αμινοξέων, παραγωγή DNA-διορθωτικών ενζύμων κ.α. Η αντίδραση αυτή των μικροοργανισμών στην όξινη καταπόνηση είναι ένα φαινόμενο κατά το οποίο η έκθεση σε μετρίως χαμηλά pH αυξάνει την σύνθεση των πρωτεϊνών που βοηθούν την επιβίωση των μικροοργανισμών σε πολύ υψηλές οξύτητες (Yousef & Courtney, 2003). Η αντίδραση σε όξινη καταπόνηση διαφέρει μεταξύ των κυττάρων που βρίσκονται στην εκθετική και στην στατική φάση αλλά και μεταξύ των διαφόρων ειδών βακτηρίων.

Η ομοιότητα του εσωτερικού pH του κυττάρου του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. όταν αυτός εκτίθεται σε ακραία όξινες τιμές pH, διατηρείται όταν ο μικροοργανισμός έχει προηγουμένως υποστεί ήπια όξινη καταπόνηση. Αυτό επιτρέπει τη σύνθεση εκ μέρους του βακτηριακού κυττάρου πρωτεϊνών όξινης καταπόνηση όταν αυτό βρεθεί αργότερα σε πολύ χαμηλές τιμές pH περιβάλλοντος. Αυτό θα ήταν ανέφικτο σε κύτταρα που δεν θα είχαν υποστεί αυτή την αρχική προσαρμογή και θα εκτίθονταν απευθείας σε ακραία όξινες τιμές pH. Ένα από τα συστήματα που συμβάλλουν στη διατήρηση της ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού σε συνθήκες όξινης καταπόνησης είναι το σύστημα αποκαρβοξυλάσης της λυσίνης το οποίο λειτουργεί σε συνδυασμό με ένα μεταφορέα λυσίνη:καδαβερίνης (CadB) (Park *et al.*, 1996).

Ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp. μπορεί να επιζήσει πολλών διαφορετικών συνθηκών όξινης καταπόνησης, αφού η επιβίωσή του εξαρτάται ανάλογα με ποια αμινοξέα είναι διαθέσιμα στο περιβάλλον ανάπτυξης του (λυσίνη, ορνιθίνη, αργινίνη) οπότε και θέτει σε «λειτουργία» το αντίστοιχο σύστημα επαγωγής οξυανθεκτικότητας.

Έχουν αναγνωριστεί τρεις ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι RpoS, Fur και PhoP, οι οποίες ελέγχουν διάφορα συστήματα ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση και προκαλούν την έκφραση μιας ομάδας πρωτεϊνών σε αυτές τις συνθήκες. Ακόμη και ο παράγοντας σίγμα, σS , που κωδικοποιείται από το *rpoS* ρυθμίζει ένα μέρος της οξυανθεκτικότητας του παθογόνου *Salmonella* spp. και αποτελεί επίσης ένα κρίσιμο

ρυθμιστή της φυσιολογίας του κυττάρου κατά την στατική φάση της ανάπτυξης, αλλά έχει αποδειχτεί η χρησιμότητά του και κατά την εκθετική φάση (Hengge-Aronis, 1996). Οι μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ανωτέρω ρυθμιστικές πρωτεΐνες οδηγούν σε πιθανή μείωση της ανθεκτικότητας του κυττάρου σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, έτσι αποδεικνύεται ο σπουδαίος ρόλος που επιτελούν σε αυτόν τον τομέα.

1.3. Βασικά χαρακτηριστικά των σαλατών τύπου- deli που επηρεάζουν την επιβίωση του παθογόνου

Salmonella spp.

Η ικανότητα των μικροοργανισμών (εκτός των ιών) να αυξάνονται και να πολλαπλασιάζονται στο τρόφιμο καθορίζεται από το περιβάλλον του τροφίμου, καθώς και από το περιβάλλον στο οποίο αυτό αποθηκεύεται. Έτσι, έχουμε τον αντίστοιχο χαρακτηρισμό ως εσωτερικό και εξωτερικό περιβάλλον. Δεν είναι δυνατή η μελέτη της επίδρασης κάθε αυξητικού παράγοντα ξεχωριστά, καθώς είναι αλληλένδετοι. Αντιθέτως, η επίδραση του κάθε παράγοντα στα διαφορετικά επίπεδα της αύξησης συγκρίνεται κρατώντας τους υπόλοιπους σταθερούς. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, σε κάθε τρόφιμο οι παράγοντες ασκούν συνδυαστική επίδραση στην μικροβιακή ανάπτυξη, είτε θετική είτε αρνητική.

Η μικροβιακή σταθερότητα και ασφάλεια των περισσότερων τροφίμων βασίζεται σε ένα συνδυασμό διαφόρων παραγόντων (εμπόδια), οι οποίοι θα πρέπει να παρεμποδίζουν τους μικροοργανισμούς που εμφανίζονται στο τρόφιμο. Ο ρόλος των εμποδίων αυτών θεωρείται θεμελιώδους σημασίας για την συντήρηση των τροφίμων, καθώς η παρουσία τους σε ένα σταθερό προϊόν μπορεί να ελέγχει την μικροβιακή μόλυνσή του (Leistner *et al.*, 1978 & 1981).

Η θεωρία των εμποδίων που παρουσιάστηκε από τον Leistner (1978), θεωρείται σήμερα ως μία προσιτή προσέγγιση στο θέμα της συντήρησης. Σύμφωνα με την θεωρία αυτή, ως «εμπόδια» χαρακτηρίζονται ουσίες ή μεταχειρίσεις που παρεμποδίζουν τις διαδικασίες αλλοίωσης και ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών. Κάθε μικροοργανισμός, για να μπορέσει να αναπτυχθεί, πρέπει να τα ξεπεράσει. Εντούτοις, σε πολλές περιπτώσεις, η παρεμπόδιση της ανάπτυξης/επιβίωσης των μικροοργανισμών μέσω των εμποδίων και η διατήρηση της ποιότητας του τροφίμου είναι δράσεις αντίθετες. Επομένως, για την διατήρηση της επιθυμητής ποιότητας του τροφίμου, το «ύψος» των εμποδίων πρέπει να διατηρείται σε όσο το δυνατόν χαμηλότερα επίπεδα π.χ. συνδυάζοντας διαφορετικά εμπόδια (Boch-Sorensen *et al.*, 1994; Νυχάς, 2005).

Οι παράγοντες–εμπόδια διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

I. Ενδογενείς:

- ✓ Θρεπτικά συστατικά
- ✓ pH
- ✓ Ενεργότητα νερού (a_w)
- ✓ Δυναμικό οξειδοαναγωγής (Eh)
- ✓ Αντιμικροβιακές ουσίες (συντηρητικά)

II. Εξωγενείς:

- ✓ Θερμοκρασία
- ✓ Συσκευασία
- ✓ Σχετική υγρασία
- ✓ Μικροβιακή αλληλεπίδραση

III. Συνδυασμός τους

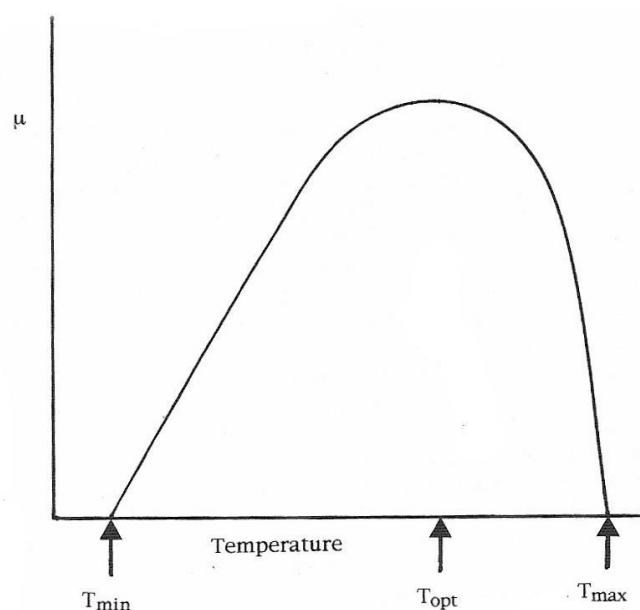
Στις βιομηχανίες τροφίμων, η εφαρμογή της θεωρίας των εμποδίων λαμβάνει χώρα τόσο κατά το σχεδιασμό του προϊόντος όσο και στην μετέπειτα επεξεργασία του, δηλαδή με χαμηλό pH ή a_w , προσθήκη συντηρητικών και NaCl, θερμική επεξεργασία μετά την παραγωγή (αποστείρωση, παστερίωση, λεύκανση), αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες (ψύξη, κατάψυξη), ακτινοβολήση, συσκευασία σε κενό ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα κ.ά.

Το χαμηλό pH εμφανίζεται ως ο σημαντικότερος παράγοντας–εμπόδιο για την διασφάλιση της εγγενούς, μικροβιακής σταθερότητας των σαλατών τύπου-deli. Σημαντικότατο επίσης ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης των προϊόντων αλλά και η παρουσία NaCl και συντηρητικών (π.χ., σορβικό κάλιο και βενζοϊκό νάτριο). Παρακάτω γίνεται περαιτέρω ανάλυση των παραγόντων που εξετάστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη.

1.3.1. Θερμοκρασία συντήρησης

Οι σαλάτες τύπου-deli είναι προϊόντα που χαρακτηρίζονται από την ιδιαίτερα ευαλλοίωτη φύση τους (Brocklehurst, 1992). Για το λόγο αυτό, η εφαρμογή θερμοκρασιών ψύξης (0–5 °C) κρίνεται αναγκαία κατά την συντήρησή τους. Οι χαμηλές θερμοκρασίες ασκούν μια εκλεκτική επίδραση, η οποία αποτρέπει την αύξηση των μεσόφιλων μικροοργανισμών ($T_{min}=5-15$ °C) και που ευνοεί στην επικράτηση των ψυχρότροφων ($T_{min}=-5-+5$ °C) (Adams & Moss, 1995).

Στην **Εικόνα 2** φαίνεται ότι η απόκλιση της θερμοκρασίας αποκλίνει από την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού προκαλεί μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του. Αυτό οφείλεται, εν μέρει, στην επιβράδυνση των ενζυμικών αντιδράσεων εντός του κυττάρου, λόγω των δομικών αλλαγών που υφίσταται η κυτταρική μεμβράνη. Αποτέλεσμα αυτών των αλλαγών είναι η μειωμένη πρόσληψη και παροχή θρεπτικών συστατικών προς το ενζυμικό σύστημα. Έχει παρατηρηθεί, ωστόσο, ότι πολλοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, αυξάνοντας το ποσοστό των ακόρεστων λιπαρών οξέων στα λιπίδια της μεμβράνης και ότι οι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί, γενικά, διαθέτουν υψηλότερα επίπεδα ακόρεστων λιπαρών οξέων σε σχέση με τους μεσόφιλους. Η μείωση του βαθμού κορεσμού ενός λιπαρού οξέος, μειώνει το σημείο τήξεώς του έτσι οι μεμβράνες που περιέχουν υψηλά ποσοστά ακόρεστων λιπαρών, παραμένουν ρευστές με αποτέλεσμα να είναι λειτουργικές σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Adams & Moss, 1995).



Εικόνα 2: Επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών. (Adams & Moss, 1995)

1.3.2. Το pH

1.3.2.1. Ορισμός

Ως pH ορίζεται η συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου σε ένα σύστημα και εκφράζεται σαν $-\log[H^+]$, δηλαδή ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου στο σύστημα. Το pH κυμαίνεται από 0 έως 14, με το 7.0 να είναι το ουδέτερο. Η συγκέντρωση $[H^+]$ μπορεί να διαφέρει σε ένα σύστημα, ανάλογα με την παρουσία του οξέος. Μερικά ισχυρά οξέα που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα, όπως το HCl και το φωσφορικό οξύ, είναι πλήρως δισταμένα. Τα ασθενή οξέα, όπως το οξικό ή το γαλακτικό οξύ, παραμένουν σε ισορροπία με τις δισταμένες και αδιάστατες μορφές τους:

$[\text{HCl}] \rightarrow [\text{H}^+] + [\text{Cl}^-]$, το pH του 0.1 N HCl είναι 1.1

$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow [\text{H}^+] + [\text{CH}_3\text{COO}^-]$, το pH του 0.1 N CH_3COOH είναι 2.9

Η οξύτητα είναι αντιστρόφως ανάλογη με το pH, δηλαδή ένα σύστημα με υψηλή οξύτητα έχει χαμηλό pH και αντιστρόφως (Baird-Parker *et al.*, 1980; Silliker, 1980).

1.3.2.2. Το pH των τροφίμων

Ανάλογα με τον τύπο του τροφίμου, το pH μπορεί να ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό. Βάσει του pH, τα τρόφιμα μπορούν να ομαδοποιηθούν στα τρόφιμα υψηλής οξύτητας (με pH μικρότερο από 4.6) και στα τρόφιμα χαμηλής οξύτητας (με pH 4.6 και πάνω). Τα περισσότερα φρούτα, χυμοί φρούτων, ζυμωμένα τρόφιμα (από τα φρούτα, τα λαχανικά, το κρέας και το γάλα) και οι βάσεις σαλάτας αποτελούν τρόφιμα υψηλής οξύτητας (με χαμηλό pH), ενώ τα περισσότερα λαχανικά, κρέας, ψάρι, γάλα και σούπες ανήκουν στα τρόφιμα χαμηλής οξύτητας (με υψηλό pH). Το υψηλότερο όριο του pH για τα περισσότερα τρόφιμα χαμηλής οξύτητας παραμένει μικρότερο του 7.0. Παρομοίως, το όριο του χαμηλού pH των περισσότερων τροφών με υψηλή περιεκτικότητα οξέων παραμένει πάνω από 3.0. Τα τρόφιμα μπορούν να περιέχουν οξέα φυσικά (φρούτα), μέσω ζύμωσης ή τεχνητά (βάσεις σαλάτας) (Boch-Sorensen *et al.*, 1994).

1.3.2.3. Το pH και η μικροβιακή αύξηση

Η οξύτητα ή η αλκαλικότητα ενός περιβάλλοντος έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την δράση και την σταθερότητα των μακρομορίων, όπως είναι τα ένζυμα. Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών έχει άμεση σχέση με τις τιμές του pH του περιβάλλοντός τους (Adams & Moss, 1995). Κάθε είδος μικροοργανισμού έχει ένα εύρος pH και ένα βέλτιστο pH για την ανάπτυξή του.

Σε γενικές γραμμές, οι μύκητες και οι ζύμες είναι σε θέση να αναπτυχθούν σε χαμηλότερο pH σε σχέση με τα βακτήρια. Τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι περισσότερο ευαίσθητα στο χαμηλό pH από ό,τι είναι τα Gram-θετικά βακτήρια. Το εύρος του pH της ανάπτυξης για τις μούχλες είναι 1.5-9.0, για τις ζύμες 2.0-8.5, για τα Gram-θετικά βακτήρια 4.0-8.5 και για τα Gram-αρνητικά βακτήρια 4.5-9.0. Το κατώτερο όριο του pH ανάπτυξης ενός είδους μικροοργανισμού μπορεί να είναι λίγο υψηλότερο, εάν το pH ρυθμίζεται με ισχυρό οξύ αντί με ένα ασθενές εξαιτίας των αδιάστατων μορίων. Τα οξυανθεκτικά στελέχη ενός είδους μικροοργανισμού μπορούν να αποκτήσουν αντίσταση σε χαμηλότερο pH σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη του (π.χ., οξυανθεκτικά στελέχη του παθογόνου *Salmonella* spp.).

Όταν το pH σε ένα τρόφιμο μειώνεται κάτω από το κατώτερο όριο ανάπτυξης ενός μικροβιακού είδους, τα κύτταρα του όχι μόνο σταματούν να αυξάνονται, αλλά χάνουν ακόμα και τη βιωσιμότητά τους ανάλογα με τον βαθμό μείωσης του pH. Αυτό γίνεται πιο εμφανές με ασθενή οξέα, ειδικά με εκείνα που έχουν υψηλότερη σταθερά διαστάσεως (pK_a), όπως το οξικό οξύ εναντίον του γαλακτικού οξέως (με τιμές pK_a 4.8 και 3.8 αντίστοιχα). Αυτό συμβαίνει λόγω των αδιάστατων μορίων (στο ίδιο pH, το οξικό οξύ έχει περισσότερα αδιάστατα μόρια από ό,τι έχει το γαλακτικό οξύ). Τα αδιάστατα μόρια, όντας λιπόφιλα, εισάγονται στο κύτταρο και διασπώνται για να δημιουργήσουν H^+ στο κυτταρόπλασμα. Έτσι προκαλείται μία μείωση στο εσωτερικό pH, το οποίο καταστρέφει τελικά την βαθμίδωση των πρωτονίων μεταξύ του εσωτερικού και εξωτερικού τμήματος των κυττάρων και εξαφανίζει την κινητήρια δύναμη των πρωτονίων καθώς επίσης και την ικανότητα των κυττάρων να παράγουν ενέργεια.

Οι πληροφορίες σχετικά με την επίδραση του pH επί της ανάπτυξης και της βιωσιμότητας των μικροβιακών κυττάρων είναι σημαντικές για να αναπτυχθούν μέθοδοι για την πρόληψη της ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών σε τρόφιμα (π.χ., σε όξινα τρόφιμα), για να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μερικών ζυμώμενων τροφίμων (π.χ., διαδοχική αύξηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε λάχανο τουρσί) και για την επιλεκτική απομόνωση οξυανθεκτικών μικροοργανισμών από τα τρόφιμα (π.χ., ζύμες και μούχλες σε ένα μέσο με pH 3.5) (Baird-Parker *et al.*, 1980; Silliker, 1980). Προβλήματα στον έλεγχο τροφίμων με χαμηλό pH, μπορούν να προκληθούν από επίκτητη οξυανθεκτικότητα παθογόνων και βακτηρίων. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ασθενή οργανικά οξέα, καθώς έχει αποδειχθεί ότι, παράλληλα με την ιδιότητά τους να μειώνουν το pH, έχουν

μεγαλύτερη αντιμικροβιακή ικανότητα σε σχέση με τα ισχυρά οξέα (Adams & Moss, 1995).

Πολλές βασικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η σύνθεση ATP στα βακτήρια και η ενεργητική μεταφορά θρεπτικών συστατικών, λαμβάνουν χώρα στην κυτταρική μεμβράνη και εξαρτώνται από την δυναμική ενέργεια που είναι αποθηκευμένη στην μεμβράνη υπό μορφή μιας κινητήριας δύναμης πρωτονίων. Η δύναμη αυτή είναι ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό που παράγεται κατά την ενεργητική μεταφορά πρωτονίων από το εσωτερικό του κυττάρου στο περιβάλλον. Όπως τα πρωτόνια έτσι και άλλα φορτισμένα, μη διασπώμενα, όξινα μόρια μπορούν εύκολα να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη. Έχουν την ικανότητα να περνούν από ένα χαμηλό pH, εξωτερικό περιβάλλον, όπου ευνοούνται από την ισορροπία, στο υψηλό pH του κυτταροπλάσματος (περίπου 7.5 στα ουδετερόφιλα). Σε αυτό το υψηλότερο pH, όπου η μετατόπιση της ισορροπίας ευνοεί την διάσπαση των μορίων, το οξύ ιονίζει τα παραγόμενα πρωτόνια, τα οποία τείνουν να μειώσουν το pH του κυτταροπλάσματος. Το κύτταρο προσπαθώντας να διατηρήσει το εσωτερικό pH του (εμποδίζοντας την αποβολή των πρωτονίων), μειώνει τον ρυθμό ανάπτυξης του καθώς χρησιμοποιεί την ενέργεια που απαιτείται για τους μηχανισμούς ανάπτυξης. Σε περίπτωση που το pH του περιβάλλοντος είναι πολύ χαμηλό και η συγκέντρωση των οξέων υψηλή, το φορτίο εντός του κυττάρου γίνεται πολύ υψηλό, με αποτέλεσμα το pH του να πέφτει σε ένα επίπεδο όπου η ανάπτυξη δεν είναι πλέον εφικτή και το κύτταρο τελικά να πεθαίνει (Adams & Moss, 1995).

1.3.3. Οργανικά οξέα

1.3.3.1. Εισαγωγή

Πολλά οργανικά οξέα χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων με σκοπό να μειωθούν οι μικροοργανισμοί που περιέχονται στα τρόφιμα, μειώνοντας το pH. Ένας άλλος ρόλος των οργανικών οξέων είναι η βελτίωση της ποιότητας των τροφίμων. Οι

ποσότητες και οι τύποι των οργανικών οξέων που προστίθενται στα τρόφιμα, διέπονται από τους ρυθμιστικούς οργανισμούς.

Τα οργανικά οξέα μπορούν να βρίσκονται στα τρόφιμα με τρεις τρόπους: α) να είναι φυσικά, όπως το κιτρικό οξύ στα εσπεριδοειδή, β) μέσω ζύμωσης, όπως το οξικό, το γαλακτικό και το προπιονικό οξύ που παράγονται σε διάφορα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση (από επιθυμητές εναρκτηρίες καλλιέργειες βακτηρίων, ως υποπροϊόντα της ζύμωσης), γ) τεχνητά, δηλαδή προστίθενται σε τρόφιμα και ποτά για να μειωθεί το pH.

Μεταξύ των οργανικών οξέων που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα σαν συντηρητικά είναι το οξικό, το προπιονικό, το γαλακτικό, το κιτρικό, το σορβικό και το βενζοϊκό, τα άλατά τους και μερικά παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (π.χ., πάραμπεν).

Ο μείζων στόχος της αντιμικροβιακής χρήσης των ασθενών οργανικών οξέων είναι να μειωθεί το pH των τροφίμων για τον έλεγχο της μικροβιακής ανάπτυξης (Corlett & Brown, 1980). Καθώς το pH πέφτει κάτω από 5.0, ορισμένα βακτήρια τραυματίζονται και πεθαίνουν. Ωστόσο, το ποσοστό θανάτου σε χαμηλό pH δεν είναι προβλέψιμο, όπως στην περίπτωση της θερμότητας. Έτσι, δεν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με στόχο την καταστροφή ενός προβλέψιμου ποσοστού ενός μικροβιακού πληθυσμού στο κανονικό φάσμα pH των τροφίμων (Baird-Parker *et al.*, 1980; Booth & Kroll, 1989; Eklund, 1989; Brown & Booth, 1990; Doors *et al.*, 1993).

1.3.3.2. Μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης

Η αντιμικροβιακή δράση ενός ασθενούς οργανικού οξέος παράγεται από τις συνδυασμένες δράσεις των αδιάστατων μορίων και των δισταμένων ιόντων (Corlett & Brown, 1980; Baird-Parker *et al.*, 1980; Booth & Kroll, 1989; Eklund, 1989; Brown & Booth, 1990; Doors *et al.*, 1993). Σημαντικοί μικροοργανισμοί στα τρόφιμα τείνουν να διατηρούν ένα εσωτερικό κυτταροπλασματικό pH περίπου 6.5-7.0 σε οξεόφιλους και 7.5-8.0 σε ουδετερόφιλους. Το εσωτερικό pH είναι αυστηρά ρυθμιζόμενο και πέφτει κατά περίπου 0.1 μονάδα για κάθε μεταβολή 1.0 μονάδας στο εξωτερικό pH. Για μεταφορά θρεπτικών συστατικών και σύνθεση ενέργειας, οι μικροοργανισμοί διατηρούν επίσης μια διαμεμβρανική βαθμίδα pH (περίπου 0.5-1.0

μονάδα με αλκαλικό εσωτερικό pH) και μια βαθμίδωση πρωτονίων (περίπου 200 mV), οι οποίες μαζί αποτελούν την κινητήριο δύναμη των πρωτονίων.

Όταν ένα ασθενές οργανικό οξύ προστίθεται στα τρόφιμα, ανάλογα με το pH του τροφίμου, το pK_a του οξέος και τη θερμοκρασία, μερικά από τα μόρια δίστανται ενώ άλλα παραμένουν αδιάστατα (**Πίνακας 3**). Στο pH των περισσότερων τροφίμων (pH 5-8) τα μόρια του οργανικού οξέος, με εξαίρεση τα πάραμπεν, παραμένουν δισταμένα. Ως αποτέλεσμα, η $[H^+]$ στο περιβάλλον αυξάνει, παρεμβαίνοντας έτσι στην διαμεμβρανική βαθμίδωση πρωτονίων των μικροβιακών κυττάρων. Προκειμένου να αντιμετωπιστεί το γεγονός αυτό, τα κύτταρα μεταφέρουν πρωτόνια μέσω της αντλίας πρωτονίων, η οποία προκαλεί εξάντληση ενέργειας και μια μείωση στο εσωτερικό pH. Οι δομές της επιφάνειας των κυττάρων, της εξωτερικής μεμβράνης ή του κυτταρικού τοιχώματος, της εσωτερικής μεμβράνης ή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του περιπλασματικού χώρου εκτίθενται σε $[H^+]$. Αυτό μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τους ιοντικούς δεσμούς των μακρομορίων και έτσι γίνεται παρέμβαση σε τρισδιάστατες δομές και σε ορισμένες συναφείς λειτουργίες. Σε pH μικρότερο από 5.0, τα αδιάστατα μόρια κάποιου οξέος μπορεί να είναι πολύ υψηλά. Τα οργανικά οξέα είναι λιπόφιλα (εκτός του κιτρικού) και εισέρχονται ελεύθερα διαμέσου της μεμβράνης σαν μία λειτουργία της βαθμίδωσης της συγκέντρωσης. Επειδή το εσωτερικό pH είναι πολύ υψηλότερο από το pK_a του οξέος, τα μόρια δίστανται, απελευθερώνοντας πρωτόνια και ανιόντα. Μερικά ανιόντα (π.χ., του οξικού και του γαλακτικού) μεταβολίζονται από διάφορους μικροοργανισμούς ως πηγή άνθρακα. Εάν δεν μεταβολίζονται, τα ανιόντα απομακρύνονται από το εσωτερικό του κυττάρου. Ωστόσο, η $[H^+]$ θα μειώσει το εσωτερικό pH και θα επηρεάσει αρνητικά τη βαθμίδωση των πρωτονίων. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, τα κύτταρα αποβάλλουν τα πλεονάζοντα πρωτόνια με δαπάνη ενέργειας. Σε χαμηλότερο εξωτερικό pH (pH 4.5 ή παρακάτω), απαιτείται δαπάνη μιας μεγάλης ποσότητας ενέργειας που τα κύτταρα μπορεί να μην είναι σε θέση να παράγουν. Ως αποτέλεσμα, το εσωτερικό pH πέφτει, επηρεάζοντας αρνητικά την βαθμίδωση του pH. Το χαμηλό pH μπορεί επίσης να δράσει επί των κυτταρικών συστατικών (όπως οι πρωτεΐνες) και να επηρεάσει αρνητικά την δομή τους (παρεμβαίνοντας στους ιοντικούς δεσμούς) και την λειτουργική τους ακεραιότητα (Corlett & Brown, 1980; Booth & Kroll, 1989; Eklund, 1989; Sofos & Busta, 1993).

Οι αλλαγές αυτές μπορούν να επηρεάσουν τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών και την παραγωγή ενέργειας παρεμβαίνοντας έτσι στην ανάπτυξη των μικροβίων.

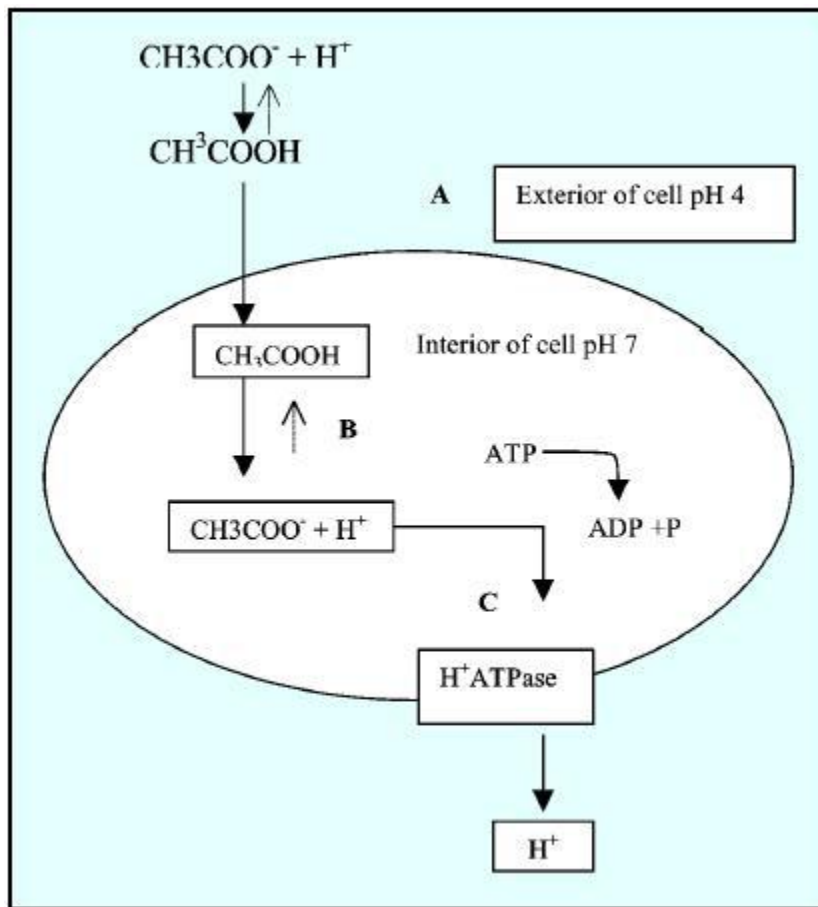
Επιπλέον, το χαμηλό pH μπορεί να καταστρέψει αντιστρεπτά και μη τα κυτταρικά μακρομόρια, τα οποία μπορεί στη συνέχεια να προκαλέσουν υποθανατηφόρες καθώς και θανατηφόρες βλάβες στα κύτταρα (Εικόνα 3.).

Το χαμηλό pH μπορεί να αλλάξει το ιοντικό περιβάλλον του περιβλήματος των σπορίων με την αντικατάσταση των ιόντων του (π.χ., Ca^{2+}) με H^+ και κάνει τα σπόρια ασταθή προς άλλες περιβαλλοντικές καταπονήσεις, όπως η θερμότητα και η χαμηλή ενεργότητα νερού (a_w) (Corlett & Brown, 1980; Baird-Parker *et al.*, 1980; Booth & Kroll, 1989; Eklund, 1989; Brown & Booth, 1990; Doors *et al.*, 1993).

Πίνακας 3.: Επίδραση του pH στο ποσοστό των δισταμένων ιόντων των ασθενών οργανικών οξέων.

Οξύ	pK _a	% Δισταμένων ιόντων σε pH:		
		4	5	6
Οξικό	4.8	15.5	65.1	94.9
Προπιονικό	4.9	12.5	58.3	93.3
Γαλακτικό	3.8	60.8	93.9	99.3
Κιτρικό	3.1	81.1	99.6	>99.1
Σορβικό	4.8	18.0	70.0	95.9
Βενζοϊκό	4.2	40.7	87.2	98.6
Πάραμπεν ¹	8.5	<0.1	0.1	0.3

1. Πάραμπεν: εστέρες του βενζοϊκού οξέος.



Εικόνα 3.: Επίδραση των ασθενών οξέων στο μικροβιακό κύτταρο (Beales, 2004).

1.3.3.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την δραστηριότητα των οξέων

- Φύση των οξέων

Τα ασθενή οργανικά οξέα που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα ποικίλλουν σε αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα, λόγω των διαφορών τους στην pK_a . Ένα οξύ με υψηλότερη pK_a έχει αναλογικά υψηλότερες ποσότητες αδιάστατων μορίων σε ένα τρόφιμο και είναι περισσότερο αντιμικροβιακό. Μελέτες έχουν δείξει ότι, σε γενικές γραμμές, υπό παρόμοιες συνθήκες, η αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα των τεσσάρων οξέων ακολουθεί την εξής σειρά:

οξικό > προπιονικό > γαλακτικό > κιτρικό

Επιπλέον, σε χαμηλότερο pH και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ένα οξύ είναι περισσότερο αντιμικροβιακό. Η διαλυτότητα των οξέων σε νερό παίζει σημαντικό ρόλο στην επιθυμητή επίδραση. Το οξικό, το προπιονικό, το γαλακτικό και το κιτρικό είναι πολύ διαλυτά στο νερό, σε αντίθεση με το βενζοϊκό (50 g%), το σορβικό (0,16 g%) και τα πάραμπεν (0.02 έως 0.16 g%), τα οποία διαλύονται δύσκολα στο νερό. Ως εκ τούτου, στην ίδια συγκέντρωση, παρουσιάζουν διαφορετική αποτελεσματικότητα. Σε πολλές μελέτες, η αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα αυτών των οξέων έναντι των μικροοργανισμών μελετάται σε εκατοστιαία βάση (g σε 100 ml). Ωστόσο, διαφέρουν σε μοριακό βάρος, έτσι, στην ίδια συγκέντρωση, έχουν διαφορετικούς αριθμούς μορίων και παράγουν διαφορετικές συγκεντρώσεις αδιάστατων μορίων καθώς και διαχωρισμένα ιόντα. Για πιο ακριβή σύγκριση, συνιστάται η χρησιμοποίηση τους βάση μοριακής συγκέντρωσης.

Τα οργανικά οξέα διαφέρουν επίσης στη λιπόφιλη ιδιότητα τους, η οποία ρυθμίζει την ευκολία τους στην είσοδο των κυττάρων. Το οξικό και το προπιονικό οξύ είναι περισσότερο λιπόφιλο από το γαλακτικό οξύ και έχουν περισσότερη αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα από ό,τι το γαλακτικό οξύ. Το κιτρικό μεταφέρεται μέσω της μεμβράνης με ένα ειδικό μηχανισμό μεταφοράς (κιτρική περμεάση) και είναι λιγότερο αποτελεσματικό από τα λιπόφιλα οξέα. Πολλοί μικροοργανισμοί μπορούν να μεταβολίσουν τα ανιόντα των ασθενών οξέων, όπως το οξικό, το γαλακτικό και το κιτρικό. Η χρήση των αλάτων αυτών των οξέων μπορεί να μειώσει την αντιμικροβιακή επίδραση σε υψηλότερα pH. Ορισμένα οξέα παρουσιάζουν συνεργιστικές επιδράσεις όταν χρησιμοποιούνται σε κατάλληλους συνδυασμούς (π.χ., οξικό και γαλακτικό οξύ, προπιονικό και σορβικό οξύ) ή με άλλο συντηρητικό (π.χ., βενζοϊκό οξύ με την νισίνη, προπιονικό, οξικό, γαλακτικό οξύ ή με νισίνη ή με πεδιοκίνη AcH, προπιονικό ή βενζοϊκό με CO₂) (Corlett & Brown, 1980; Eklund, 1989; Brown & Booth, 1990; Sofos & Busta, 1993).

- *Φύση των τροφίμων*

Το φυσιολογικό pH των τροφίμων ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό από πολύ όξινο (pH 3.0, χυμός εσπεριδοειδών) έως αλκαλικό (pH 9.0, ασπράδι αυγού). Το αρχικό pH μπορεί να επηρεάσει έντονα την αντιμικροβιακή επίδραση ενός οξέος. Ένα οξύ είναι περισσότερο ανασταλτικό σε ένα τρόφιμο με ένα χαμηλότερο pH από ό,τι σε ένα με υψηλότερο pH. Η ρυθμιστική δράση των συστατικών των τροφίμων μειώνει επίσης

την αποτελεσματικότητα του χαμηλού pH. Τα θρεπτικά συστατικά μπορούν επίσης να διευκολύνουν την πρόκληση του όξινου υποθανατηφόρου τραυματισμού των μικροοργανισμών.

- *Φύση των μικροοργανισμών*

Οι σημαντικοί μικροοργανισμοί στα τρόφιμα ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με το κατώτερο όριο του pH που επιτρέπεται η ανάπτυξη. Σε γενικές γραμμές, τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι περισσότερο ευαίσθητα σε χαμηλό pH από ό,τι είναι τα Gram-θετικά βακτήρια, ενώ οι ζύμες και οι μούχλες είναι λιγότερο ευαίσθητες. Επίσης, τα Gram-αρνητικά βακτήρια εμφανίζονται περισσότερο ανθεκτικά στα ασθενή οργανικά οξέα σε σχέση με τα Gram-θετικά (Russell, 1991). Αυτό οφείλεται εν μέρει στη διαφορετική δομική και χημική σύσταση της εξωτερικής στοιβάδας των κυττάρων τους (Nikaido & Varra, 1985). Τα βακτήρια που προκαλούν ζύμωση είναι πιο ανθεκτικά σε χαμηλότερο pH από ό,τι είναι τα αερόβια βακτήρια, πιθανόν επειδή είναι σε θέση να αντιστέκονται στις μεταβολές του εξωτερικού pH καθώς και να αντέχουν σε ελαφρώς χαμηλότερο εσωτερικό pH. Στον ίδιο λόγο οφείλεται η ικανότητα των ζυμών και των μούχλων να αντέχουν σε χαμηλό pH (Corlett & Brown, 1980; Booth & Kroll, 1989; Eklund, 1989; Doors *et al.*, 1993). Η αντιμικροβιακή ιδιότητα ενός οργανικού οξέος ενισχύεται από τη θερμότητα, τη χαμηλή a_w , την παρουσία κάποιων άλλων συντηρητικών και από τις χαμηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης.

Η ανασταλτική δράση των ασθενών οξέων μειώνεται σε υψηλότερα μικροβιακά φορτία. Επίσης, σε ένα μικτό μικροβιακό πληθυσμό, ο μεταβολισμός ενός οξέος (όπως του γαλακτικού) μπορεί να μειωθεί από ένα ανθεκτικό είδος και συνεπώς να μειωθεί η αποτελεσματική συγκέντρωση του έναντι των άλλων ευαίσθητων ειδών, επιτρέποντας σε αυτά να αναπτυχθούν. Ορισμένοι σημαντικοί μικροοργανισμοί στα τρόφιμα, όπως ορισμένοι ορότυποι των παθογόνων *Salmonella* spp. και *E. coli* O157:H7, φαίνεται να έχουν γενετικά καθοριστικούς παράγοντες που τους επιτρέπουν να αναπτύσσονται σε υψηλότερες όξινες συγκεντρώσεις (ή χαμηλότερο pH) σε σχέση με άλλα στελέχη του ίδιου είδους. Η όξινη ανθεκτικότητα φαίνεται να σχετίζεται με την υπερπαραγωγή μιας ομάδας πρωτεϊνών (πρωτεΐνες καταπόνησης) από αυτά τα στελέχη.

Τέλος, οι μικροοργανισμοί διαφέρουν στην ευαισθησία τους στα διάφορα οργανικά οξέα. Οι ζύμες και οι μούχλες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στο προπιονικό και στο σορβικό οξύ, ενώ τα βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα στο οξικό οξύ. Τα βακτηριακά σπόρια σε χαμηλότερο pH εμφανίζουν ευαισθησία στη θερμική επεξεργασία και δεν βλαστάνουν στην ελάχιστη a_w ανάπτυξης. Επίσης, η ανασταλτική δράση του NO_2 έναντι των σπορίων είναι πιο έντονη κοντά στην τιμή του κατώτερου pH ανάπτυξης.

1.3.3.4. Οξέα που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων

- *Οξικό οξύ*

Χρησιμοποιείται συνήθως ως ξύδι (5-10% οξικό οξύ) ή ως άλατα νατρίου και ασβεστίου σε 25% ή σε υψηλότερα επίπεδα, σε τουρσιά, σε βάσεις σαλάτας και σε σάλτσες. Είναι πιο αποτελεσματικό έναντι στα βακτήρια από ό,τι στις ζύμες και στις μούχλες. Τα βακτήρια που αναπτύσσονται καλύτερα πάνω από pH 6.0 είναι πιο αδρανή. Οι ανασταλτικές συγκεντρώσεις του αδιάστατου οξέος είναι 0.02% έναντι του μικροοργανισμού *Salmonella* spp., 0.01% έναντι του μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus*, 0.02% έναντι του μικροοργανισμού *Bacillus cereus*, 0.1% έναντι του μικροοργανισμού *Aspergillus* spp. και 0.5% έναντι του *Saccharomyces* spp. Η ανασταλτική δράση του οξικού οξέος προάγεται μέσω της εξουδετέρωσης της ηλεκτροχημικής βαθμίδωσης της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και μέσω της μετουσίωσης των πρωτεϊνών μέσα στα κύτταρα. Εκτός από τη χρήση του στα τρόφιμα, το οξικό οξύ έχει προταθεί για χρήση (1-2%) στην πλύση σφαγίου για να ελαττωθεί το βακτηριακό φορτίο (Corlett & Brown, 1980; Booth & Kroll, 1989; Sofos & Busta, 1993).

- *Γαλακτικό οξύ*

Χρησιμοποιείται ως οξύ ή ως άλατα νατρίου και καλίου έως 2% σε αεριούχα ποτά, βάσεις σαλάτας, λαχανικά τουρσί, προϊόντα με βάση το κρέας χαμηλής

θερμικής επεξεργασίας και σάλτσες. Είναι λιγότερο αποτελεσματικό από το οξικό, το προπιονικό, το βενζοϊκό ή το σορβικό οξύ, αλλά πιο αποτελεσματικό από το κιτρικό οξύ. Δρα καλύτερα ενάντια των βακτηρίων συγκριτικά με τις ζύμες και τις μούχλες. Στην εξουδετέρωση της βαθμίδωσης των πρωτονίων της μεμβράνης, οφείλεται η ανασταλτική του δράση. Το άλας νατρίου του γαλακτικού οξέος μπορεί επίσης να μειώσει την a_w . Το L(+)-γαλακτικό οξύ προτιμάται έναντι του D(-)-γαλακτικού οξέως ως συντηρητικό τροφίμων. Έχει επίσης προταθεί σε επίπεδο 1-2% να πλένουν τα σφάγια για τις ζωοτροφές για την μείωση του μικροβιακού φορτίου (Corlett & Brown, 1980; Booth & Kroll, 1989; Sofos & Busta, 1993).

- Βενζοϊκό οξύ
- Προπιονικό οξύ
- Κιτρικό οξύ
- Σορβικό οξύ
- Πάραμπενς

1.3.4. Συντηρητικά

1.3.4.1. Εισαγωγή

Πολλές χημικές ενώσεις, είτε είναι φυσικά παρούσες και σχηματίζονται κατά την επεξεργασία, είτε προστίθενται νόμιμα ως συστατικά, μπορούν να σκοτώσουν τους μικροοργανισμούς ή να ελέγξουν την ανάπτυξή τους στα τρόφιμα. Αυτές οι χημικές ενώσεις ορίζονται ως αντιμικροβιακοί αναστολείς ή συντηρητικά (Davidson & Branen, 1993; Dillin & Board, 1994). Τα συντηρητικά είναι ανόργανες ή οργανικές ουσίες που προστίθενται στα τρόφιμα με σκοπό την πρόληψη ή την παρεμπόδιση της μικροβιακής ανάπτυξης (Ρόδης, 1995; Κωμαΐτης, 2002). Μερικά συντηρητικά χρησιμοποιούνται ειδικά για τη διατήρηση των τροφίμων έναντι των μικροοργανισμών, ενώ άλλα προστίθενται κυρίως για να βελτιώσουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες του τροφίμου. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητά τους είναι: (α) η συγκέντρωση του συντηρητικού, (β) το είδος, ο

πληθυσμός και η ηλικία του μικροοργανισμού, (γ) η θερμοκρασία, (δ) ο χρόνος και (ε) τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του υποστρώματος (Ρόδης, 1995).

Τα τελευταία χρόνια, η πιθανή επίπτωση των διαφόρων συντηρητικών και άλλων προσθετικών στην ανθρώπινη υγεία από τη μακροχρόνια χρήση μέσω διαφόρων τροφίμων έχει αμφισβητηθεί. Η προσθήκη των συντηρητικών στα τρόφιμα ελέγχεται από τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, καθώς η αλόγιστη χρήση τους μπορεί να επιφέρει προβλήματα στην υγεία των καταναλωτών. Πολλά από αυτά έχουν μη εδωδιμη προέλευση ή προστίθενται σε ένα επίπεδο που δεν υπάρχουν κανονικά στα τρόφιμα και μερικά είναι συνθετικά. Η αγορά τροφίμων ενδιαφέρεται περισσότερο για τρόφιμα χωρίς συντηρητικά. Το γεγονός αυτό κάνει επιτακτική την ανάγκη για συντηρητικά που είναι είτε φυσικά παρόντα στα τρόφιμα φυτικής ή ζωικής προέλευσης είτε παράγονται από ασφαλείς για τον άνθρωπο μικροοργανισμούς. Μερικά από αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί (όχι μόνο σαν συντηρητικά), για μεγάλο χρονικό διάστημα σε τρόφιμα και είναι ασφαλή (όπως το γαλακτικό, το οξικό και το προπιονικό οξύ), ενώ άλλα δεν έχουν χρησιμοποιηθεί άμεσα ως συντηρητικά.

1.3.4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση των συντηρητικών

Διάφοροι παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την αξιολόγηση της καταλληλότητας ενός αντιμικροβιακού παράγοντα ως συντηρητικό τροφίμων (Davidson & Branen, 1993; Dillin & Board, 1994; Russell & Gould, 1990; Silliker, 1980; Giese, 1994), όπως οι αντιμικροβιακές του ιδιότητες, η καταλληλότητα για εφαρμογή σε τρόφιμα και η ικανότητα να πληροί τις ρυθμιστικές απαιτήσεις. Όσον αφορά στις αντιμικροβιακές ιδιότητες, μία ένωση που σκοτώνει τους μικροοργανισμούς αντί να τους ελέγχει, προτιμάται. Ομοίως, μια ένωση με ευρύτερο αντιμικροβιακό φάσμα είναι περισσότερο κατάλληλη για εφαρμογή σε τρόφιμα, έτσι ώστε να είναι αποτελεσματική έναντι πολλών τύπων μικροοργανισμών σημαντικών για τα τρόφιμα (δηλαδή, μούχλες, ζύμες, βακτήρια και ιούς), σε σύγκριση με ένα που έχει ένα στενό φάσμα. Επίσης, μία ένωση αποτελεσματική όχι μόνο έναντι φυτικών κύτταρων, αλλά επίσης έναντι σπορίων προτιμάται. Τέλος, δεν πρέπει να επιτρέπεται η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών. Οι περισσότερες ενώσεις δεν πληρούν όλες αυτές

τις απαιτήσεις. Συχνά, περισσότερες από μία ενώσεις χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με την αύξηση του ανασταλτικού φάσματος. Επιπλέον, το περιβάλλον των τροφίμων μπορεί να περιορίζει την ανάπτυξη πολλών τύπων μικροοργανισμών.

Για να είναι επιτρεπτή η εφαρμογή ενός συντηρητικού δεν πρέπει να προσδίδει μόνο την επιθυμητή αντιμικροβιακή ιδιότητα αλλά και να μην επηρεάζει την κανονική οργανοληπτική ποιότητα ενός τροφίμου (υφή, γεύση ή χρώμα). Επιπλέον, δεν πρέπει να αλληλεπιδρά με τα συστατικά των τροφίμων και να καθίσταται ανενεργή μετά την προσθήκη του. Πρέπει να έχει μια υψηλή αντιμικροβιακή ιδιότητα στο pH, στο a_w , στο Eh και στη θερμοκρασία αποθήκευσης του τροφίμου. Επιπρόσθετα, πρέπει να είναι σταθερό κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του τροφίμου. Τέλος, πρέπει το συντηρητικό να είναι οικονομικό και άμεσα διαθέσιμο.

Οι ιδιότητες του αντιμικροβιακού παράγοντα είναι οι εξής:

- i) αποτελεσματικός σε μικρές συγκεντρώσεις, χωρίς να κρύψει οποιοδήποτε ελάττωμα του τροφίμου (π.χ., απόκρυψη κακής ποιότητας και αλλοίωσης)
- ii) ασφαλές για κατανάλωση και εντός επιτρεπτών από την νομοθεσία τροφίμων (π.χ. Κώδικας Τροφίμων & Ποτών). Για αυτό πρέπει και να αναγράφεται στην ετικέτα, μαζί με το σκοπό για τον οποίο προστίθεται.

1.3.4.3. Σορβικό κάλιο

Πρόκειται για άλας, το οποίο προέρχεται από το ασθενές οργανικό οξύ, σορβικό, το οποίο είναι ένα ακόρεστο οξύ και χρησιμοποιείται στα τρόφιμα ως συντηρητικό από το 1940, άλλοτε ως οξύ άλλοτε ως άλατα νατρίου, καλίου ή ασβεστίου. Χρησιμοποιείται σε μη αλκοολούχα ποτά, σε ορισμένα αλκοολούχα ποτά, σε μεταποιημένα φρούτα και λαχανικά, σε επιδόρπια γάλακτος, στη ζαχαροπλαστική, στη μαγιονέζα, σε βάση σαλάτας και σε μουστάρδες. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται κυμαίνεται από 500 έως 2000 ppm (0.05-0.2%).

Είναι πιο αποτελεσματικό έναντι στους μύκητες και στις ζύμες από ό,τι έναντι στα βακτήρια. Μεταξύ των βακτηρίων, τα είδη που είναι αρνητικά στην καταλάση (π.χ., τα οξυγαλακτικά βακτήρια) είναι πιο ανθεκτικά από τα είδη που είναι θετικά

(π.χ., αερόβια, *S. aureus* και *Bacillus* spp.) (Sofos & Busta, 1993). Επίσης, τα αερόβια βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα από τα αναερόβια βακτήρια. Έρευνες έχουν δείξει ότι ορισμένες ζύμες μπορούν να αυξήσουν την αντοχή τους στο σορβικό οξύ, εάν προσαρμοστούν αρχικά σε μικρές ποσότητες του οξέος (Warth, 1977; Bills *et al.*, 1982). Αντιθέτως, υπάρχουν πολύ λίγες πληροφορίες για αύξηση της αντίστασης των βακτηρίων και των μυκήτων στο οξύ (Davidson & Harrison, 2003). Οι ανασταλτικές συγκεντρώσεις του αδιάστατου οξέος είναι ως ακολούθως: $\leq 0.01\%$ (100 ppm) για τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp., *S. aureus*, *E. coli* και *Serratia* spp, $\approx 0.1\%$ για τον μικροοργανισμό *Lactobacillus* spp. και για τους ορότυπους του παθογόνου *Salmonella* spp. και $\leq 0.02\%$ για τις περισσότερες ζύμες και μούχλες, αλλά $\approx 1.0\%$ για τον μικροοργανισμό *Clostridium* spp.

Η ανασταλτική δράση του σορβικού καλίου έναντι των ορισμένων ενζύμων, εκ των οποίων κάποια βρίσκονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος, προκαλεί την αντιμικροβιακή του δράση. Παρεμβαίνει επίσης στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, των πρωτεϊνών, του RNA και του DNA. Επιπλέον, όπως και τα άλλα οργανικά οξέα, παρεμβαίνει στο δυναμικό της μεμβράνης και αναστέλλει την εκβλάστηση των σπορίων (Booth & Kroll, 1989; Brown & Booth, 1990; Ray & Sandine, 1992).

1.4. Μοντελοποίηση της μικροβιακής συμπεριφοράς

Η συμπεριφορά των παθογόνων βακτηρίων μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες, περιβαλλοντικούς ή σχετιζόμενους με τα τρόφιμα. Συνεπώς, είναι ύψιστης σημασίας να αξιολογηθεί το μέγεθος της ανάπτυξής τους. Ειδικά δοκιμαστικά τεστ ή κλινικές μελέτες σε τεχνητά επιμολυσμένα εμπορικά προϊόντα, που αποθηκεύονται υπό σταθερές συνθήκες, πρέπει να διεξαχθούν με στόχο την αξιολόγηση της ασφάλειας ή της διάρκειας ζωής των αντίστοιχων προϊόντων σε αυτές τις συνθήκες. Παρόλα αυτά, τέτοιου είδους πειραματικές κλινικές μελέτες είναι επίπονες και χρονοβόρες, κρίνοντας και από τον περιορισμένο όγκο πληροφοριών που προσφέρουν (π.χ., τα αποτελέσματα αναφέρονται μόνο σε συγκεκριμένα τρόφιμα και/ή πειραματικές συνθήκες). Άρα, είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν μέσα, τα οποία μπορούν να παρέχουν όλες τις απαιτούμενες πληροφορίες σχετικά με την μικροβιακή ασφάλεια ή ποιότητα ενός προϊόντος, υπολογίζοντας όλες τις μεταχειρίσεις ή περιβαλλοντικές παραμέτρους που μπορεί να εμποδίσουν ή να κινητοποιήσουν την μικροβιακή αύξηση (π.χ., pH, θερμοκρασία, a_w , ανταγωνιστική μικροχλωρίδα). Η προρρητική μικροβιολογία εστιάζει στην ανάπτυξη και επικύρωση τέτοιων εργαλείων.

Η μικροβιολογία πρόρρησης είναι ένα κομμάτι της μικροβιολογίας τροφίμων, το οποίο ερευνά την χρήση μαθηματικών εξισώσεων και στατιστικών προσεγγίσεων για να προβλέψει την αύξηση, την επιβίωση ή την αδρανοποίηση των παθογόνων ή αλλοιωγόνων βακτηρίων στα τρόφιμα. Με άλλα λόγια, η μικροβιολογία πρόρρησης αξιοποιεί όλα τα κατάλληλα μικροβιολογικά δεδομένα που είναι απαραίτητα για να ποσοτικοποιήσουν το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο περιβάλλον και το μικροοργανισμό. Οι Ross & McMeekin (1995) πρότειναν τον όρο «ποσοτική μικροβιακή οικολογία των τροφίμων» για να περιγράψουν την μικροβιολογία πρόρρησης. Η γνώση της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών στα τρόφιμα, όπως προβλέπεται από τα μαθηματικά μοντέλα, μπορεί να βοηθήσει στην ευκολότερη και

πιο γρήγορη αξιολόγηση της μικροβιακής ασφάλειας και ποιότητας των τροφίμων (Swinnen *et al.*, 2004).

Πολλές προτάσεις έχουν γίνει για την κατηγοριοποίηση των μοντέλων πρόβλεψης. Μοντέλα που περιγράφουν την κινητική των μικροοργανισμών ονομάζονται «κινητικά μοντέλα», ενώ εάν ερευνάται η πιθανότητα αύξησης ενός μικροοργανισμού ή η παραγωγή ενός συγκεκριμένου μεταβολίτη, τα μοντέλα ορίζονται ως «μοντέλα πιθανοτήτων» (McMeekin & Ross, 2002). Μία άλλη προσέγγιση ταξινομεί τα μοντέλα σε μηχανιστικά ή εμπειρικά, βάσει του αν έχουν θεωρητική βάση ή όχι (Fakruddin *et al.*, 2011). Οι Whiting & Buchaman (1993) πρότειναν επίσης την ταξινόμηση των μοντέλων σε τρία επίπεδα: πρωτογενές, δευτερογενές και τριτογενές. Πρωτογενή μοντέλα είναι τα μοντέλα που περιγράφουν τις αλλαγές (αύξησης ή μείωσης) σε ένα μικροβιακό πληθυσμό συναρτήσει του χρόνου και συγκεκριμένων περιβαλλοντικών συνθηκών (McKellar & Lu, 2004). Τα δευτερογενή μοντέλα περιγράφουν τις κινητικές παραμέτρους που αποκτήθηκαν από την πρωταρχική μοντελοποίηση σαν συνάρτηση των επιλεγμένων περιβαλλοντικών παραγόντων. Τέλος, τα τριτογενή μοντέλα εντάσσουν τα πρωτογενή και δευτερογενή μοντέλα σε μία διεπιφάνεια φιλική προς το χρήστη, η οποία συνδέει περαιτέρω το κενό ανάμεσα στην προγνωστική μοντελοποίηση και την βιομηχανία τροφίμων. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πρωτογενή, δευτερογενή και τριτογενή μοντέλα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**.

Πίνακας 4.: Λίστα των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων μοντέλων.

Πρωτογενή μοντέλα	Δευτερογενή μοντέλα	Τριτογενή μοντέλα
Logistic	Square root	Pathogen Modeling Program (PMP)
Modified logistic	Ratkowsky	Seafood Spoilage & Safety Predictor (SSSP)
Three Phase Linear	Arrhenius	Refrigeration Index
Gompertz	Polynomial	USDA Pathogen Program
Modified Gombertz	Probability	Growth Predictor
Baranyi	Surface models	Pseudomonas Predictor

Η ανάπτυξη ενός μαθηματικού μοντέλου για την πρόβλεψη της μικροβιακής συμπεριφοράς κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ή σε ένα σύστημα τροφίμου, ακολουθεί συνήθως μία διαδικασία τεσσάρων βημάτων: (i) πειραματικός σχεδιασμός, (ii) δημιουργία δεδομένων, (iii) ανάπτυξη του μοντέλου και (iv) επικύρωση του μοντέλου. Κάθε ένα από αυτά τα βήματα είναι πολύ σημαντικό για την ανάπτυξη ενός επιτυχημένου μοντέλου.

1.5. Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα μελέτη στηρίχθηκε στην έλλειψη συστηματικής γνώσης για την επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα σε έτοιμες προς κατανάλωση πατατοσαλάτες. Η αρχική μας υπόθεση είναι ότι το pH είναι ο κρίσιμος παράγοντας που επηρεάζει την επιβίωση του παθογόνου. Το τελικό pH των δειγμάτων διαμορφώνεται από διάφορους παράγοντες όπως οι εξής:

- Αρχικό pH της βάσης σαλάτας.
- Ποσότητα της πατάτας που προστίθεται.
- Τύπο του οργανικού οξέος που περιέχεται στην βάση σαλάτας.
- Παρουσία ή μη του συντηρητικού.

Συνεπώς, μελετήθηκαν οι διάφοροι συνδυασμοί των παραπάνω παραγόντων (ογδόντα διαφορετικές περιπτώσεις) για να διαπιστωθεί το μέγεθος της επίδρασης που έχουν στη διαμόρφωση του τελικού pH των δειγμάτων και άρα στην επιβίωση του παθογόνου *Salmonella* spp. Σύμφωνα με την παραπάνω, λοιπόν, υπόθεση οι στόχοι που ετέθησαν ήταν:

- i. Μελέτη της επίδρασης του συνδυασμού του οξέος, της πατάτας, του συντηρητικού και του αρχικού pH στην επιβίωση του μικροοργανισμού *Salmonella* spp.
- ii. Μαθηματική προσαρμογή τεσσάρων (4) πολυωνυμικών εξισώσεων που περιγράφουν το ρυθμό θανάτωσης του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. στα υπό εξέταση προϊόντα ως συνάρτηση των παραπάνω ανεξάρτητων μεταβλητών, που αποτελούν και ενδογενή χαρακτηριστικά των προϊόντων, για διαφορετικό τύπο οξέος (2 εξισώσεις) υπό την παρουσία ή μη σορβικού καλίου (2 εξισώσεις).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Αναλώσιμα υλικά

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας και τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε μια πληθώρα εργαστηριακών υλικών, ανόργανα και οργανικά χημικά αντιδραστήρια αλλά και τυποποιημένα σκευάσματα θρεπτικών υποστρωμάτων, αλλά και πλαστικά αναλώσιμα.

Ως θρεπτικά υλικά (υποστρώματα) και ισοτονικά μέσα εναιώρησης μικροοργανισμών σε όλη την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα:

- Tryptic Soy Broth (TSB), το οποίο απαντάται σε μορφή σκόνης
- Ringer, διάλυμα εναιώρησης μικροοργανισμών
- Tryptic Soy Agar (TSA) + 0.1% Pyruvate
- Xylose Lysine Desoxycholate (XLD)

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ουροσυλλέκτες (50 mL), τρυβλία Petri, ρύγχη (tips) και τις αντίστοιχες πιπέτες, γυάλινες φιάλες duran, δοκιμαστικοί σωλήνες, λύχνος Bunsen, σακούλες stomacher, ποτήρι ζέσεως, στατό δοκιμαστικών σωλήνων, πλαστικοί περιέκτες falcon, parafilm.

Το TSA χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Στο οποίο κατά τη διάρκεια του πειράματος γινόταν προσθήκη πυρουβικού οξέως σε ποσότητα 0.1%. Δρα προστατευτικά στα τραυματισμένα κύτταρα του παθογόνου *Salmonella* spp. με απώτερο σκοπό να μπορεί να παρατηρηθεί το μέγεθος των τραυματισμένων κυττάρων από την όξινη καταπόνηση, εκτός της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας.

Το XLD Agar (Άγαρ Ξυλόζης Λυσίνης Δεσοξυχολικού άλατος) είναι ένα εκλεκτικό θρεπτικό υλικό για την απομόνωση και διαφοροποίηση των αρνητικών κατά Gram εντερικών παθογόνων *Salmonella* spp. και *Shigella* spp.. Χρησιμοποιεί επίσης δεσοξυχολικό νάτριο ως εκλεκτικό παράγοντα το οποίο, είναι ανασταλτικό για θετικούς κατά Gram μικροοργανισμούς. Αποτελείται από εκχύλισμα ζυμομυκήτων

που αποτελεί πηγή θρεπτικών συστατικών και βιταμινών. Η ξυλόζη ενσωματώνεται στο θρεπτικό υλικό γιατί ζυμώνεται από όλους τους εντερικούς οργανισμούς εκτός από τα είδη του γένους *Shigella* και η ιδιότητα της αυτή επιτρέπει τη διαφοροποίηση τους. Το είδος *Salmonella* spp. αφού εξαντλήσει την προμήθεια ξυλόζης, χρησιμοποιεί τη λυσίνη μέσω του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της λυσίνης, με το pH να μετατρέπεται σε αλκαλικό, καθώς μιμείται την αντίδραση του μικροοργανισμού *Shigella* spp. Η λυσίνη συμπεριλαμβάνεται στο XLD βοηθά στη διαφοροποίηση των ειδών του γένους *Salmonella* από τους μη παθογόνους οργανισμούς. Απουσία λυσίνης, τα είδη του γένους *Salmonella* θα ζύμωναν ταχύτατα την ξυλόζη και δεν θα μπορούσαν να διακριθούν από τα μη παθογόνα είδη.

Για να ενισχυθεί η ικανότητα διαφοροποίησης της σύνθεσης, στο υλικό συμπεριλαμβάνεται ένα σύστημα δείκτη υδρόθειου (H_2S), που αποτελείται από θειοθειικό νάτριο ($Na_2S_2O_3$) και κιτρικό σίδηρο(III)αμμώνιο, για την οπτικοποίηση της παραγωγής υδρόθειου, που οδηγεί στο σχηματισμό αποικιών με μαύρο κέντρο, δηλαδή αποικιών του γένους που μας ενδιαφέρει. Οι μη παθογόνοι οργανισμοί που παράγουν H_2S δεν επιτυγχάνουν αποκαρβοξυλίωση της λυσίνης, συνεπώς, η όξινη αντίδραση που παράγεται από αυτά τα εμποδίζει να δημιουργήσουν το μαύρο χρώμα στις αποικίες, το οποίο προκύπτει μόνο σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH (Brocklehurst, 1992).

2.2. Μικροβιακά στελέχη

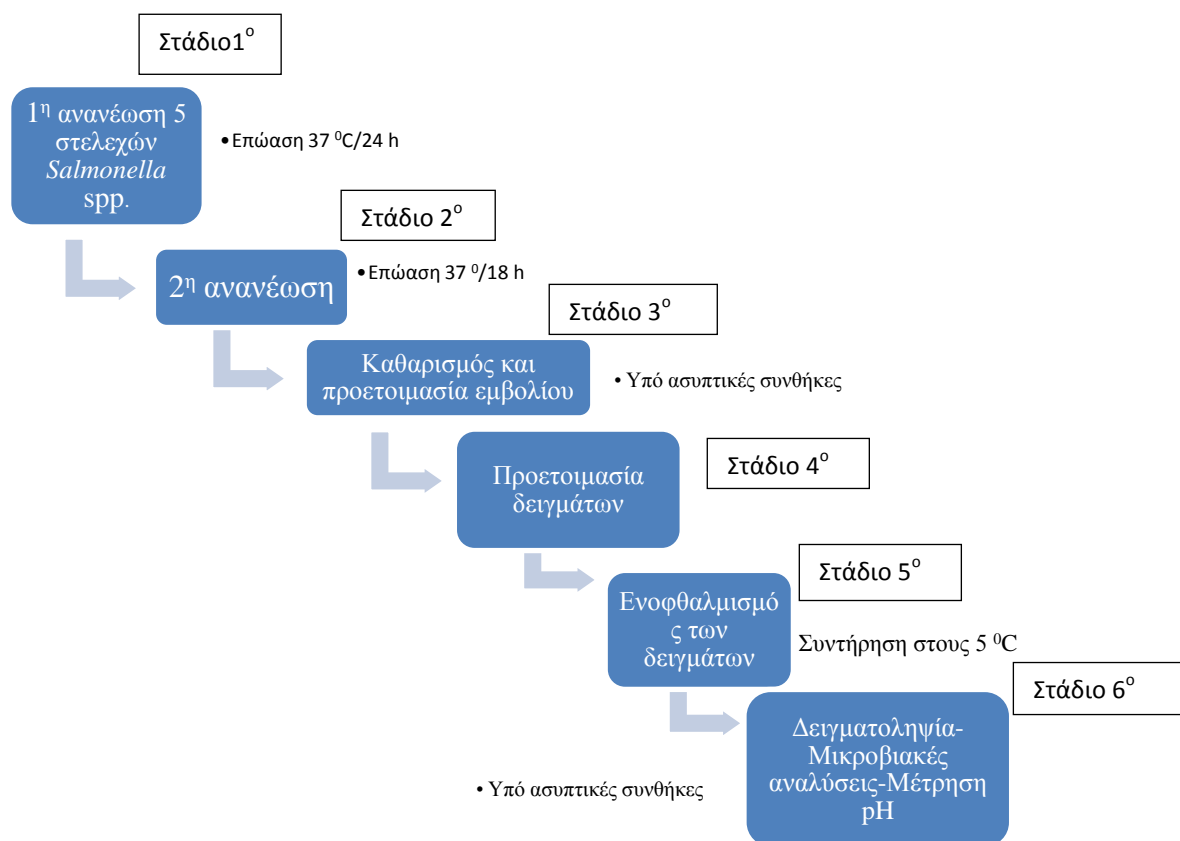
Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συμπεριφορά πέντε στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. υπό συνθήκες εμποδίων και καταπόνησης. Τα μελετηθέντα στελέχη *Salmonella enterica* προέρχονται από συλλογή απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών που διατηρεί το Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων (Πίνακας 5). Οι μικροοργανισμοί διατηρούνται στους -20 °C σε Nutrient Broth, παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 25% του συνολικού όγκου.

Πίνακας 5: Τα πέντε στελέχη (οροποικιλίες) του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. που μελετήθηκαν.

Κωδικός	Στέλεχος	Εργαστηριακός αριθμός	Προέλευση
PS1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	4/74	Έντερα μοσχαριού
PS2	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	DT 193	Άνθρωπος
PS3	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Agona	23	Ζωοτροφές
PS5	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Reading	655	Ζωοτροφές
PS12	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritis PTA P167807	PT4	Ζωοτροφές

2.3. Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε και οι μικροβιακοί χειρισμοί που διενεργήθηκαν σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες και παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχεδιάγραμμα ροής (Εικόνα 4).



Εικόνα 4.: Διάγραμμα ροής των πειραματικών διαδικασιών που έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη.

2.3.1. Ανανέωση και καθαρισμός των μικροοργανισμών

Περιλαμβάνει τα στάδια 1^ο-3^ο (Εικόνα 4) τα οποία προηγούνται του ενοφθαλμισμού των μικροοργανισμών στο υπόστρωμα. Προκειμένου να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους και να καταστούν άμεσα ικανά για ανάπτυξη κατά την ανανέωση, οι μικροοργανισμοί τοποθετούνται σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB (Tryptic Soy Broth) και επωάζονται στους 37 °C για 18-24 h. Πιο συγκεκριμένα, εισάγεται ποσότητα ενοφθαλμίσματος σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 10 mL TSB και ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 18-24 ώρες.

Για την προετοιμασία των εμβολίων δύο ανανεώσεις (υπό ασηπτικές συνθήκες):

- Η πρώτη ανανέωση (στάδιο 1^ο) περιλαμβάνει λήψη κυττάρων *Salmonella* spp. (PS1, PS2, PS3, PS5 και PS12) από την τράπεζα μικροοργανισμών του εργαστηρίου (stock). Ποσότητα 100 μL μεταφέρθηκε σε σωλήνες με 10 mL αποστειρωμένου TSB και εν συνεχεία επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37 °C.
- Η δεύτερη ανανέωση (στάδιο 2^ο) περιλάμβανε τη μεταφορά 100 μL από τους δοκιμαστικούς σωλήνες της πρώτης ανανέωσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 10 mL αποστειρωμένου TSB και εν συνεχεία επώαση στους 37 °C για 18 ώρες.

Το 3^ο στάδιο, του καθαρισμού, περιλαμβάνει την εξής διαδικασία :

- Οι δοκιμαστικές σωλήνες με τα δείγματα υφίστανται ανάμιξη (vortex). Έπειτα το διάλυμα μεταφέρεται σε αποστειρωμένους περιέκτες falcon.
- Έγινε φυγοκέντρηση στις 3600 rpm για 10 min στους 4 °C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης πετάμε το υπερκείμενο και το επανεκλύουμε σε 5 mL Ringer.
- Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για μία φορά.
- Μετά το τέλος τις εκπλύσεις για την απομάκρυνση του θρεπτικού υποστρώματος και των μεταβολικών προϊόντων των μικροοργανισμών, επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 10 mL Ringer, υφίσταται ανάδευση.

- Τέλος, όλα τα στελέχη τοποθετούνται σε αποστειρωμένη φιάλη duran, το οποίο αποτελεί και το τελικό εμβόλιο.

2.3.2. Υποστρώματα-συνθήκες

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα μεγάλης βιομηχανίας τροφίμων, η οποία παρείχε ευγενικά τα συστατικά των τελικών προϊόντων. Η σύσταση της βάσης της σαλάτας παρατίθεται στο παράρτημα Α. Εκτός από την βάση σαλάτας η βιομηχανία παρείχε και βιομηχανοποιημένα κυβάκια βρασμένης πατάτας. Τα δείγματα παρασκευάστηκαν (στάδιο 4^ο) βάσει του πειραματικού σχεδιασμού που αναφέρεται στη συνέχεια (ενότητα 6.4.).

2.3.3. Ενοφθαλμισμός

Αφού έγινε η προετοιμασία και ο καθαρισμός του εμβολίου και έχουν, πραγματοποιείται ο ενοφθαλμισμός των υποστρωμάτων (στάδιο 5^ο). Ο εμβολιασμός των δειγμάτων, όπως αυτά προβλέπονται από τον πειραματικό σχεδιασμό, έγινε με ποσότητα 0.3 mL από το εμβόλιο, με στόχο να επιτευχθεί αρχικός πληθυσμός της τάξεως των $10^{6.5}$ - 10^7 cfu/g. Ο εμβολιασμός έλαβε χώρα πραγματοποιήθηκε με τρόπο όπου όριζε ο εκάστοτε πειραματικός σχεδιασμός. Μετά το πέρας του εμβολιασμού τα δείγματα κλείνονταν με parafilm, ώστε να διατηρηθεί η υγρασία και τοποθετούνται σε κλίβανο με θερμοκρασία συντήρησης 5 °C. Πριν την συντήρηση λαμβάνει χώρα μια αρχική δειγματοληψία για να ελεγχθεί το επίπεδο του εμβολιασμού και στην συνέχεια πραγματοποιούνταν δειγματοληψίες ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

2.3.4. Μικροβιακές αναλύσεις

Η μικροβιακή ανάλυση (στάδιο 6^ο) των δειγμάτων, δηλαδή της εκτίμησης του μικροβιακού πληθυσμού με διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος και μετασποράς σε θρεπτικά υλικά. Συγκεκριμένα, 10 g από κάθε δείγμα πατατοσαλάτας μεταφέρθηκαν, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε αποστειρωμένη σακούλα stomacher και αραιώθηκαν σε 90 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Στη συνέχεια, ο τελικός όγκος 100 mL ομογενοποιούνται σε συσκευή Stomacher για 60 s, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το περιεχόμενο της σακούλας αποτελεί την πρώτη δεκαδική αραιώση. Εν συνεχεία, 1 mL από την πρώτη δεκαδική αραιώση αραιωνόταν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9 mL διαλύματος Ringer. Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, δημιουργήθηκε η απαιτούμενη, κατά περίπτωση, σειρά διαδοχικών αραιώσεων. Από κάθε σειρά διαδοχικών αραιώσεων επιλέχθηκαν οι κατάλληλες για τον εμβολιασμό μιας διπλής σειράς τρυβλίων που περιείχαν επιλεκτικό (XLD) ή μη (TSA) μικροβιακό υπόστρωμα. Οι μικροοργανισμοί που προσδιορίστηκαν με τον τρόπο αυτό ήταν οι εξής:

- ❖ **Ολική Μεσόφιλη γλωρίδα (OMX):** Ποσότητα 0.1 mL από την κατάλληλη δεκαδική αραιώση εμβολιάστηκε, υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης (spread) σε τρυβλία μη επιλεκτικού υποστρώματος TSA + 0.1% πυρουβικό οξύ. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 24 ώρες και καταμέτρηση όλων των αποικιών που αναπτύχθηκαν (**Εικόνα 5**).



Εικόνα 5: Χαρακτηριστικές αποικίες του παθογόνου *Salmonella* spp. σε θρεπτικό υλικό TSA.

- ❖ **Εντεροβακτήρια:** Ποσότητα 0.1 mL από την κατάλληλη δεκαδική αραιώση εμβολιάστηκε, υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης (spread) σε τρυβλία επιλεκτικού υποστρώματος XLD. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 24 ώρες και καταμέτρηση όλων των χαρακτηριστικών αποικιών που αναπτύχθηκαν (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6: Χαρακτηριστικές αποικίες του παθογόνου *Salmonella* spp. σε θρεπτικό υλικό XLD.

2.3.5. Μέτρηση pH

Μετά από κάθε δειγματοληψία προσδιορίστηκε η τιμή pH για κάθε δείγμα με τη χρήση πεχαμέτρου τύπου pH526 WTW. Η μέτρηση λαμβάνονταν από το διάλυμα της πρώτης δεκαδικής αραιώσης (σακούλα stomacher), υπό συνεχή ανάδευση.

2.4. Πειραματικός σχεδιασμός

2.4.1. Πειραματικός σχεδιασμός των προπειραμάτων

- *Προπείραμα Α'*

Στόχος του προπειράματος Α' ήταν να ερευνησουμε εάν ο τρόπος εμβολιασμού (προσομοιάζοντας διαφορετικούς τρόπους επιμόλυνσης των πρώτων υλών) και ο τρόπος δειγματοληψίας είχαν επίδραση στην επιβίωση του παθογόνου *Salmonella* spp. Για αυτό το λόγο παρασκευάστηκαν δείγματα με συνολικό βάρος 30 g και αναλογία πατάτας/βάσης σαλάτας:1/1. Στα μισά δείγματα πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός στην πατάτα και στην συνέχεια προστέθηκε η βάση σαλάτας, ενώ στα υπόλοιπα μισά ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε στο μίγμα. Επίσης είχαμε δείγματα από δύο διαφορετικούς τύπους βάσης σαλάτας με μέσο όξυνσης το οξικό οξύ. Πιο συγκεκριμένα τα μισά είχαν 12.50% ποσοστό ξυδιού και pH 3.45, ενώ τα υπόλοιπα είχαν 4.10% ποσοστό ξυδιού και pH 3.76. Τα δείγματα αφού παρασκευάστηκαν κλείστηκαν με parafilm και συντηρήθηκαν για πέντε ημέρες στους 5 °C. Τέλος, την πέμπτη ημέρα συντήρησης πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία με τρεις διαφορετικούς τρόπους, από πατάτα καθαρισμένη από τη βάση σαλάτας με σπάτουλα, από τη βάση σαλάτας ανάμεσα στην πατάτα και από το μίγμα.

- *Προπείραμα Β'*

Στόχος του προπειράματος Β' ήταν να απαντηθεί το ερώτημα εάν η παρουσία ή η απουσία συντηρητικού είχε διαφορά στην επιβίωση του παθογόνου *Salmonella* spp. Παρασκευάστηκαν δείγματα με ίση ποσότητα οξικού οξέος (12.50% & 4.10%), με μόνη διαφορά ότι στο ένα είχε συντηρητικό 0.1% σορβικό κάλιο. Αυτό είχε ως συνέπεια τα δείγματα να έχουν παραπλήσιες τιμές pH. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν δύο ζεύγη δειγμάτων για να γίνει σύγκριση όπως φαίνεται στον **Πίνακα 6**.

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά των δειγμάτων του προπειράματος Β'.

	Με συντηρητικό		Χωρίς συντηρητικό	
	ΔΕΙΓΜΑ Α	ΔΕΙΓΜΑ Β	ΔΕΙΓΜΑ 1	ΔΕΙΓΜΑ 2
Οξικό οξύ	12.50%	4.10%	12.50%	4.10%
pH	3.63	3.97	3.45	3.76

Τα δείγματα αφού παρασκευάστηκαν κλείστηκαν με parafilm και συντηρήθηκαν για πέντε ημέρες στους 5 °C. Τέλος, κατά την πέμπτη ημέρα πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία.

- Προπείραμα Γ'

Στόχος σε αυτό το προπείραμα ήταν η μελέτη της επίδρασης της πατάτας πάνω στην επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. Παρασκευάστηκαν, δείγματα με συνολικό βάρος 30 g στα οποία είχαμε αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας τις ακόλουθες εξής περιπτώσεις: 0/1, 1/1 και 2/1 και δύο τύπους βάσης σαλάτας:

- Οξικό οξύ 12.50% και pH 3.45

- Οξικό οξύ 4.10% και pH 3.76

Τα δείγματα αφού παρασκευάστηκαν κλείστηκαν με parafilm και μεταφέρθηκαν σε κλίβανο για οκτώ ημέρες στους 5 °C. Την τέταρτη και όγδοη ημέρα πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία με τρεις διαφορετικούς τρόπους: από καθαρή πατάτα (αφού καθαριστεί με σπάτουλα, ξεπλένεται με 10 mL Ringer), από το έκπλυμα (τα 10 mL Ringer στα οποία ξεπλύθηκε η πατάτα), ώστε να ελεγχθεί η μεταφορά των μικροοργανισμών και από δείγμα βάσης σαλάτας ανάμεσα σε κομμάτια πατάτας με ίση απόσταση μεταξύ τους.

- *Προπείραμα Δ'*

Στόχος του προπείράματος Δ' ήταν να μελετηθεί η επίδραση του γαλακτωμαποποιητή της βάσης σαλάτας στην επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. Παρασκευάστηκαν δείγματα συνολικού βάρους 30 g από τη βάση σαλάτας με τρεις διαφορετικούς τύπους γαλακτωμαποποιητών 80 pl., 60 pl. και 42 pl (pl. = plummet: μονάδα μέτρησης του ιξώδους). Τα δείγματα αφού παρασκευάστηκαν κλείστηκαν με parafilm και μεταφέρθηκαν σε κλίβανο 5 °C. Δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κατά την ημέρα παρασκευής, την πρώτη, την πέμπτη, την δέκατη, την δεκάτη έβδομη και την τριακοστή όγδοη ημέρα.

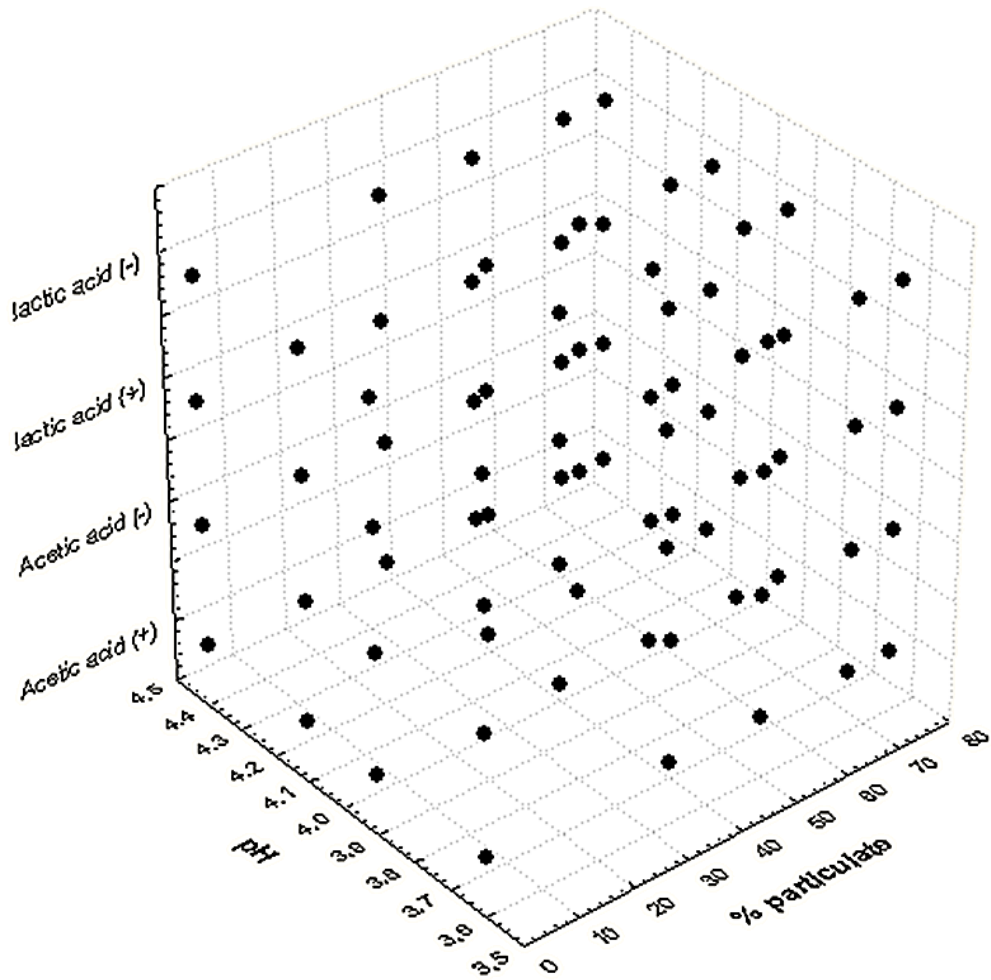
- *Προπείραμα Ε'*

Στόχος αυτού του προπείράματος ήταν να καθοριστεί ο πιο κρίσιμος παράγοντας για την επιβίωση του παθογόνου: η προστιθέμενη πατάτα ή το pH. Παρασκευάστηκαν δείγματα από δύο διαφορετικές βάσεις σαλάτας με μέσο όξυνσης το οξικό οξύ. Η πρώτη είχε αρχικό pH 3.45 και η δεύτερη είχε pH 3.76. Στα μισά δείγματα προστέθηκε πατάτα σε δύο αναλογίες πατάτα/βάση σαλάτας: 1/1 και 2/1, ενώ τα υπόλοιπα είχαν μόνο βάση σαλάτας. Τα δείγματα αφού παρασκευάστηκαν κλείστηκαν με parafilm και συντηρήθηκαν στους 5 °C. Δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικούς τρόπους: με καθαρή πατάτα (καθαρισμένη από την βάση σαλάτας με σπάτουλα) και με βάση σαλάτας ανάμεσα στην πατάτα, κατά τη διάρκεια της ημέρας παρασκευής, της πρώτης και της εικοστής δεύτερης ημέρας.

2.4.2. Πειραματικός σχεδιασμός του κύριου πειράματος

Κατά την διάρκεια του κύριου πειράματος εξετάστηκε ο ρυθμός επιβίωσης του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε έτοιμες προς κατανάλωση πατατοσαλάτες σε σχέση με το αρχικό pH της βάσης σαλάτας, τον τύπο του οργανικού οξέος, τη συγκέντρωση της πατάτας και την ύπαρξη ή μη συντηρητικού. Με βάση τα αποτελέσματα από τα πέντε προπειράματα που προηγήθηκαν (ενότητα 2.4.1.), σχεδιάστηκε ένας τελικός πειραματικός σχεδιασμός που αφορά ογδόντα διαφορετικές περιπτώσεις δειγμάτων πατατοσαλάτας.

Τα δείγματά μας βρίσκονται μέσα σε αποστειρωμένους ουροσυλλέκτες χωρητικότητας 50 mL και έχουν συνολικό βάρος 30 g. Το μέσο οξύνησης προκύπτει από το οξικό οξύ και το γαλακτικό οξύ σε τέσσερα διαφορετικά pH της βάσης σαλάτας: 3.6, 3.9, 4.1 και 4.4 αντίστοιχα. Τα δείγματα έχουν γίνει και με συντηρητικό και χωρίς συντηρητικό (0.1% σορβικό κάλιο). Επίσης, για τα παραπάνω δείγματα έχουμε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις πατάτας (αναλογία πατάτας/βάση σαλάτας: 0/1, 0.5/1, 1/1, 2/1 και 3/1). Ολοκληρώνοντας έχουμε γίνει δύο επαναλήψεις από την κάθε περίπτωση. Ακολουθεί ο **Πίνακας 7** και το **Γράφημα 1** που παρουσιάζουν συνοπτικά τις περιπτώσεις των δειγμάτων που μελετήθηκαν.



Γράφημα 1: Πολυπαραγοντικός πειραματικός σχεδιασμός για την περιγραφή της επίδρασης του αρχικού pH και της συγκέντρωσης της πατάτας στην επιβίωση του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε πατατοσαλάτες.

Πίνακας 7: Διαφορετικές πειραματικές περιπτώσεις δειγμάτων συνολικού όγκου 30 g που μελετήθηκαν με σκοπό την περιγραφή της συμπεριφοράς του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp.

Ονομασία	Οξύ	pH	Συντηρητικό	Πατάτα	Βάση σαλάτας
1	Οξικό	3.6	-	0 g	30 g
2	Οξικό	3.6	-	10 g	20 g
3	Οξικό	3.6	-	15 g	15 g
4	Οξικό	3.6	-	20 g	10 g
5	Οξικό	3.6	-	22.5 g	7.5 g
6	Οξικό	3.9	-	0 g	30 g
7	Οξικό	3.9	-	10 g	20 g
8	Οξικό	3.9	-	15 g	15 g
9	Οξικό	3.9	-	20 g	10 g
10	Οξικό	3.9	-	22.5 g	7.5 g
11	Οξικό	4.1	-	0 g	30 g
12	Οξικό	4.1	-	10 g	20 g
13	Οξικό	4.1	-	15 g	15 g
14	Οξικό	4.1	-	20 g	10 g
15	Οξικό	4.1	-	22.5 g	7.5 g
16	Οξικό	4.4	-	0 g	30 g
17	Οξικό	4.4	-	10 g	20 g
18	Οξικό	4.4	-	15 g	15 g
19	Οξικό	4.4	-	20 g	10 g
20	Οξικό	4.4	-	22.5 g	7.5 g
21	Οξικό	3.6	+	0 g	30 g
22	Οξικό	3.6	+	10 g	20 g
23	Οξικό	3.6	+	15 g	15 g
24	Οξικό	3.6	+	20 g	10 g
25	Οξικό	3.6	+	22.5 g	7.5 g
26	Οξικό	3.9	+	0 g	30 g
27	Οξικό	3.9	+	10 g	20 g
28	Οξικό	3.9	+	15 g	15 g
29	Οξικό	3.9	+	20 g	10 g

30	Οξικό	3.9	+	22.5 g	7.5 g
31	Οξικό	4.1	+	0 g	30 g
32	Οξικό	4.1	+	10 g	20 g
33	Οξικό	4.1	+	15 g	15 g
34	Οξικό	4.1	+	20 g	10 g
35	Οξικό	4.1	+	22.5 g	7.5 g
36	Οξικό	4.4	+	0 g	30 g
37	Οξικό	4.4	+	10 g	20 g
38	Οξικό	4.4	+	15 g	15 g
39	Οξικό	4.4	+	20 g	10 g
40	Οξικό	4.4	+	22.5 g	7.5 g
41	Γαλακτικό	3.6	-	0 g	30 g
42	Γαλακτικό	3.6	-	10 g	20 g
43	Γαλακτικό	3.6	-	15 g	15 g
44	Γαλακτικό	3.6	-	20 g	10 g
45	Γαλακτικό	3.6	-	22.5 g	7.5 g
46	Γαλακτικό	3.9	-	0 g	30 g
47	Γαλακτικό	3.9	-	10 g	20 g
48	Γαλακτικό	3.9	-	15 g	15 g
49	Γαλακτικό	3.9	-	20 g	10 g
50	Γαλακτικό	3.9	-	22.5 g	7.5 g
51	Γαλακτικό	4.1	-	0 g	30 g
52	Γαλακτικό	4.1	-	10 g	20 g
53	Γαλακτικό	4.1	-	15 g	15 g
54	Γαλακτικό	4.1	-	20 g	10 g
55	Γαλακτικό	4.1	-	22.5 g	7.5 g
56	Γαλακτικό	4.4	-	0 g	30 g
57	Γαλακτικό	4.4	-	10 g	20 g
58	Γαλακτικό	4.4	-	15 g	15 g
59	Γαλακτικό	4.4	-	20 g	10 g
60	Γαλακτικό	4.4	-	22.5 g	7.5 g
61	Γαλακτικό	3.6	+	0 g	30 g
62	Γαλακτικό	3.6	+	10 g	20 g

63	Γαλακτικό	3.6	+	15 g	15 g
64	Γαλακτικό	3.6	+	20 g	10 g
65	Γαλακτικό	3.6	+	22.5 g	7.5 g
66	Γαλακτικό	3.9	+	0 g	30 g
67	Γαλακτικό	3.9	+	10 g	20 g
68	Γαλακτικό	3.9	+	15 g	15 g
69	Γαλακτικό	3.9	+	20 g	10 g
70	Γαλακτικό	3.9	+	22.5 g	7.5 g
71	Γαλακτικό	4.1	+	0 g	30 g
72	Γαλακτικό	4.1	+	10 g	20 g
73	Γαλακτικό	4.1	+	15 g	15 g
74	Γαλακτικό	4.1	+	20 g	10 g
75	Γαλακτικό	4.1	+	22.5 g	7.5 g
76	Γαλακτικό	4.4	+	0 g	30 g
77	Γαλακτικό	4.4	+	10 g	20 g
78	Γαλακτικό	4.4	+	15 g	15 g
79	Γαλακτικό	4.4	+	20 g	10 g
80	Γαλακτικό	4.4	+	22.5 g	7.5 g

Μετά την παρασκευή και τον εμβολιασμό ακολουθεί ελαφριά ανάδευση με σπάτουλα και διατήρηση τους 5 °C. Η συντήρηση των δειγμάτων διήρκεσε 60 ημέρες. Δειγματοληψίες έλαβαν χώρα ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ενώ ο τρόπος δειγματοληψίας γινόταν τελικά από το μίγμα.

2.5. Ανάπτυξη μοντέλου

Για την προσαρμογή των λογαριθμικών πληθυσμών του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. χρησιμοποιήθηκε αρχικά το πρωτογενές μοντέλο Weibull (Mafart *et al.*, 2002), με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος GInaFiT. Στόχος ήταν να υπολογιστούν οι παράμετροι «δ» της εξίσωσης Weibull. Η παράμετρος «δ» ορίζεται ως ο χρόνος (σε ημέρες) υπό συγκεκριμένων συνθηκών που απαιτείται για τη μείωση του πληθυσμού ορισμένου είδους μικροοργανισμού κατά ένα λογαριθμικό κύκλο ή αλλιώς για μείωσή του κατά 90%. (Jay *et al.*, 1996). Η εξίσωση του πρωτογενούς μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακόλουθη:

$$\log_{10}(N)=\log_{10}(N_0)-((t/\langle\delta\rangle)**p)$$

Όπου N: το επίπεδο πληθυσμού που επιβιώνει, N_0 : το επίπεδο πληθυσμού που εμβολιάστηκε, t: ο χρόνος και p: υπολογισμένη παράμετρος του μοντέλου.

Τα δεδομένα που ελήφθησαν από το συγκεκριμένο πρωτογενές μοντέλο, δηλαδή οι τιμές της παραμέτρου «δ», προσαρμόστηκαν σε ένα πολυωνυμικό μοντέλο (δευτερογενές) με τη βοήθεια του προγράμματος Statistica. Σκοπός ήταν να γίνει η περιγραφή της συσχέτισης της τιμής «δ» με το αρχικό pH της βάσης σαλάτας και της συγκέντρωσης της προστιθέμενης πατάτας. Οι μαθηματικές εξισώσεις που προέκυψαν έχουν την ακόλουθη μορφή:

$$\text{SQRT}(\langle\delta\rangle) = \alpha + \beta_1\% \text{ πατάτα} + \beta_2 \text{ αρχικό pH} + \beta_3 (\% \text{ πατάτα})^2 + \beta_4 (\text{αρχικό pH})^2 + \beta_5 (\% \text{ πατάτα} * \text{αρχικό pH})$$

Όπου α: σταθερά και β_1 - β_5 : υπολογισμένες παράμετροι του μοντέλου, μετά από τη συσχέτιση παλινδρόμησης. Η κανονικότητα της προσαρμογής των εξισώσεων αξιολογήθηκε από τον δείκτη συσχέτισης R^2 . Επιπλέον, από τις μαθηματικές εξισώσεις που προκύπτουν από την συσχέτιση του ποσοστού πατάτας και του αρχικού pH της βάσης σαλάτας, φαίνεται ότι το τελικό pH των προϊόντων, το οποίο είναι και ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την επιβίωση του παθογόνου

μικροοργανισμού *Salmonella* spp., περιγράφεται από μία γραμμική συνάρτηση της μορφής $y = \mathbf{a} \cdot \mathbf{x} + \mathbf{b}$ και επηρεάζεται τόσο από τη συγκέντρωση της πατάτας που προστίθεται όσο και από το αρχικό pH της βάσης σαλάτας.

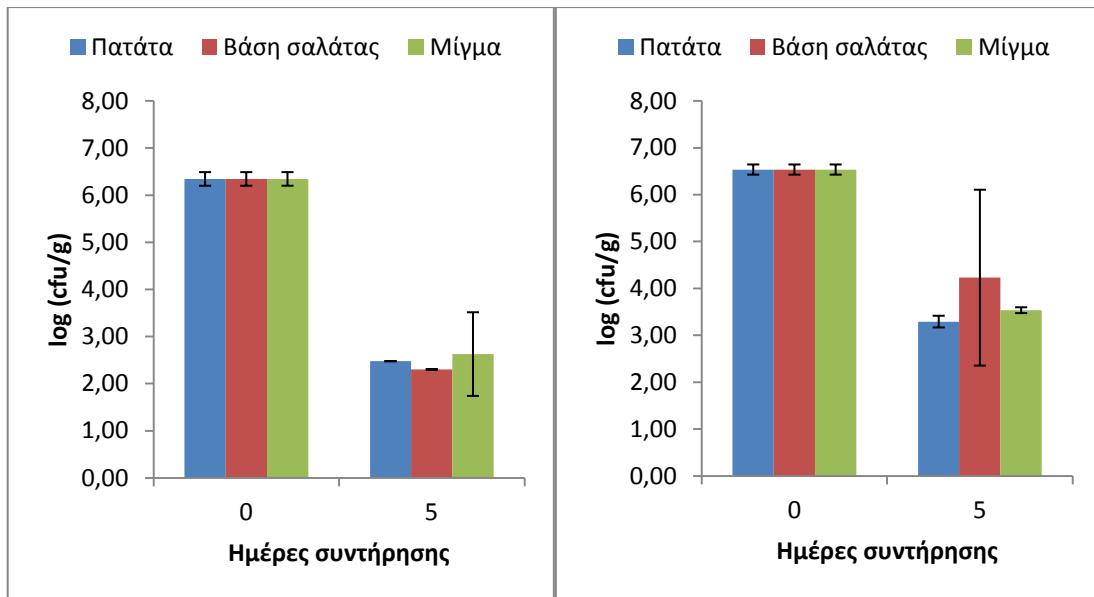
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Αποτελέσματα προπειραματικής διαδικασίας

3.1.1. Προπείραμα Α'

Προκειμένου να καθοριστεί εάν ο τρόπος εμβολιασμού και ο τρόπος δειγματοληψίας των δειγμάτων έχει κάποια επίδραση στην επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp., έγινε το προπείραμα Α' κατά το οποίο το εμβόλιο ενοφθαλμίστηκε σε υπόστρωμα πατατοσαλάτας με βάση σαλάτας με pH 3.45 και 3.76 με δύο διαφορετικούς τρόπους: ενοφθαλμισμός στο μίγμα και ενοφθαλμισμός στην πατάτα όπου στην συνέχεια έγινε προσθήκη της βάσης σαλάτας. Επιπλέον, η δειγματοληψία έγινε με τρεις διαφορετικούς τρόπους: από την πατάτα, την βάση σαλάτας και το μίγμα.

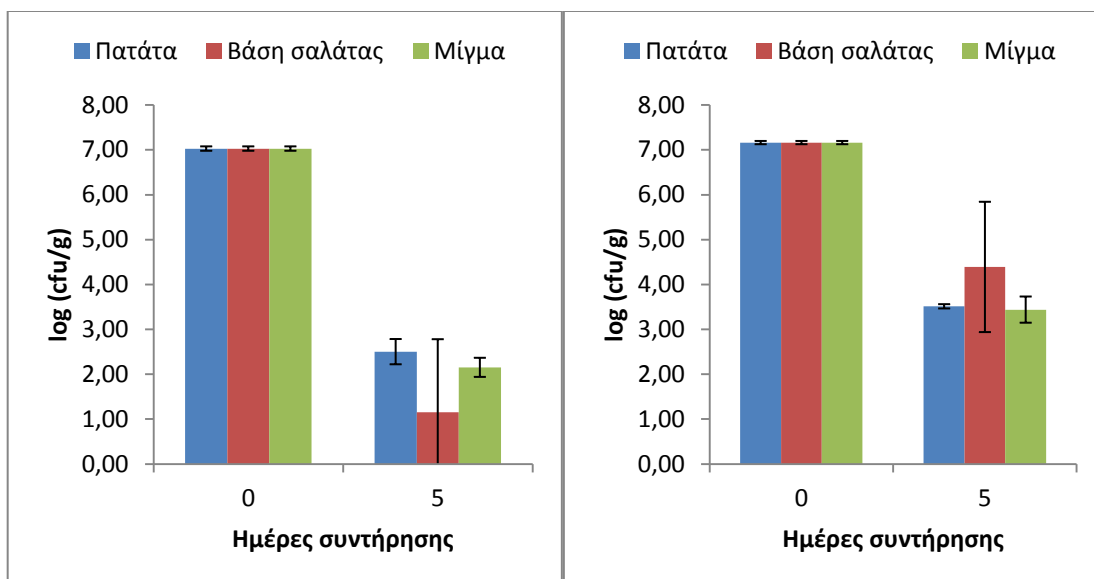
Αρχικά, όσον αφορά τα δείγματα πατατοσαλάτας που είχαν βάση σαλάτας με pH 3.45 στο θρεπτικό υλικό XLD, το οποίο είναι εκλεκτικό για τον παθογόνο *Salmonella* spp., ο εμβολιασμός στο μίγμα όπως φαίνεται στο **Γράφημα 2Α** δεν παρουσιάζει διαφορά σε σχέση με τον εμβολιασμό στην πατάτα που φαίνεται στο **Γράφημα 3Α**. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στο αντίστοιχο θρεπτικό υπόστρωμα TSA. Στα τελευταία παρατηρείται μία αύξηση 1 log cfu/g στην επιβίωση του παθογόνου *Salmonella* spp. σε σχέση με τα αντίστοιχα **Γραφήματα 2Α** και **3Α**, διότι υφίσταται μεγάλο ποσοστό τραυματισμένων κυττάρων λόγω του πολύ χαμηλού pH. Τα δείγματα πατατοσαλάτας που έχουν βάση σαλάτας με pH 3.76. στο θρεπτικό υλικό XLD, όταν έχουμε εμβολιασμό στο μίγμα όπως φαίνεται στο **Γράφημα 4Α** δεν παρουσιάζουν διαφορά σε σχέση με όταν έχουμε εμβολιασμό στην πατάτα που φαίνεται στο **Γράφημα 5Α**. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στα **Γραφήματα 4Β** και **5Β**, που είναι τα αντίστοιχα αλλά σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA. Στα τελευταία φαίνεται οποία και παρατηρείται μικρότερη διαφορά στην επιβίωση του παθογόνου με τα αντίστοιχα μεγέθη του XLD, σε σχέση με τα **Γραφήματα 2Β** και **3Β**, διότι το pH σε αυτή την περίπτωση είναι υψηλότερο.



(A)

(B)

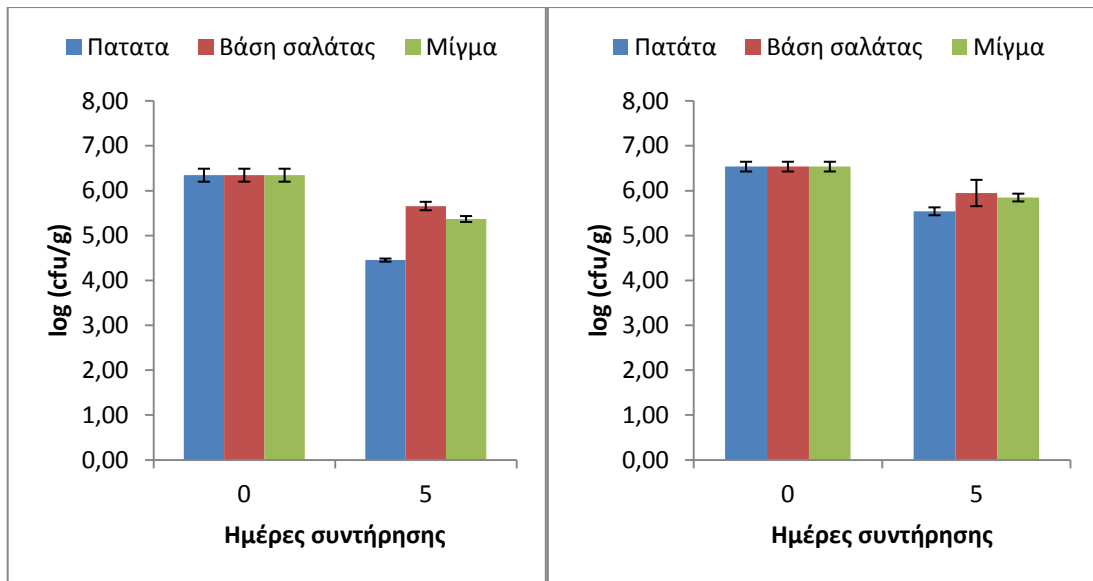
Γράφημα 2: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με pH 3.45 και εμβολιασμό στο μίγμα του προϊόντος με τρεις διαφορετικούς τρόπους δειγματοληψίας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.



(A)

(B)

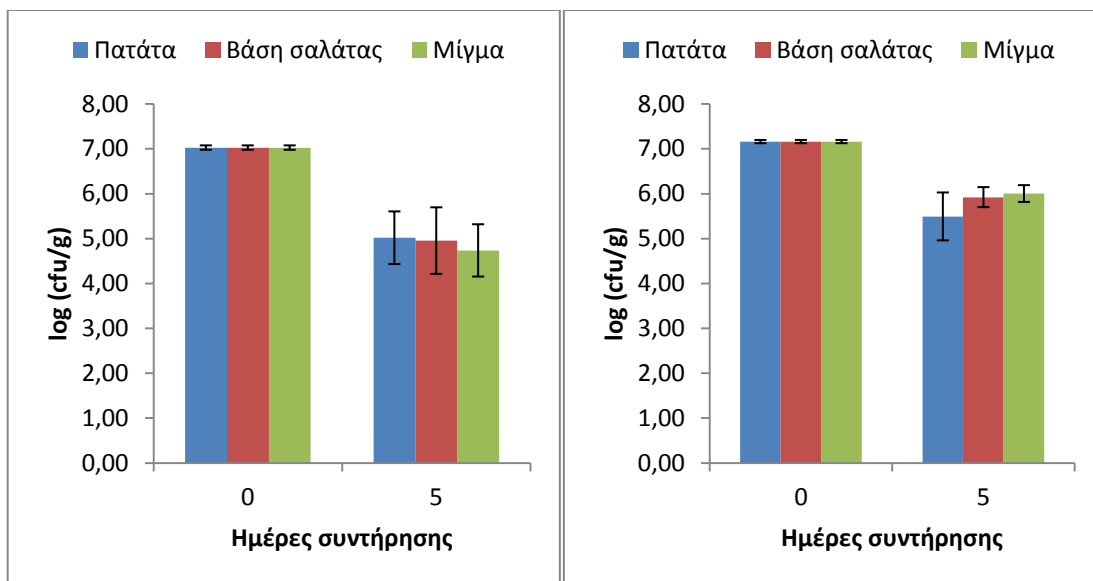
Γράφημα 3: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με pH 3.45 και εμβολιασμό στην πατάτα του προϊόντος με τρεις διαφορετικούς τρόπους δειγματοληψίας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.



(A)

(B)

Γράφημα 4: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με pH 3.76 και εμβολιασμό στο μίγμα του προϊόντος με τρεις διαφορετικούς τρόπους δειγματοληψίας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.



(A)

(B)

Γράφημα 5: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με pH 3.76 και εμβολιασμό στην πατάτα του προϊόντος με τρεις διαφορετικούς τρόπους δειγματοληψίας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Όσον αφορά τον τρόπο δειγματοληψίας φαίνεται από όλα τα γραφήματα ότι δεν υπάρχει διαφορά στην επιβίωση του μικροοργανισμού. Αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί και από τα αποτελέσματα του **Πίνακα 8**, όπου είναι εμφανές ότι το pH είναι σταθερό για όλες τις μεταχειρίσεις. Παρουσιάζεται ελάχιστη διαφορά περίπου 0.3 βαθμούς στο pH ανάμεσα στα δείγματα με διαφορετική βάση σαλάτας. Αυτό παρουσιάζει διαφορά στην επιβίωση του πληθυσμού και στα αντίστοιχα **Γραφήματα 2Α – 4Α** και **3Α – 5Α**. Συμπερασματικά, ο τρόπος δειγματοληψίας και ο τρόπος εμβολιασμού δεν έχουν διαφορά στην επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού.

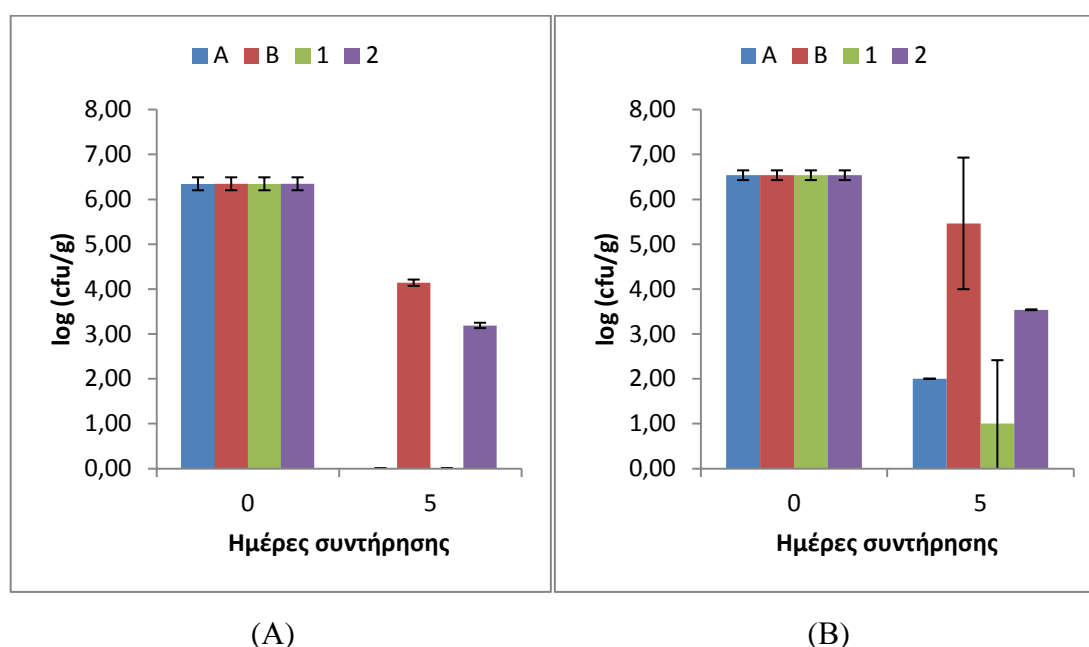
Πίνακας 8: Αποτελέσματα της μέτρησης pH στις διαφορετικές περιπτώσεις δειγμάτων του πρώτου προπειράματος.

ΔΕΙΓΜΑ	ΤΡΟΠΟΣ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ	ΤΡΟΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	pH
pH 3.45	Πατάτα	Πατάτα	3.92 ±0.04
		Βάση σαλάτας	3.98 ±0.06
		Μίγμα	3.92 ±0.03
	Μίγμα	Πατάτα	3.99 ±0.01
		Βάση σαλάτας	3.99 ±0.00
		Μίγμα	3.96 ±0.01
pH 3.76	Πατάτα	Πατάτα	4.32 ±0.01
		Βάση σαλάτας	4.31 ±0.01
		Μίγμα	4.21 ±0.00
	Μίγμα	Πατάτα	4.29 ±0.01
		Βάση σαλάτας	4.33 ±0.01
		Μίγμα	4.24 ±0.01

3.1.2. Προπείραμα Β'

Στόχος του δεύτερου προπειράματος ήταν να ελεγχθεί εάν η παρουσία ή η απουσία του συντηρητικού, 0.1% σορβικό κάλιο, επηρεάζει την επιβίωση του παθογόνου. Παρασκευάστηκαν τα δείγματα με τα χαρακτηριστικά του **Πίνακα 6**.

Στο θρεπτικό υλικό XLD παρατηρείται ότι υπάρχει επιβίωση μόνο στα δείγματα Β (με συντηρητικό και ποσοστό οξικού οξέος 4.10%) και 2 (χωρίς συντηρητικό και ποσοστό οξικού οξέος 4.10%). Στα άλλα δύο δείγματα, δηλαδή το Α (με συντηρητικό και ποσοστό οξικού οξέος 12.50%) και το 1 (χωρίς συντηρητικό και ποσοστό οξικού οξέος 12.50%) δεν έχουμε επιβίωση διότι το pH αυτών των δειγμάτων είναι πιο χαμηλό από τα άλλα δύο κατά 0.2 μονάδες. Επίσης, στο **Γράφημα 6Α** παρατηρείται διαφορά της τάξεως του 1 log cfu/g ανάμεσα στο δείγμα Β, που είχε συντηρητικό και στο δείγμα 2 που δεν είχε. Η ίδια διαφορά παρατηρείται και στο **Γράφημα 6Β** με τα δείγματα που έχουν συντηρητικό να παρουσιάζουν μεγαλύτερη επιβίωση σε σχέση με αυτά που δεν έχουν.



Γράφημα 6: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα βάσης σαλάτας. Σύγκριση του δείγματος Α (με συντηρητικό και οξικό οξύ 12.50%) με το δείγμα 1 (χωρίς συντηρητικό και οξικό οξύ 12.50%) και του δείγματος Β (με συντηρητικό και οξικό οξύ 4.10%) με το δείγμα 2 (χωρίς συντηρητικό και οξικό οξύ 4.10%) με τρεις διαφορετικούς τρόπους δειγματοληψίας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (Α) ή μη επιλεκτικό (Β) υπόστρωμα.

Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 9** με το pH στα δείγματα που έχουν συντηρητικό είναι μεγαλύτερο από αυτά που έχουν. Δηλαδή η παρουσία του σορβικού καλίου αύξησε το pH και συνεπώς την επιβίωση του παθογόνου.

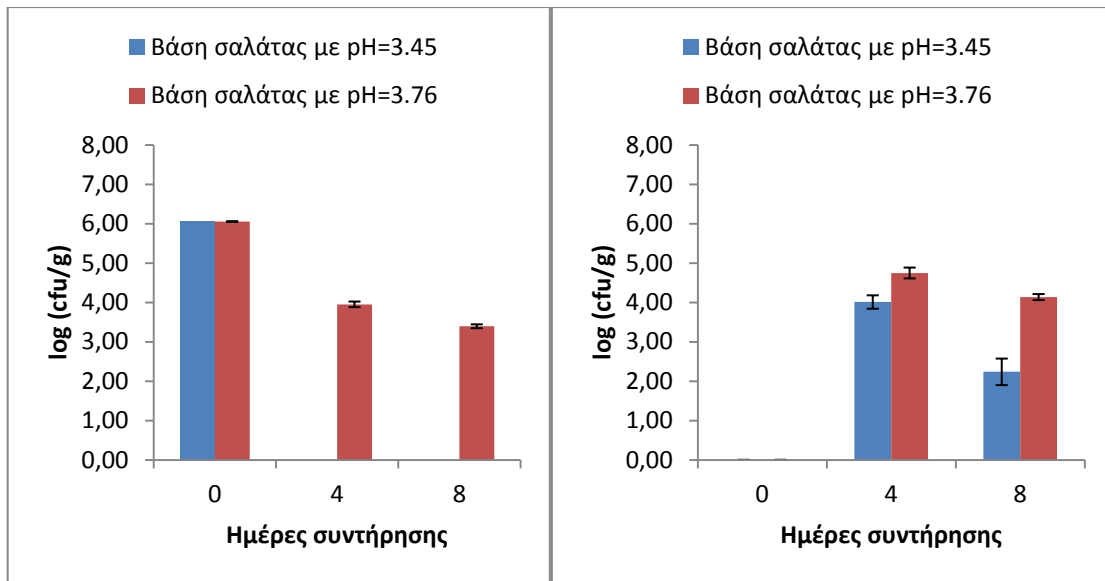
Πίνακας 9: Αποτελέσματα της μέτρησης pH στις διαφορετικές περιπτώσεις δειγμάτων του δεύτερου προπειράματος.

ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΟ	ΔΕΙΓΜΑ	pH
Παρουσία	A (pHi 3.63)	3.83 ±0.00
(+)	B (pHi 3.97)	4.06 ±0.01
Απουσία	1 (pHi 3.45)	3.66 ±0.01
(-)	2 (pHi 3.76)	3.95 ±0.01

3.1.3. Προπείραμα Γ'

Στόχος του τρίτου προπειράματος στόχος ήταν να ελέγξουμε εάν η προσθήκη της πατάτας επηρεάζει την επιβίωση του παθογόνου. Επίσης, ελέγχθηκε και ο τρόπος δειγματοληψίας: από την πατάτα, από την μεταφορά μικροοργανισμών στο έκπλυμα (το οποίο συλλέχθηκε με έκπλυση της πατάτας με 10 mL Ringer) καθώς και από δείγμα από τη βάση σαλάτας ανάμεσα σε κομμάτια πατάτα, κατά το δυνατό σε ίση απόσταση μεταξύ γειτονικών τεμαχίων. Επιπλέον, ελέγχθηκε και κατά πόσο το pH της βάσης σαλάτας επηρεάζει την επιβίωση του παθογόνου.

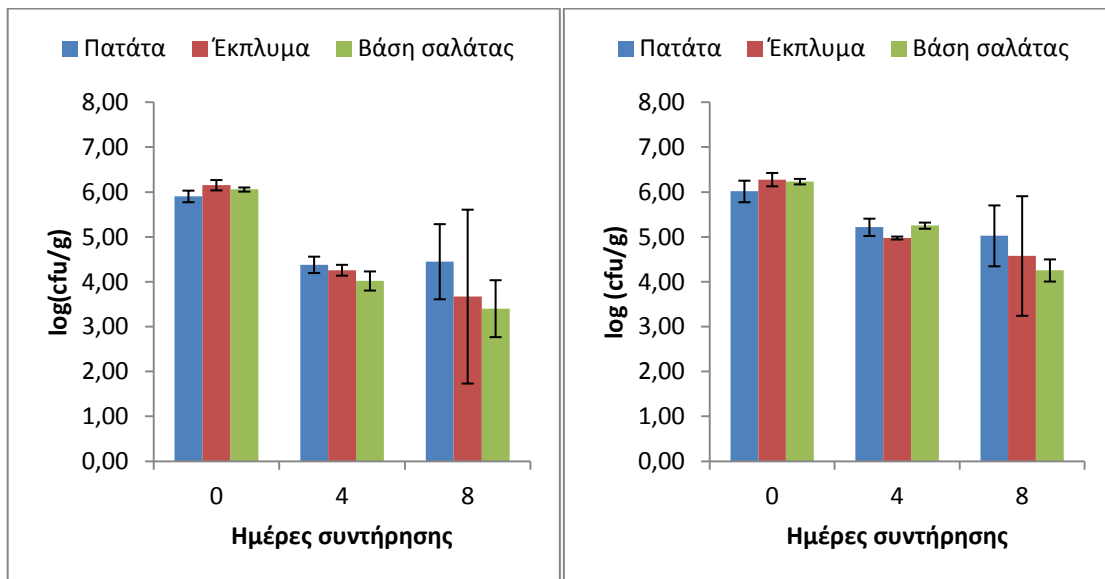
Παρατηρώντας το **Γράφημα 7A** βλέπουμε ότι όσο πιο υψηλό αρχικό pH έχει η βάση σαλάτας τόσο μεγαλύτερη είναι και η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού. Το ίδιο ισχύει και το θρεπτικό υλικό TSA στο **Γράφημα 7B**. Ενώ με την προσθήκη πατάτας σε βάση σαλάτας με pH 3.45 η επιβίωση του παθογόνου αυξάνει περίπου 4 log cfu/g μετά από τέσσερις ημέρες συντήρησης, όπως φαίνεται στο **Γράφημα 8A**. Επίσης, όταν γίνεται προσθήκη πατάτας σε αναλογία 2/1, όπως στο **Γράφημα 8B** έχουμε επιπλέον αύξηση της επιβίωσης σε σχέση με το σχεδιάγραμμα **Γράφημα 8A**. Τα αποτελέσματα είναι τα ίδια και στα αντίστοιχα **Γραφήματα 8A** και **8B**.



(A)

(B)

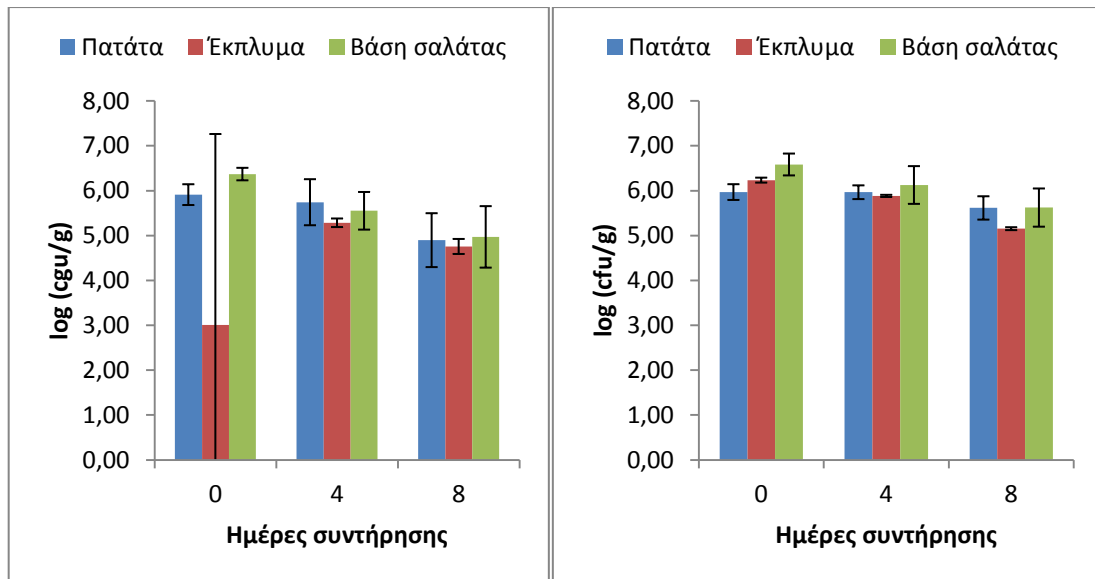
Γράφημα 7: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα βάσης σαλάτας με pH 3.45 και με pH 3.76 και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.



(A)

(B)

Γράφημα 8: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με pH 3.45 & αναλογία πατάτας/βάσης σαλάτας 1/1 και με τρεις διαφορετικούς τρόπους δειγματοληψίας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.



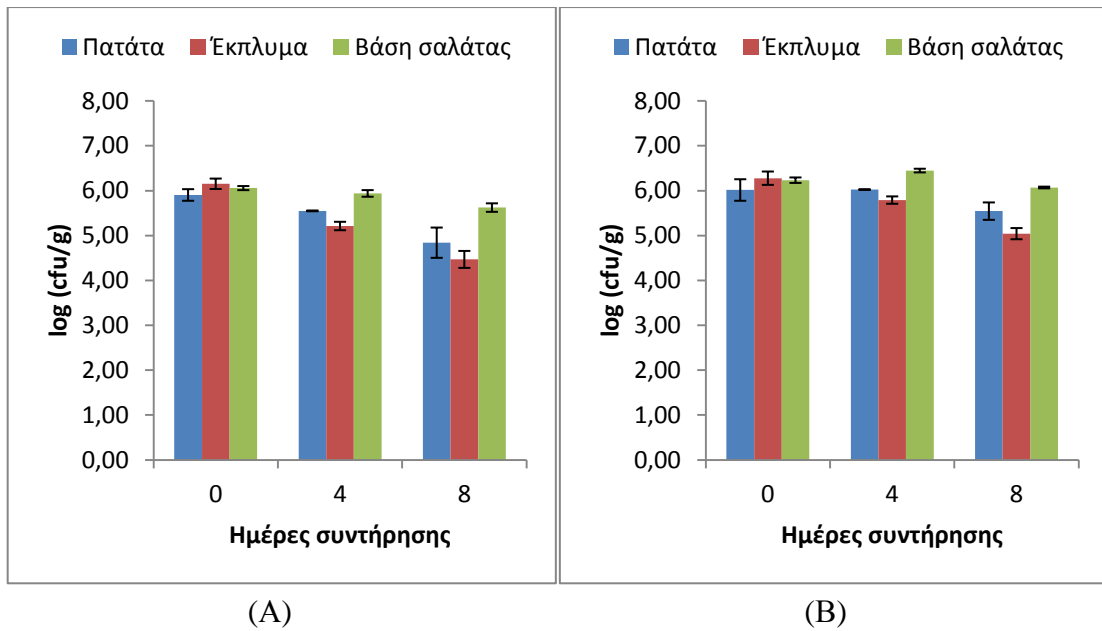
(A)

(B)

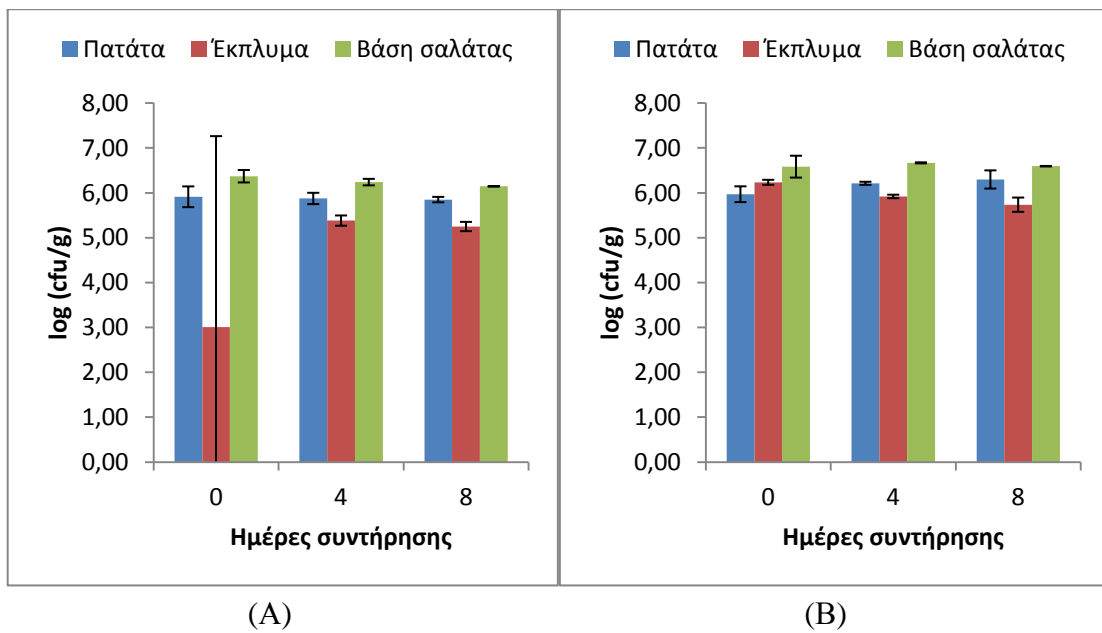
Γράφημα 9: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με pH 3.45 & αναλογία πατάτας/βάσης σαλάτας 2/1 και με τρεις διαφορετικούς τρόπους δειγματοληψίας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Όταν έχουμε δείγματα με αρχικό pH βάσης σαλάτας 3.76 και έχουμε προσθήκη πατάτας σε αναλογία 1/1, όπως στο **Γράφημα 10A**, έχουμε μεγαλύτερη επιβίωση σε σχέση με το **Γράφημα 8A**. Αν συγκρίνουμε το **Γράφημα 10A** με το **12A**, μπορούμε να πούμε ότι η προσθήκη πατάτας σε δείγματα με χαμηλότερες τιμές pH έχει μεγαλύτερη επίδραση από ότι σε δείγματα με μεγαλύτερες τιμές pH. Επίσης, στο **Γράφημα 11A**, όπου έχουμε προσθήκη πατάτας σε αναλογία 2/1 και αρχικό pH βάσης σαλάτας 3.76 δεν παρατηρείται σημαντική μείωση του πληθυσμού του παθογόνου μετά από οχτώ ημέρες συντήρησης.

Ο τρόπος εμβολιασμού των δειγμάτων από τα γραφήματα, αλλά και από τον **Πίνακα 10** παρατηρούμαι ότι δεν έχει κάποια διαφορά στο χρόνο επιβίωσης του παθογόνου.



Γράφημα 10: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με pH 3.76 & αναλογία πατάτας/βάσης σαλάτας 1/1 και με τρεις διαφορετικούς τρόπους δειγματοληψίας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.



Γράφημα 11: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με pH 3.76 & αναλογία πατάτας/βάσης σαλάτας 2/1 και με τρεις διαφορετικούς τρόπους δειγματοληψίας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

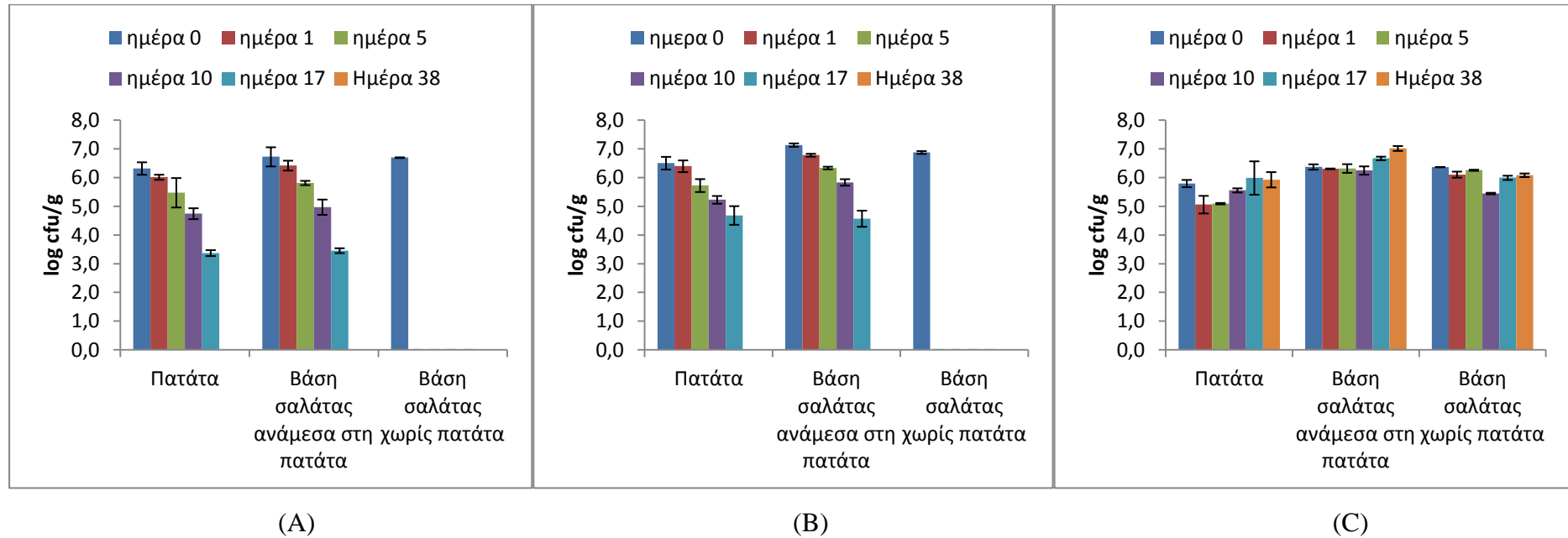
Πίνακας 10: Αποτελέσματα της μέτρησης pH στις διαφορετικές περιπτώσεις δειγμάτων του τρίτου προπειράματος.

ΔΕΙΓΜΑ	ΑΝΑΛΟΓΙΑ (ΠΑΤΑΤΑ/ΒΑΣΗΣ ΣΑΛΑΤΑΣ)	ΤΡΟΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	pH					
			ΗΜΕΡΑ 0		ΗΜΕΡΑ 4		ΗΜΕΡΑ 8	
pH 3.45	2/1	Πατάτα	4.72	±0.07	4.50	±0.00	4.47	±0.04
		Έκπλυμα	4.43	±0.13	4.70	±0.03	4.91	±0.26
		Βάση σαλάτας	3.90	±0.02	4.33	±0.04	4.49	±0.00
	1/1	Πατάτα	4.48	±0.06	4.24	±0.02	4.26	±0.06
		Έκπλυμα	4.28	±0.04	4.35	±0.04	4.62	±0.13
		Βάση σαλάτας	3.86	±0.01	4.09	±0.02	4.20	±0.01
0/1	Βάση σαλάτας	3.67	±0.05	3.69	±0.04	3.72	±0.01	
pH 3.76	2/1	Πατάτα	-	-	4.91	±0.04	4.86	±0.01
		Έκπλυμα	-	-	5.59	±0.13	5.67	±0.18
		Βάση σαλάτας	-	-	4.66	±0.04	4.80	±0.02
	1/1	Πατάτα	-	-	4.53	±0.00	4.59	±0.03
		Έκπλυμα	-	-	4.80	±0.06	5.96	±0.04
		Βάση σαλάτας	-	-	4.39	±0.09	4.55	±0.02
0/1	Βάση σαλάτας	-	-	4.00	±0.04	4.01	±0.01	

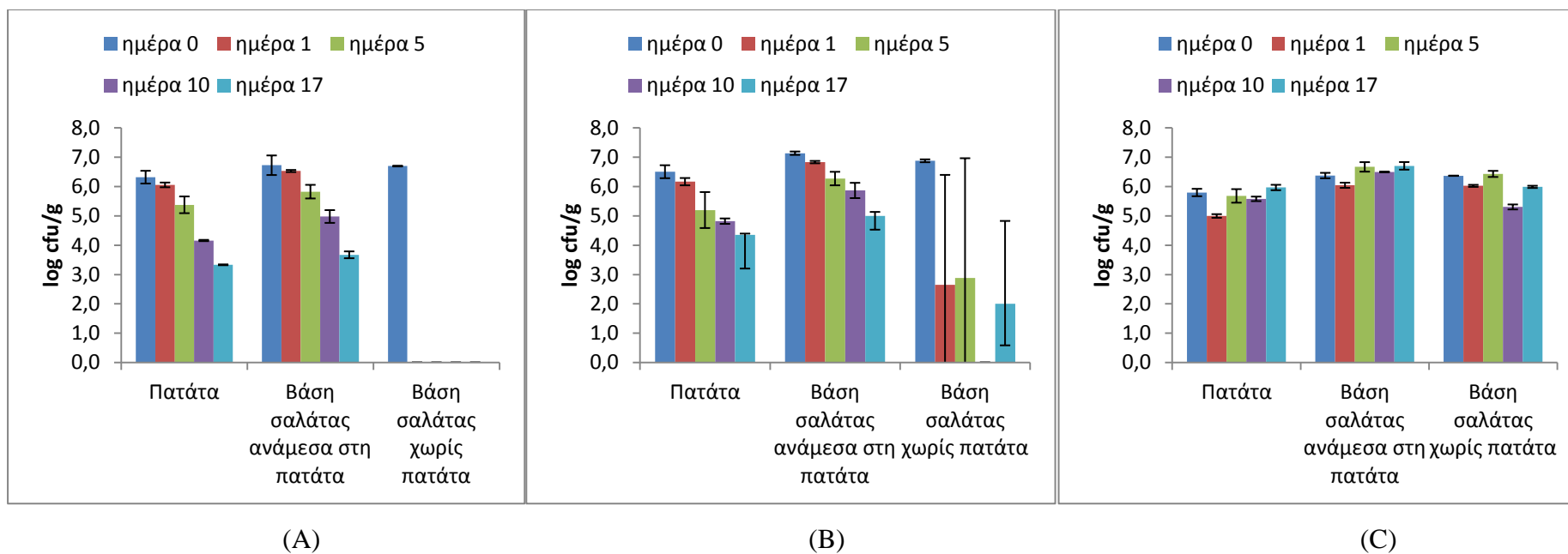
3.1.4. Προπείραμα Δ'

Στο τέταρτο προπείραμα σκοπός ήταν να ελέγξουμε με ποιό τρόπο επηρεάζει η συγκέντρωση των γαλακτωμαποποιητών στην επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. Τρεις τύποι βάσης σαλάτας με διαφορετική συγκέντρωση γαλακτωμαποποιητή (80 pl., 60 pl. και 42 pl). Εκτός από τα θρεπτικά υλικά XLD και TSA, χρησιμοποιήθηκε και το θρεπτικό υλικό MRS, επιλεκτικό για ζύμες και μύκητες. Τέλος, εκτός από τα δείγματα που είχαν σκέτη βάση σαλάτας, υπήρχαν και δείγματα με πατάτα σε αναλογία πατάτας/βάσης σαλάτας 1/1. Στα τελευταία δείγματα πραγματοποιήθηκαν δύο τρόποι δειγματοληψίας, από την πατάτα και από την βάση σαλάτας ανάμεσα στην πατάτα.

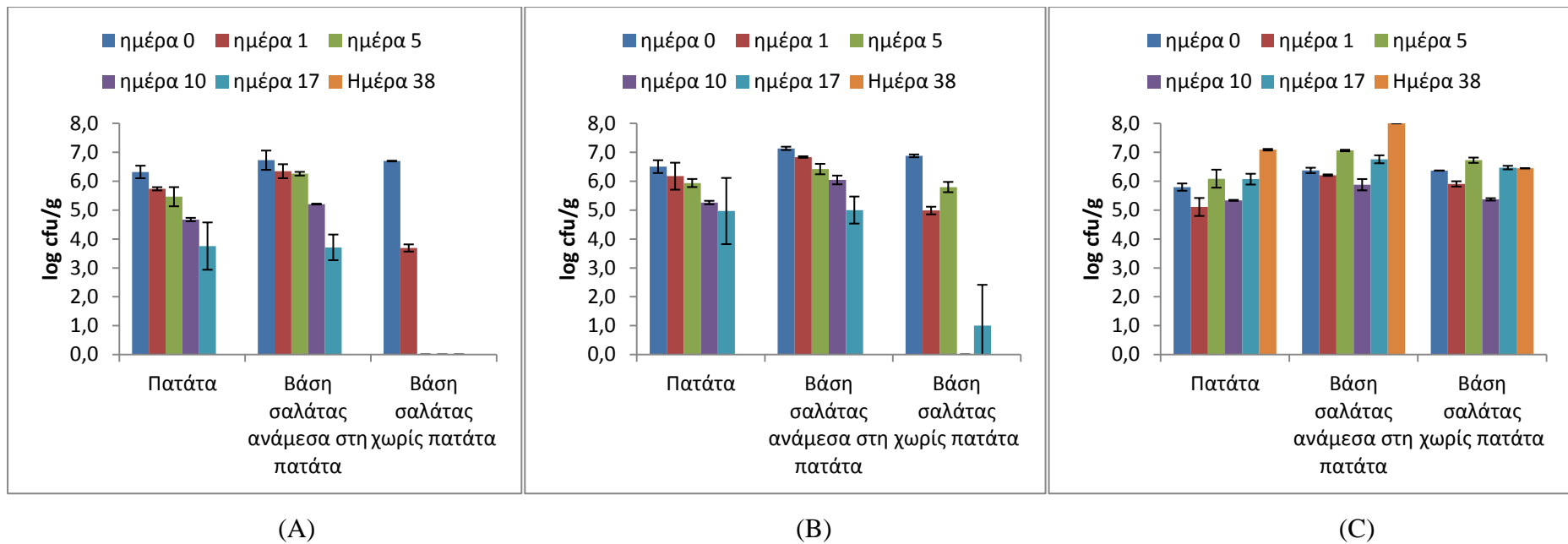
Παρατηρώντας τα **Γραφήματα 12A, 13A και 14A** φαίνεται ότι ο ρυθμός θανάτωσης είναι ο ίδιος ανάμεσα στις βάσεις σαλάτας με διαφορετικό γαλακτωμαποποιητή. Παρατηρείται μία μικρή τάση αύξησης της επιβίωσης σε σχέση με την μείωση του ιξώδους της βάσης σαλάτας, δηλαδή όσο πιο μικρή τιμή έχει το plummet. Επίσης στα ίδια γραφήματα παρατηρούμε ότι δεν έχει καμία διαφορά ο τρόπος δειγματοληψίας στην επιβίωση του παθογόνου. Στα **Γραφήματα 12B, 13B και 14B** όπου έχουμε TSA ως θρεπτικό υλικό βλέπουμε μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης, άρα υπάρχει τραυματισμός των κυττάρων. Επιπλέον, σε αυτά τα γραφήματα φαίνεται πιο ξεκάθαρα ότι η επιβίωση αυξάνεται σε σχέση με το πόσο πηχτή βάση σαλάτας έχουμε. Στα **Γραφήματα 12C, 13C και 14C** παρατηρούμε ότι το επίπεδο του πληθυσμού των ζυμών και των μυκήτων παραμένει σταθερό τόσο κατά την διάρκεια της συντήρησης όσο και στις τρεις διαφορετικές βάσεις σαλάτας. Τέλος, στον **Πίνακα 11** μπορούμε να δούμε ότι τα pH των δειγμάτων παραμένουν σχεδόν σταθερά κατά την διάρκεια της συντήρησης.



Γράφημα 12: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με γαλακτωμαποποιητή 80 pl. και με τρεις διαφορετικούς τρόπους δειγματοληψίας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό για τον παθογόνο (A), μη επιλεκτικό (B) και σε επιλεκτικό για ζύμες και μύκητες (C) υπόστρωμα.



Γράφημα 13: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με γαλακτωμαποποιητή 60 ρl. και με τρεις διαφορετικούς τρόπους δειγματοληψίας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό για τον παθογόνο (A), μη επιλεκτικό (B) και σε επιλεκτικό για ζύμες και μύκητες (C) υπόστρωμα.



Γράφημα 14: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με γαλακτωμαποποιητή 42 ρl. και με τρεις διαφορετικούς τρόπους δειγματοληψίας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό για τον παθογόνο (A), μη επιλεκτικό (B) και σε επιλεκτικό για ζύμες και μύκητες (C) υπόστρωμα.

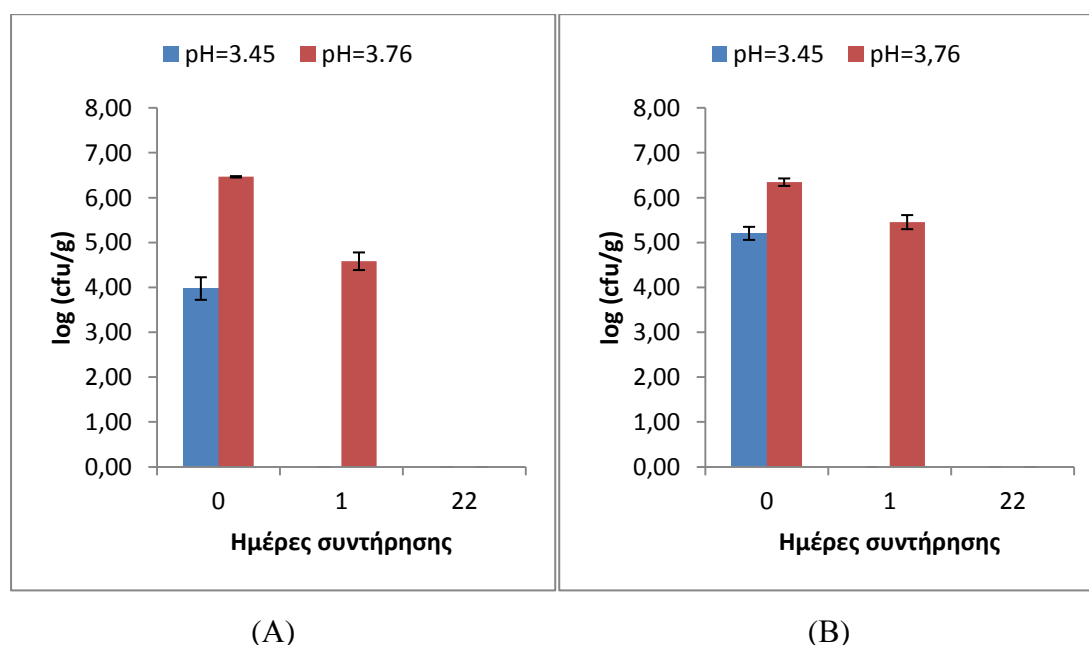
Πίνακας 12: Αποτελέσματα της μέτρησης pH στις διαφορετικές περιπτώσεις δειγμάτων του τέταρτου προπειράματος.

ΔΕΙΓΜΑ	ΑΝΑΛΟΓΙΑ (ΠΑΤΑΤΑ/ΒΑΣΗΣ ΣΑΛΑΤΑΣ)	ΤΡΟΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	pH										
			ΗΜΕΡΑ 0	ΗΜΕΡΑ 1	ΗΜΕΡΑ 5	ΗΜΕΡΑ 10	ΗΜΕΡΑ 17	ΗΜΕΡΑ 38					
80 pl.	1/1	Πατάτα	-	-	4.53 ±0.07	4.54 ±0.03	4.54 ±0.03	4.49 ±0.06	4.40 ±0.01				
		Βάση σαλάτας ανάμεσα στη πατάτα	-	-	4.26 ±0.04	4.37 ±0.06	4.47 ±0.05	4.45 ±0.04	4.40 ±0.02				
	0/1	Βάση σαλάτας χωρίς πατάτα	-	-	3.92 ±0.02	3.94 ±0.02	3.98 ±0.01	4.01 ±0.07	4.01 ±0.00				
60 pl.	1/1	Πατάτα	4.87 ±0.08	4.59 ±0.02	4.52 ±0.01	4.45 ±0.03	4.47 ±0.01	-	-				
		Βάση σαλάτας ανάμεσα στη πατάτα	3.98 ±0.03	4.27 ±0.08	4.38 ±0.04	4.40 ±0.01	4.38 ±0.04	-	-				
	0/1	Βάση σαλάτας χωρίς πατάτα	3.92 ±0.02	3.92 ±0.00	3.96 ±0.01	3.97 ±0.04	4.02 ±0.02	-	-				
42 pl.	1/1	Πατάτα	-	-	4.58 ±0.08	4.54 ±0.06	4.58 ±0.01	4.59 ±0.01	4.34 ±0.02				
		Βάση σαλάτας ανάμεσα στη πατάτα	-	-	4.25 ±0.01	4.42 ±0.04	4.50 ±0.03	4.35 ±0.13	4.33 ±0.03				
	0/1	Βάση σαλάτας χωρίς πατάτα	-	-	4.06 ±0.02	3.99 ±0.04	4.01 ±0.00	4.07 ±0.04	4.09 ±0.00				

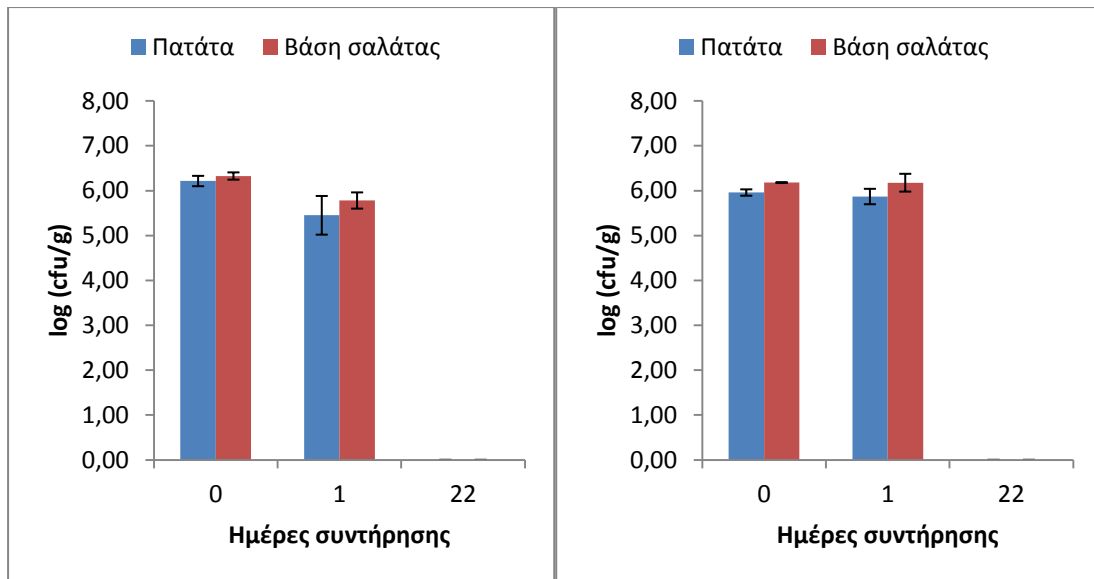
3.1.5. Προπείραμα E'

Στο πέμπτο προπείραμα στόχος ήταν να ελέγξουμε εάν ο κρίσιμος παράγοντας που επηρεάζει περισσότερο την επιβίωση του παθογόνου είναι το pH ή η ποσότητα της πατάτας. Συγκρίνουμε τα δείγματα που είχαν τελικό pH το ίδιο με μοναδική διαφορά το γεγονός ότι στην μία περίπτωση είχαμε σκέτη βάση σαλάτας με pH 3.76, ενώ στην άλλη είχαμε βάση σαλάτας με pH 3.45 και προστιθέμενη πατάτα σε αναλογία 1/1.

Την πρώτη ημέρα συντήρησης σε δείγμα βάσης σαλάτας με pH 3.76, (Γράφημα 15A) και την πρώτη ημέρα συντήρησης στην βάση σαλάτας όπως φαίνεται στο Γράφημα 16A έχουμε το ίδιο τελικό pH (Πίνακας 12), όμως στην δεύτερη περίπτωση έχουμε 1 log cfu/g και συνεπώς υψηλότερη επιβίωση. Άρα, ο κρίσιμος παράγοντας είναι το pH για την επιβίωση του παθογόνου, αυτό όμως επηρεάζεται και διαμορφώνεται και από την συγκέντρωση της πατάτας που προστίθεται. Επίσης, φαίνεται ότι ο τρόπος δειγματοληψίας (πατάτα ή βάση σαλάτας) δεν έχει καμία διαφορά στην επιβίωση.



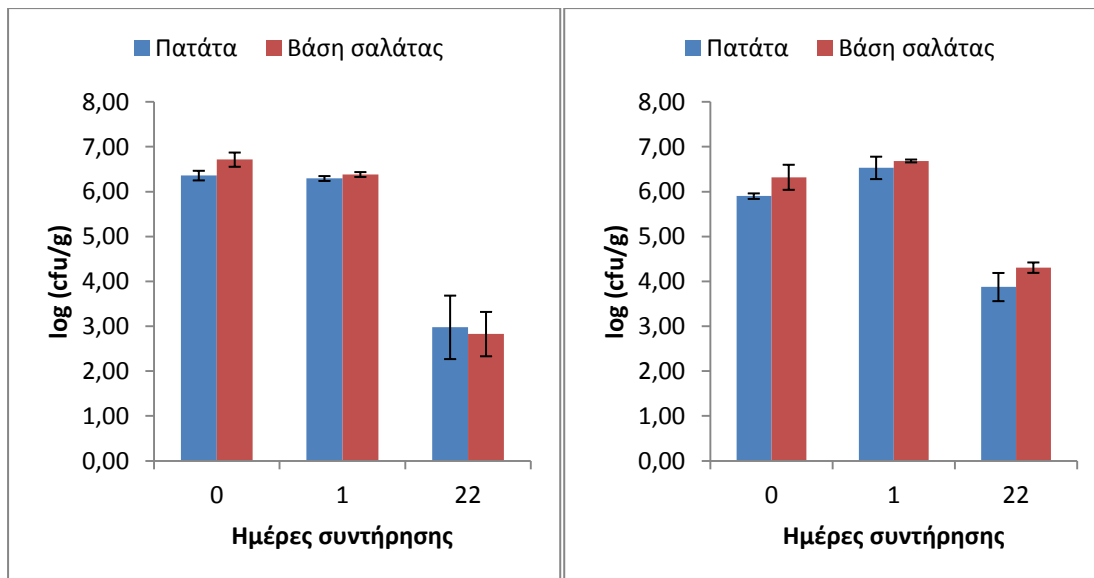
Γράφημα 15: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα βάσης σαλάτας με pH 3.45 και 3.76 αντίστοιχα και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.



(A)

(B)

Γράφημα 16: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με αναλογία πατάτας/βάσης σαλάτας:1/1 και με δύο διαφορετικούς τρόπους δειγματοληψίας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.



(A)

(B)

Γράφημα 17: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με αναλογία πατάτας/βάσης σαλάτας:2/1 και με δύο διαφορετικούς τρόπους δειγματοληψίας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα της μέτρησης pH στις διαφορετικές περιπτώσεις δειγμάτων του πέμπτου προπείραματος.

ΔΕΙΓΜΑ	ΑΝΑΛΟΓΙΑ (ΠΑΤΑΤΑ/ΒΑΣΗ ΣΑΛΑΤΑΣ)	ΤΡΟΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	pH			
			ΗΜΕΡΑ 0	ΗΜΕΡΑ 1	ΗΜΕΡΑ 22	
pH 3.45	2/1	Πατάτα	4.76 ±0.07	4.55 ±0.12	4.47 ±0.03	
		Βάση σαλάτας	3.73 ±0.05	4.26 ±0.02	4.47 ±0.01	
	1/1	Πατάτα	4.61 ±0.08	4.31 ±0.09	4.25 ±0.05	
		Βάση σαλάτας	3.67 ±0.07	4.01 ±0.04	4.25 ±0.02	
	0/1	Βάση σαλάτας	3.68 ±0.06	3.70 ±0.01	3.71 ±0.02	
pH 3.76	0/1	Βάση σαλάτας	3.97 ±0.05	3.98 ±0.00	3.97 ±0.00	

3.2. Αποτελέσματα πειραματικής διαδικασίας

Η πατάτα έχει pH που κυμαίνεται από 5.40 έως 5.90. Όμως όταν αυτή προστίθεται σε βάση σαλάτας το pH του τελικού προϊόντος αυξάνεται ανάλογα με την συγκέντρωση της πατάτας, κυμαινόμενο μεταξύ 3.85 (ποσοστό πατάτας 33.3%) και 5.50 (ποσοστό πατάτας 75%). Εκτός όμως από την ποσότητα της πατάτας που προστίθεται το συνολικό τελικό pH της πατατοσαλάτας επηρεάζεται και από το μέσο όξυνσης (οξικό ή γαλακτικό οξύ) και το αρχικό pH της βάσης σαλάτας (3.6, 3.9, 4.1 και 4.4), καθώς και την παρουσία ή μη συντηρητικού (σορβικό κάλιο 0.1%).

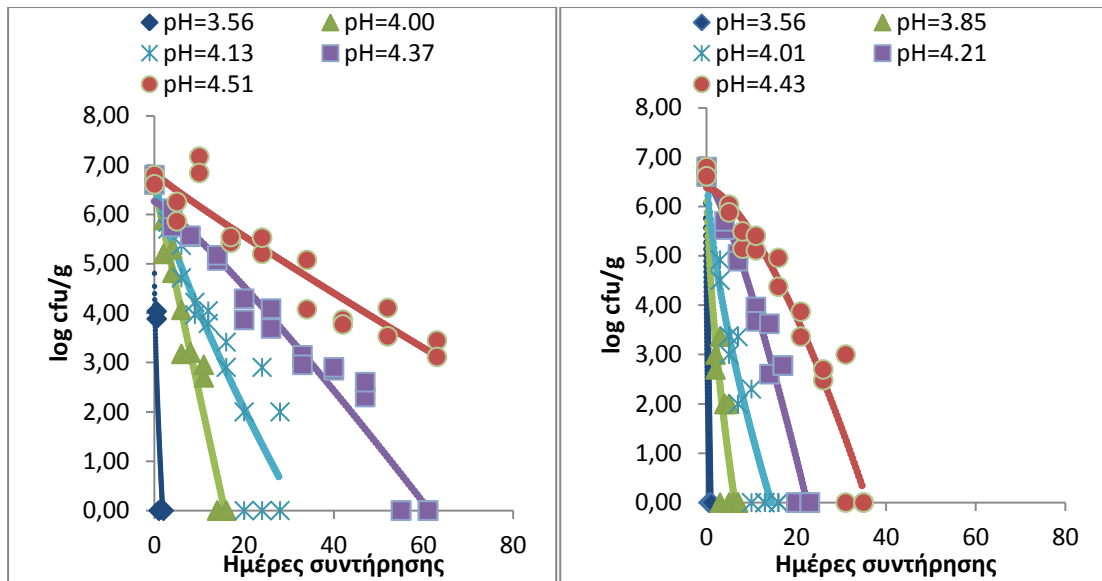
Στόχος, του κύριου πειράματος ήταν η αξιολόγηση της επιβίωσης του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. στους ογδόντα διαφορετικούς συνδυασμούς δειγμάτων πατατοσαλάτας. Τα αποτελέσματα που δείχνουν τη συσχέτιση του pH με την ποσότητα της προστιθέμενης πατάτας, με τα διαφορετικά οξέα και με τη παρουσία ή απουσία συντηρητικού σε θρεπτικό υλικό XLD και TSA φαίνονται στο παράρτημα Β. Οι λογαριθμικοί πληθυσμοί του παθογόνου προσαρμόστηκαν από το πρωτογενές μοντέλο Weibull (Mafart *et al.*, 2002), με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος GInaFiT με σκοπό να υπολογιστούν οι τιμές της παραμέτρου «δ», δηλαδή του χρόνου που απαιτείται για την πρώτη λογαριθμική μείωση του αρχικού πληθυσμού.

Παρατηρούμε ότι ο πληθυσμός του παθογόνου είχε ένα μεγάλο εύρος συμπεριφοράς. Για παράδειγμα, στην περίπτωση που είχαμε γαλακτικό οξύ, συντηρητικό, αρχικό pH 3.6 και καθόλου προσθήκη πατάτας, ότι ο μικροοργανισμός μηδενίστηκε μέσα στις πρώτες έξι ώρες από τον εμβολιασμό (**Γράφημα 19B**). Αντιθέτως, στην περίπτωση που είχαμε οξικό οξύ, pH 4.4, συντηρητικό και 75% πατάτα, ο πληθυσμός είχε μειωθεί μόνο περίπου 2 log cfu/g μετά από 60 ημέρες συντήρησης (**Γράφημα 24B**). Πάντως σε καμία από τις ογδόντα περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε αύξηση.

3.2.1. Επίδραση του αρχικού pH της βάσης σαλάτας στην επιβίωση του παθογόνου

- Αρχικό pH 3.6

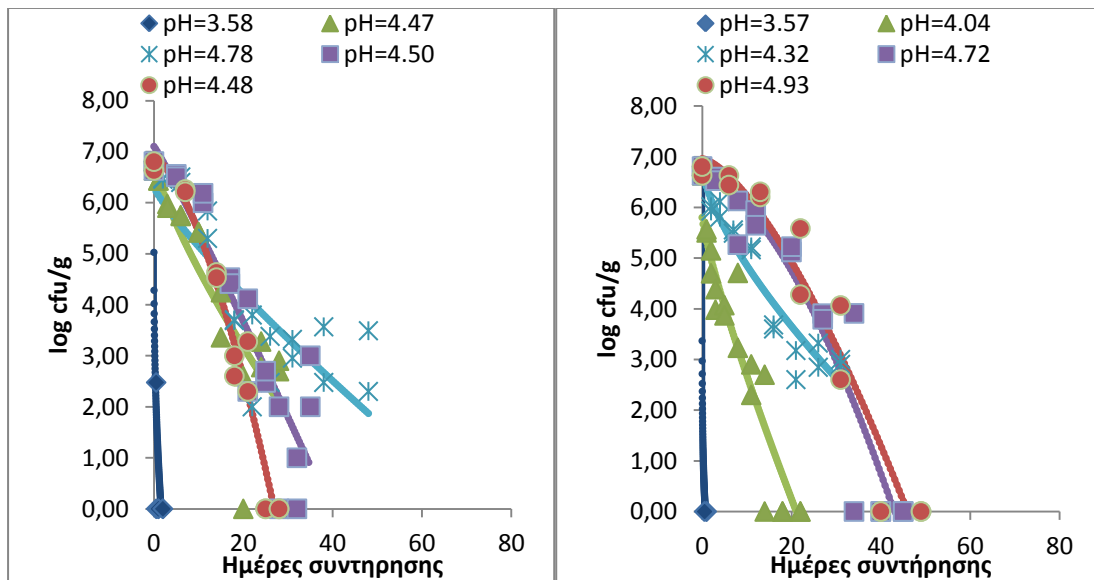
Στην περίπτωση που δεν έχουμε προσθήκη πατάτας η θανάτωση είναι άμεση (μετά από λίγες ώρες) με ελάχιστα πιο άμεση θανάτωση όταν έχουμε συντηρητικό (**Γραφήματα 18A, 18B, 19A και 19B**). Συγκεκριμένα, η τιμή του «δ» στο οξικό οξύ (-) είναι 0.16 ημέρες, στο οξικό οξύ (+) είναι 0.06 ημέρες. Στο γαλακτικό οξύ (-) είναι 0.04 και στο γαλακτικό οξύ (+) είναι 0 (**Πίνακα 13**). Στην ενδιάμεση περίπτωση (50% πατάτα) οι αντίστοιχες τιμές «δ» για το οξικό οξύ (-), οξικό οξύ (+), γαλακτικό οξύ (-) και γαλακτικό οξύ (+) είναι 2.75, 0.76, 8.34 και 3.92. Όταν έχουμε προσθήκη πατάτας σε ποσοστό 75%, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού μειώνεται πολύ αργά στο οξικό οξύ (-) ($\approx 3 \log \text{ cfu/g}$ σε περισσότερες από 60 ημέρες), ενώ στο γαλακτικό οξύ (+) η ίδια μείωση παρατηρείται σε περίπου 30 ημέρες, στο οξικό οξύ (+) αντίστοιχα είναι περίπου 20 ημέρες, ενώ τέλος στο γαλακτικό οξύ (-) μηδενίζεται στις περίπου 18 ημέρες.



(A)

(B)

Γράφημα 18: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε πατατοσαλάτες με αρχικό pH βάσης σαλάτας 3.6 και συγκέντρωση πατάτας 0% (♦), 33.3% (▲), 50% (×), 66.7% (■) και 75% (●). Το αρχικό pH της βάσης σαλάτας ρυθμίστηκε με οξικό οξύ και (A) χωρίς συντηρητικό και (B) με συντηρητικό. Στο υπόμνημα φαίνονται οι τελικές τιμές του pH των δειγμάτων πατατοσαλάτας.



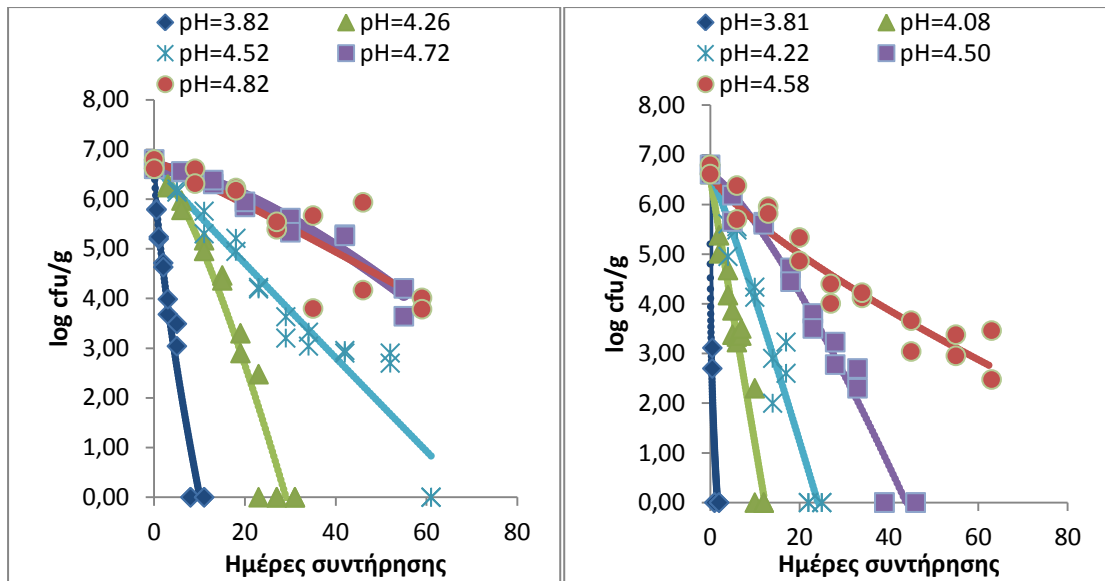
(A)

(B)

Γράφημα 19: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε πατατοσαλάτες με αρχικό pH βάσης σαλάτας 3.6 και συγκέντρωση πατάτας 0% (♦), 33.3% (▲), 50% (×), 66.7% (■) και 75% (●). Το αρχικό pH της βάσης σαλάτας ρυθμίστηκε με γαλακτικό οξύ και (A) χωρίς συντηρητικό και (B) με συντηρητικό. Στο υπόμνημα φαίνονται οι τελικές τιμές του pH των δειγμάτων πατατοσαλάτας.

- Αρχικό pH 3.9

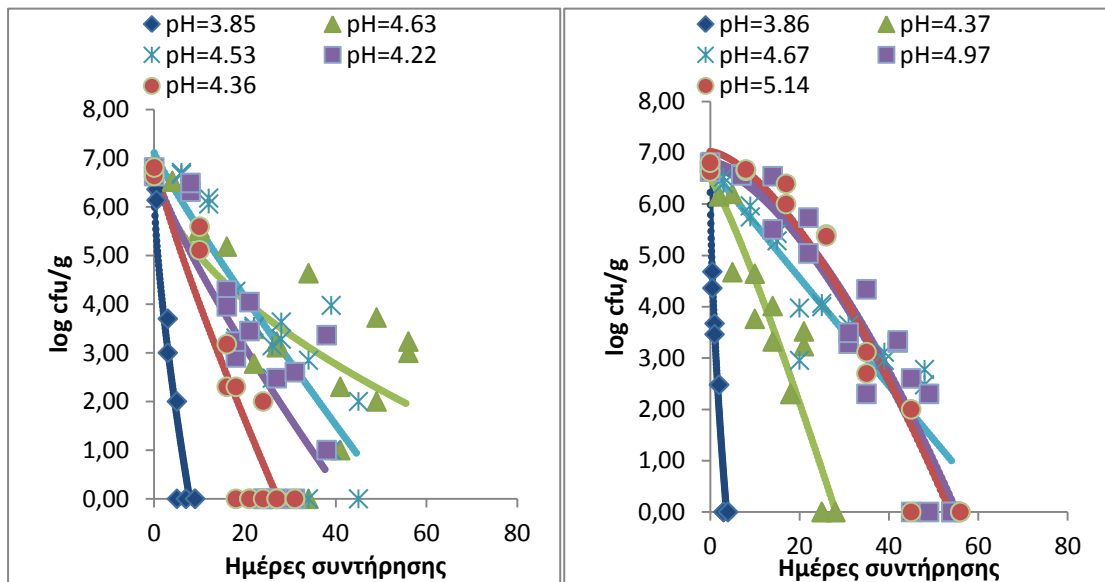
Όταν η βάση σαλάτας έχει αρχικό pH ίσο με 3.9 (**Γραφήματα 20A, 20B, 21A και 21B**) και όταν δεν έχουμε προσθήκη πατάτας η θανάτωση γίνεται μέσα σε περίπου μισή ημέρα (12 h). Επίσης, είναι πιο άμεση στις περιπτώσεις που έχουμε συντηρητικό όπως φαίνεται στον **Πίνακα 13**. Όταν έχουμε 50% προστιθέμενη πατάτα στις περιπτώσεις οξικό οξύ (-), οξικό οξύ (+), γαλακτικό οξύ (-) και γαλακτικό οξύ (+) οι αντίστοιχες τιμές της παραμέτρου «δ» είναι 10.16, 4.36, 6.10 και 9.22. Όταν έχουμε 75% προσθήκη πατάτας, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού μηδενίζεται πιο γρήγορα στο γαλακτικό οξύ (-) (≈ 25 ημέρες) και στο γαλακτικό οξύ (+) (≈ 55 ημέρες). Ενώ όταν έχουμε οξικό οξύ (+) μετά από 60 ημέρες συντήρησης έχουμε μείωση της τάξεως 4 log cfu/g και 3 log cfu/g όταν έχουμε οξικό οξύ (-). Γενικά παρατηρείται ότι έχουμε καλύτερα αποτελέσματα στην περίπτωση του γαλακτικού οξέος χωρίς συντηρητικό και με μικρότερη συγκέντρωση πατάτας. Οι τιμές «δ» των υπόλοιπων περιπτώσεων φαίνονται στον **Πίνακα 13**.



(A)

(B)

Γράφημα 20: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε πατατοσαλάτες με αρχικό pH βάσης σαλάτας 3.9 και συγκέντρωση πατάτας 0% (♦), 33.3% (▲), 50% (×), 66.7% (■) και 75% (●). Το αρχικό pH της βάσης σαλάτας ρυθμίστηκε με οξικό οξύ και (A) χωρίς συντηρητικό και (B) με συντηρητικό. Στο υπόμνημα φαίνονται οι τελικές τιμές του pH των δειγμάτων πατατοσαλάτας.



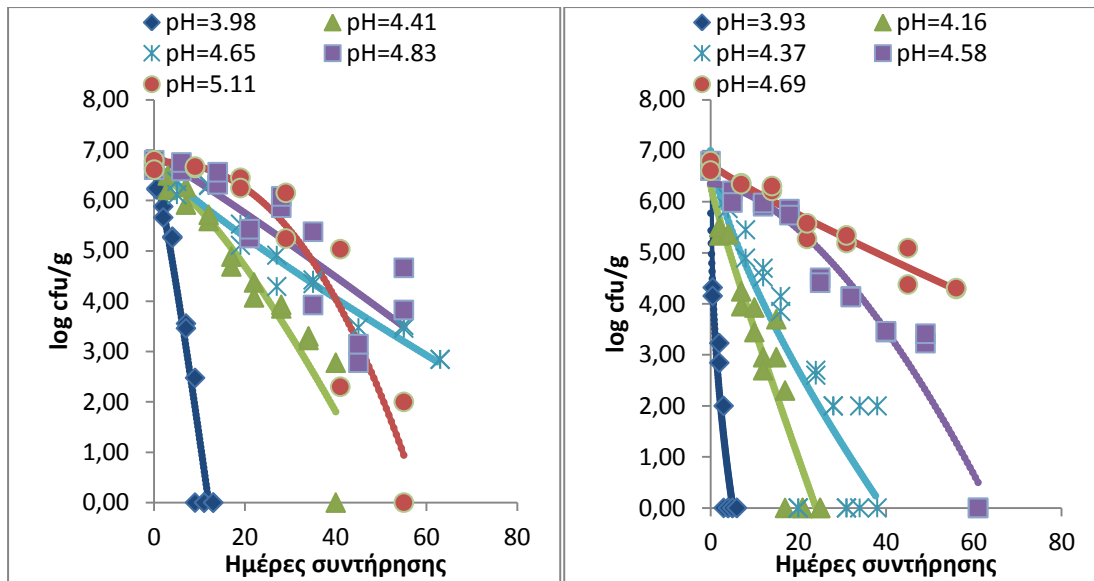
(A)

(B)

Γράφημα 21: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε πατατοσαλάτες με αρχικό pH βάσης σαλάτας 3.9 και συγκέντρωση πατάτας 0% (♦), 33.3% (▲), 50% (×), 66.7% (■) και 75% (●). Το αρχικό pH της βάσης σαλάτας ρυθμίστηκε με γαλακτικό οξύ και (A) χωρίς συντηρητικό και (B) με συντηρητικό. Στο υπόμνημα φαίνονται οι τελικές τιμές του pH των δειγμάτων πατατοσαλάτας.

- Αρχικό pH 4.1

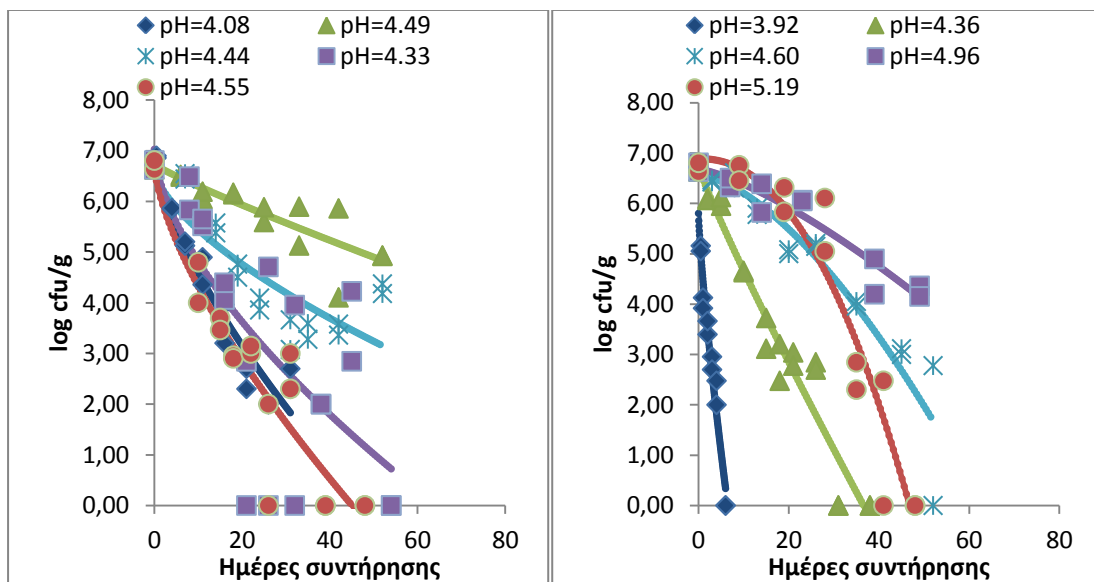
Σε αρχικό pH βάσης σαλάτας ίσο με 4.1 (**Γραφήματα 22A, 22B, 23A και 23B**) όταν δεν έχουμε προσθήκη πατάτας η θανάτωση γίνεται μέσα σε περίπου 5 ημέρες συντήρησης και είναι πιο άμεση όταν έχουμε συντηρητικό. Όταν έχουμε 75% προσθήκη πατάτας, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού μηδενίζεται πιο γρήγορα στο γαλακτικό οξύ-χωρίς (-) (≈ 45 ημέρες) και στο γαλακτικό οξύ (+) (≈ 50 ημέρες). Ενώ, μετά από 60 ημέρες συντήρησης όταν έχουμε οξικό οξύ (+) έχουμε μείωση της τάξεως 3 log cfu/g και τα δείγματα με οξικό οξύ (-) μηδενίζονται. Όταν έχουμε 50% προστιθέμενη πατάτα στις περιπτώσεις οξικό οξύ (-), οξικό οξύ (+), γαλακτικό οξύ (-) και γαλακτικό οξύ (+) οι αντίστοιχες τιμές της παραμέτρου «δ» είναι 12.17, 2.60, 7.42 και 19.19. Οι υπόλοιπες τιμές «δ» φαίνονται στον **Πίνακα 13**.



(A)

(B)

Γράφημα 22: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε πατατοσαλάτες με αρχικό pH βάσης σαλάτας 4.1 και συγκέντρωση πατάτας 0% (♦), 33.3% (▲), 50% (×), 66.7% (■) και 75% (●). Το αρχικό pH της βάσης σαλάτας ρυθμίστηκε με οξικό οξύ και (A) χωρίς συντηρητικό και (B) με συντηρητικό. Στο υπόμνημα φαίνονται οι τελικές τιμές του pH των δειγμάτων πατατοσαλάτας.



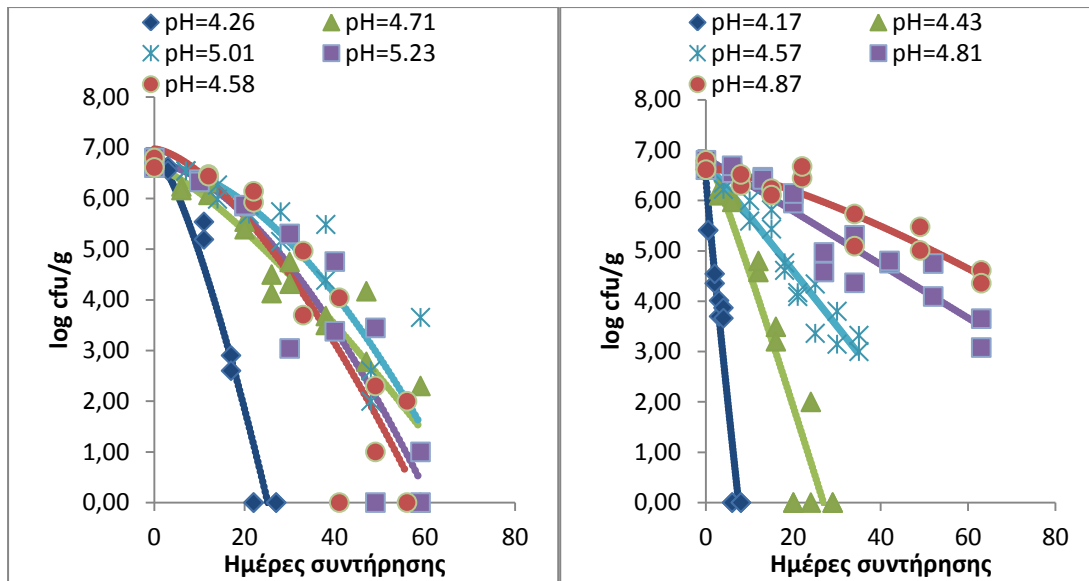
(A)

(B)

Γράφημα 23: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε πατατοσαλάτες με αρχικό pH βάσης σαλάτας 4.1 και συγκέντρωση πατάτας 0% (♦), 33.3% (▲), 50% (×), 66.7% (■) και 75% (●). Το αρχικό pH της βάσης σαλάτας ρυθμίστηκε με γαλακτικό οξύ και (A) χωρίς συντηρητικό και (B) με συντηρητικό. Στο υπόμνημα φαίνονται οι τελικές τιμές του pH των δειγμάτων πατατοσαλάτας.

- Αρχικό pH 4.4

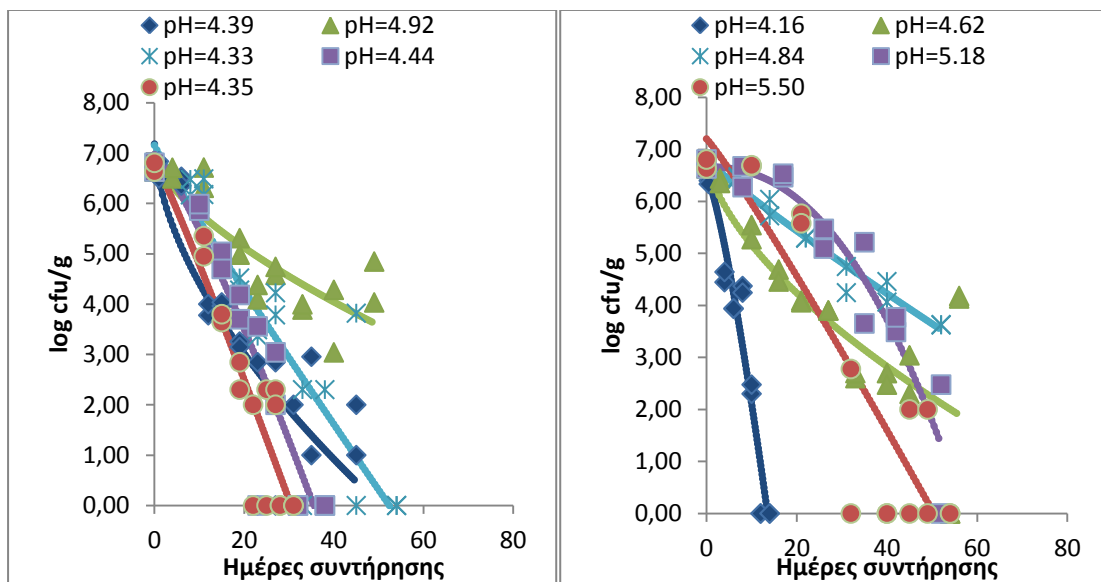
Τέλος, για αρχικό pH ίσο με 4.4 (**Γραφήματα 24A, 24B, 25A και 25B**) όταν δεν έχουμε προσθήκη πατάτας η θανάτωση γίνεται σε περίπου 5 ημέρες συντήρησης και είναι πιο άμεση όταν έχουμε οξικό οξύ (+) και μετά γαλακτικό οξύ (+), ενώ όταν έχουμε οξικό οξύ (-) μηδενίζεται στις περίπου 22 ημέρες συντήρησης. Όταν έχουμε 75% προσθήκη πατάτας, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού μηδενίζεται πιο γρήγορα στο γαλακτικό οξύ (-) (≈ 30 ημέρες) και στο γαλακτικό οξύ (+) (≈ 50 ημέρες). Ενώ, όταν έχουμε οξικό οξύ (+) μετά από περίπου 60 ημέρες συντήρησης έχουμε μείωση της τάξεως $3 \log \text{ cfu/g}$ και μηδενισμό για τα δείγματα με οξικό οξύ (-). Όταν έχουμε 50% προστιθέμενη πατάτα στις περιπτώσεις οξικό οξύ (-), οξικό οξύ (+), γαλακτικό οξύ (-) και γαλακτικό οξύ (+) οι αντίστοιχες τιμές «δ» είναι 23.64, 9.33, 6.57 και 14.02. Οι υπόλοιπες τιμές της παραμέτρου «δ» φαίνονται στον **Πίνακα 13**.



(A)

(B)

Γράφημα 24: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε πατατοσαλάτες με αρχικό pH βάσης σαλάτας 4.4 και συγκέντρωση πατάτας 0% (♦), 33.3% (▲), 50% (×), 66.7% (■) και 75% (●). Το αρχικό pH της βάσης σαλάτας ρυθμίστηκε με οξικό οξύ και (A) χωρίς συντηρητικό και (B) με συντηρητικό. Στο υπόμνημα φαίνονται οι τελικές τιμές του pH των δειγμάτων πατατοσαλάτας.

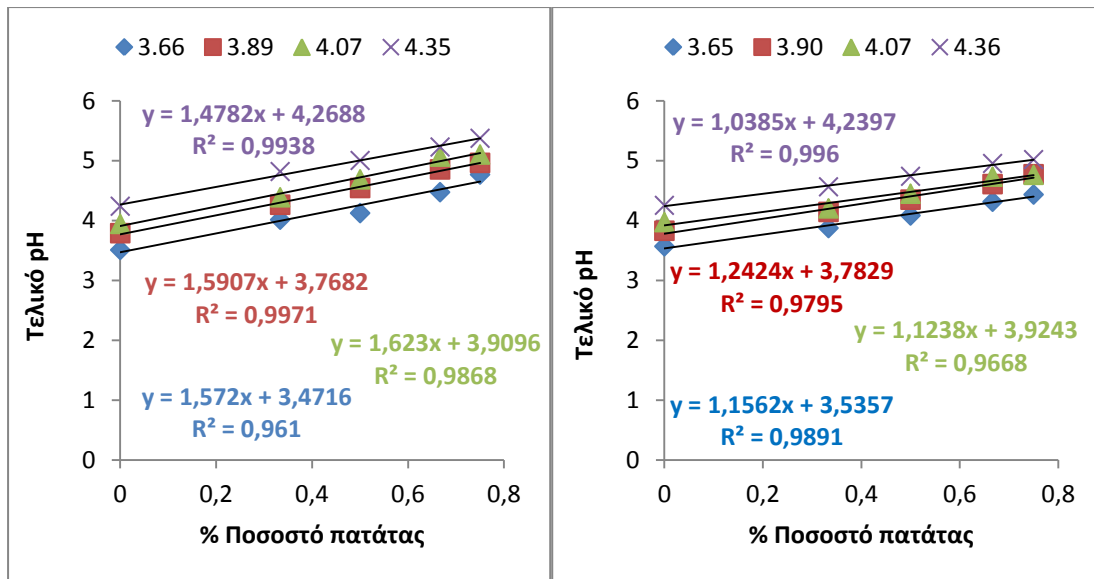


(A)

(B)

Γράφημα 25: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε πατατοσαλάτες με αρχικό pH βάσης σαλάτας 4.4 και συγκέντρωση πατάτας 0% (♦), 33.3% (▲), 50% (×), 66.7% (■) και 75% (●). Το αρχικό pH της βάσης σαλάτας ρυθμίστηκε με γαλακτικό οξύ και (A) χωρίς συντηρητικό και (B) με συντηρητικό. Στο υπόμνημα φαίνονται οι τελικές τιμές του pH των δειγμάτων πατατοσαλάτας.

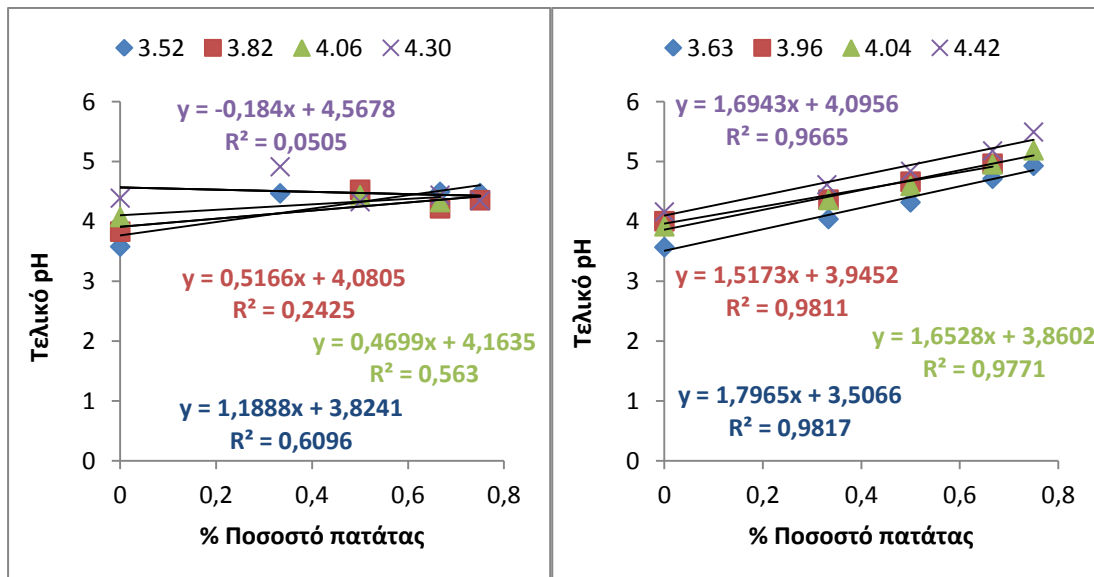
Συνεπώς, όσο πιο χαμηλό είναι το αρχικό pH της βάσης σαλάτας τόσο πιο γρήγορη είναι η θανάτωση ή μείωση του παθογόνου μικροοργανισμού, λόγω της οξύτητας της βάσης σαλάτας (Erickson & Jenkins, 1991; Glass & Doyle, 1991; Erickson *et al.*, 1993; Hwang & Tamplin, 2005). Επίσης, όταν η κρέμα βάσης έχει γενικά $\text{pH} < 4.0$, δε μπορεί εύκολα να γίνει επιμόλυνση από κάποιο παθογόνο μικροοργανισμό ή αυτός να αναπτυχθεί (Erickson *et al.*, 1991 & 1993; Smittle, 1977). Όμως αυτό ισχύει όταν η βάση σαλάτας είναι σκέτη, διότι με την προσθήκη της πατάτας το pH αυξάνει με αποτέλεσμα να είναι περισσότερο δυνατή η επιβίωση του παθογόνου *Salmonella* spp. Εκτός όμως από το αρχικό pH της βάσης σαλάτας, στην επιβίωση του παθογόνου σημαντικό ρόλο παίζει και η δραστηριότητα της ενδογενούς χλωρίδας της βάσης σαλάτας. Αυτό παρατηρείται στις περιπτώσεις που δεν έχουμε συντηρητικό, καθώς και στο γαλακτικό οξύ (+). Λόγω αυτής της δραστηριότητας, σε αυτές τις περιπτώσεις το τελικό pH μειώθηκε κατά την διάρκεια της συντήρησης. Άρα η θανάτωση του παθογόνου σε αυτές τις περιπτώσεις είναι λιγότερο εξαρτώμενη από το pH που διαμορφώνεται αμέσως μετά την ανάμιξη της βάσης σαλάτας με την πατάτα, αλλά εξαρτάται πιο πολύ από το δυναμικά μεταβαλλόμενο pH κατά την διάρκεια της συντήρησης. Πρόσφατες έρευνες παρουσίασαν μείωση στο pH κατά την αλλοίωση μαγιονέζας (Fialova *et al.*, 2007). Οι Borch *et al.*, (1996) παρατήρησαν παρόμοια μείωση του pH κατά την αλλοίωση κρέατος λόγω της δράσης ορισμένων γαλακτικών βακτηρίων. Αντίστοιχη μείωση στην τιμή του pH παρατηρήθηκε και κατά την ζύμωση γάλακτος (Alvarez-Martin *et al.*, 2007). Όμως η μείωση του pH των δειγμάτων εξαρτάται από την θερμοκρασία συντήρησης. Όσο μικρότερη είναι η θερμοκρασία που συντηρήθηκαν, τόσο μικρότερη είναι και η μείωση που παρουσιάζει το τελικό pH τους. Όπως έχει γίνει γνωστό και από άλλες έρευνες, αυτό οφείλεται στην μειωμένη ικανότητα των γαλακτικών βακτηρίων να παράγουν γαλακτικό οξύ σε χαμηλές θερμοκρασίες (Adamberg *et al.*, 2002). Επίσης, η επιβίωση του παθογόνου οφείλεται στο γεγονός ότι όσο η θερμοκρασία συντήρησης απομακρύνεται από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού, βασικό μέλημα των κυττάρων είναι η επιβίωση ενάντια στις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος και δευτερευόντως ο πολλαπλασιασμός τους. Πληθώρα άλλων ερευνών που έχουν γίνει για την επιβίωση του *L. monocytogenes*, επιβεβαιώνουν την παρατήρηση ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει αυξημένη επιβίωση στις χαμηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με τις υψηλότερες (Allan *et al.*, 2004; Beuchat & Brackett, 1990; Conner *et al.*, 1986).



(A)

(B)

Γράφημα 26: Επίδραση του αρχικού pH (υπόμνημα) της βάσης σαλάτας και της συγκέντρωσης της πατάτας στο τελικό pH σε δείγματα πατατοσαλάτας με οξικό οξύ (A) χωρίς συντηρητικό και (B) με συντηρητικό.



(A)

(B)

Γράφημα 27: Επίδραση του αρχικού pH (υπόμνημα) της βάσης σαλάτας και της συγκέντρωσης της πατάτας στο τελικό pH σε δείγματα πατατοσαλάτας με γαλακτικό οξύ (A) χωρίς συντηρητικό και (B) με συντηρητικό.

3.2.2. Επίδραση της συγκέντρωσης πατάτας στην επιβίωση του παθογόνου

Η πατάτα περιέχει άμυλο, άρα αποτελεί ένα υπόστρωμα πλούσιο σε υδατάνθρακες. Επίσης έχει την ικανότητα να μεταβάλλει το pH μόλις προστίθεται στη βάση σαλάτας (ρυθμιστική ικανότητα), αυξάνοντας το μέσα στις πρώτες 12-24 ώρες. Όσο πιο υψηλής θρεπτικής αξίας είναι το επιπλέον συστατικό που προστίθεται, τόσο μεγαλύτερη ρυθμιστική ικανότητα έχει, συνεπώς, τόσο πιο πολύ ενισχύει την επιβίωση, αλλά και την αύξηση του μικροοργανισμού σε σαλάτες που συντηρούνται στους 4-12 °C (Hwang & Tamplin 2005; Hwang, 2005). Συνεπώς, σε σύγκριση με άλλα πρόσθετα σε σαλάτες τύπου-deli, όπως για παράδειγμα το κοτόπουλο, η πατάτα δεν είναι αρκετά ευνοϊκή/θρεπτική για την επιβίωση του μικροοργανισμού. Η ανικανότητα του παθογόνου *Salmonella* spp. να επιβιώνει στην πατατοσαλάτα, υποδεικνύει ότι υπάρχει λιγότερος λόγος ανησυχίας επιμόλυνσης από παθογόνο στην πατατοσαλάτα σε σχέση με άλλου τύπου σαλάτα, όπως για παράδειγμα κοτοσαλάτα.

Στην περίπτωση που δεν είχαμε προσθήκη πατάτας (αναλογία πατάτας/βάση σαλάτας: 0/1) οι τιμές «δ» κυμαινόταν από 0, στην περίπτωση του γαλακτικού οξέως (+) και με αρχικό pH 3.6, μέχρι 6.12 στην περίπτωση του οξικού οξέως (-) και με αρχικό pH 4.4.

Στην περίπτωση που είχαμε προσθήκη πατάτας σε ποσοστό 33.3% (αναλογία πατάτας/βάση σαλάτας: 0.5/1), η τιμή «δ» κυμαινόταν από 0.29, στην περίπτωση του οξικού οξέως (+) και με αρχικό pH 3.6, μέχρι 25.69 στην περίπτωση του γαλακτικού οξέως (-) και με αρχικό pH 4.1.

Ενώ στην περίπτωση που είχαμε προσθήκη πατάτας σε ποσοστό 50% (αναλογία πατάτας/βάση σαλάτας: 1/1), η τιμή «δ» κυμαινόταν από 0.76, στην περίπτωση του οξικού οξέως (+) και με αρχικό pH 3.6, μέχρι 23.64 στην περίπτωση του οξικού οξέως (-) και με αρχικό pH 4.4.

Όσο αναφορά την περίπτωση που είχαμε προσθήκη πατάτας σε ποσοστό 66.7% (αναλογία πατάτας/βάση σαλάτας: 2/1), η τιμή «δ» κυμαινόταν από 2.79, στην περίπτωση του γαλακτικού οξέως (-) και με αρχικό pH 4.1, μέχρι 29.02 στην περίπτωση του οξικού οξέως (-) και με αρχικό pH 3.9.

Τέλος, στην περίπτωση που είχαμε προσθήκη πατάτας σε ποσοστό 75% (αναλογία πατάτας/βάση σαλάτας:3/1), η τιμή «δ» κυμαινόταν από 2.80, στην περίπτωση του γαλακτικού οξέος (-) και με αρχικό pH 3.9, μέχρι 35.88 στην περίπτωση του οξικού οξέος (+) και με αρχικό pH 4.4. Όλες οι ενδιάμεσες τιμές «δ» φαίνονται στον **Πίνακα 13**.

Λόγω της ρυθμιστικής ικανότητας της πατάτας, όσο περισσότερη συγκέντρωση έχουμε, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αύξηση του pH. Όπως παρατηρείται και στα **Γραφήματα 26A, 26B, 27A** και **27B** η συσχέτιση του τελικού pH της πατατοσαλάτας με το ποσοστό πατάτας που προστίθεται είναι γραμμική για κάθε αρχικό pH βάσης σαλάτας, εκτός από την περίπτωση του γαλακτικού οξέος χωρίς συντηρητικό. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το γαλακτικό οξύ έχει μικρότερη pK_a από το οξικό οξύ, αντίστοιχα 3.8 και 4.8. Στο ίδιο pH το γαλακτικό οξύ έχει μεγαλύτερο ποσοστό δισταμένων ιόντων από το οξικό οξύ. Όσο πιο μεγάλο ποσοστό πατάτας προστίθεται τόσο αυξάνεται το τελικό pH των δειγμάτων. Όσο υψηλότερο τελικό pH έχουμε, τόσο μεγαλύτερο ποσοστό δισταμένων ιόντων έχουμε. Για παράδειγμα σε ένα τελικό pH γύρω στο 5 έχουμε για το οξικό οξύ περίπου 65% δισταμένα ιόντα και για το γαλακτικό οξύ έχουμε αντίστοιχα περίπου 93%. Συνεπώς, όσο αυξάνεται το τελικό pH, τόσο μεγαλύτερη ανισοροπία υπάρχει στο γαλακτικό οξύ. Αυτό φαίνεται και στο **Γράφημα 27A** αφού δεν υπάρχει καλή γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στο ποσοστό πατάτας και στη βάση σαλάτας. Άρα αναμένεται να μην έχουμε και ικανοποιητικά αποτελέσματα ούτε και στο δευτερογενές μοντέλο (**Γράφημα 30**).

3.2.3. Επίδραση του οργανικού οξέος στην επιβίωση του παθογόνου

- *Οξικό οξύ*

Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε το οξικό οξύ ως μέσο όξυνσης, τα αποτελέσματα ήταν πιο γραμμικά σε σχέση και με την ποσότητα της πατάτας. Επίσης, το οξικό οξύ ήταν πιο αποτελεσματικό στην θανάτωση του παθογόνου σε

σχέση με το γαλακτικό. Γενικά στο οξικό οξύ είχαμε καλύτερα αποτελέσματα θανάτωσης όσο μειωνόταν το pH, η ποσότητα πατάτας και όταν υπήρχε και συντηρητικό. Παρόλο που η αδιάστατη μορφή του οξέος είναι αυτή που έχει μεγαλύτερη ανασταλτική δράση έναντι των μικροοργανισμών, μελέτες έχουν δείξει ότι το σύνολο της ανασταλτικής δράσης των οργανικών οξέων εξαρτάται από το συνδυασμό της δράσης της αδιάστατης μορφής του οξέος, καθώς και της δράσης των δισταμένων ιόντων του (Ray & Sadine, 1992; Luck & Jager, 1997, Taniguchi *et al.*, 1998). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο και σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που αφορούν την αντιμικροβιακή δράση των οργανικών οξέων και ειδικότερα τη σύγκριση μεταξύ του οξικού και του γαλακτικού οξέος. Το οξικό οξύ είναι ισχυρότερο αντιμικροβιακά και το γεγονός οφείλεται στην μεγαλύτερη τιμή της pK_a που έχει σε σχέση με το γαλακτικό (4.8 και 3.8 αντίστοιχα).

- *Γαλακτικό οξύ*

Σε όλες τις περιπτώσεις που είχαμε ως μέσο όξυνσης το γαλακτικό οξύ, με και χωρίς συντηρητικό, είχαμε μικρότερο ποσοστό επιβίωσης όταν είχαμε 75% και στη συνέχεια 66.7% συγκέντρωση πατάτας σε σχέση με όταν είχαμε 50% και 33.3%. Αλλά και το τελικό pH στα δείγματα με γαλακτικό οξύ (-), στα οποία είχαμε 75% πατάτα ήταν ίσο ή και μικρότερο από τα δείγματα που είχανε 33.3% συγκέντρωση πατάτας. Αυτό δεν ισχύει για τα αντίστοιχα δείγματα όταν έχουμε γαλακτικό οξύ (+). Άρα είχαμε καλύτερα αποτελέσματα θανάτωσης στα δείγματα με γαλακτικό (-), αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το όξινο περιβάλλον της βάσης σαλάτας συνήθως ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των οξυανθεκτικών βακτηρίων, όπως είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια και εμποδίζει άλλους μικροοργανισμούς που είναι οξυευαίσθητοι, όπως ο παθογόνος *Salmonella* spp. Η ανάπτυξη αυτών των μικροοργανισμών συνήθως προκαλεί αύξηση της οξύτητας, λόγω της απελευθέρωσης όξινων μεταβολιτών (Manios *et al.*, 2014; Vermeulen *et al.*, 2007; Huis in't Veld, 1996). Ενώ τέλος παρατηρείται και στο γαλακτικό οξύ ότι όσο μειωνόταν το pH, η ποσότητα της πατάτας και υπήρχε συντηρητικό, τόσο καλύτερα ήταν τα αποτελέσματα της θανάτωσης του παθογόνου.

3.2.4. Επίδραση της παρουσίας ή μη συντηρητικού στην επιβίωση του παθογόνου

- Χωρίς συντηρητικό

Όταν δεν είχαμε παρουσία συντηρητικού, φαίνεται ότι σε όλα τα δείγματα με γαλακτικό οξύ και στα δείγματα με οξικό οξύ με pH βάσης σαλάτας 4.1 και 4.4, έχουμε μικρότερο ποσοστό επιβίωσης όσο αυξάνεται η ποσότητα της πατάτας που προστίθεται. Ενώ στα δείγματα με οξικό οξύ (-) και pH βάσης σαλάτας 3.6 και 3.9 όσο περισσότερη πατάτα προστίθεται τόσο αυξάνει η επιβίωση. Επίσης, στο **Γράφημα 20Α** το ποσοστό επιβίωσης του μικροοργανισμού είναι σχεδόν το ίδιο για τα ποσοστά πατάτας 66.7% και 75%.

- Με συντηρητικό

Στα δείγματα που είχαμε προσθήκη συντηρητικού παρατηρούμε ότι είχαμε μεγαλύτερο ποσοστό θανάτωσης του μικροοργανισμού σε σχέση με τα δείγματα που δεν είχαμε σορβικό κάλιο, τόσο στο οξικό οξύ όσο και στο γαλακτικό. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το σορβικό κάλιο έχει μία ισχυρή ρυθμιστική ικανότητα, με αποτέλεσμα να χρειάζεται μεγαλύτερη ποσότητα οξέος για να πετύχουμε το ίδιο αρχικό pH με τα δείγματα χωρίς συντηρητικό. Επιπλέον, στα δείγματα που είχαμε συντηρητικό φαίνεται μία καλή συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση πατάτας και το ποσοστό επιβίωσης, εκτός από δύο περιπτώσεις με γαλακτικό οξύ, τα **Γραφήματα 23B** και **25B**, στα οποία φαίνεται ότι όσο αυξάνεται το αρχικό pH της βάσης και το ποσοστό της προστιθέμενης πατάτας, τόσο μειώνεται και το ποσοστό επιβίωσης του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. Τέλος, το συντηρητικό από μόνο του έχει την ικανότητα να αναστέλλει μία ομάδα αλλοιογόνων μικροοργανισμών (κυρίως ζύμες και μύκητες), με αποτέλεσμα να μειώνεται και ο πιθανός ανταγωνισμός μεταξύ των μικροοργανισμών.

Πίνακας 13: Τιμές της παραμέτρου «δ»¹ για όλες τις περιπτώσεις δειγμάτων, όπως προέκυψαν από το πρωτογενές μοντέλο Weibull.

Οργανικό οξύ:	Οξικό								Γαλακτικό								
	Χωρίς (-)				Με (+)				Χωρίς (-)				Με (+)				
0.1% Σορβικό κάλιο:																	
Αρχικό pH βάσης σαλάτας	3.6	3.9	4.1	4.4	3.6	3.9	4.1	4.4	3.6	3.9	4.1	4.4	3.6	3.9	4.1	4.4	
Ποσοστό πατάτας																	
0%	0.16	0.70	2.33	6.12	0.06	0.01	0.07	1.01	0.04	0.57	2.80	1.78	0	0.14	0.69	3.22	
33.3%	2.33	7.06	12.54	16.76	0.29	1.85	3.26	4.48	3.69	2.57	25.69	7.89	2.57	5.62	4.51	3.93	
50%	2.75	10.16	12.17	23.64	0.76	4.36	2.60	9.33	8.34	6.10	7.42	6.57	3.92	9.22	19.19	14.02	
66.7%	12.42	29.02	17.68	19.66	5.20	10.23	21.32	18.97	6.34	4.08	2.79	7.19	13.93	16.33	24.56	24.95	
75%	15.38	22.78	26.27	16.56	10.61	10.53	20.25	35.88	7.98	2.80	2.86	5.13	12.42	15.26	19.47	8.2	

¹ Το τυπικό σφάλμα της παραμέτρου «δ» της εξίσωσης που έδωσε το μοντέλο Weibull, του προγράμματος GInaFiT, κυμαίνεται από 0.02 έως 6.50.

3.3. Δευτερογενές μοντέλο

Στόχος του δευτερογενούς μοντέλου είναι η περιγραφή της επιβίωσης του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε έτοιμες προς κατανάλωση πατατοσαλάτες βάσει της σύστασής τους, δηλαδή τα χαρακτηριστικά της βάσης σαλάτας και της συγκέντρωση της προστιθέμενης πατάτας. Τα χαρακτηριστικά αυτά αποτελούν επίσης και τα δεδομένα που μπορεί να εισάγει κάποια βιομηχανία παραγωγής σαλατών τύπου-deli και μέσω του δευτερογενούς μοντέλου να προβλεφθεί την επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. Η πυκνότητα του πληθυσμού αναμένεται να μειωθεί, καθώς τα παραπάνω χαρακτηριστικά επηρεάζουν την επιβίωση του παθογόνου. Τα δεδομένα του πρωτογενούς μοντέλου, δηλαδή ο ρυθμός μείωσης του λογαριθμικού πληθυσμού του παθογόνου (παράμετρος «δ») σε συνάρτηση με το χρόνο συντήρησης, προήλθαν από την πειραματική διαδικασία έπειτα από επεξεργασία με το πρωτογενές μοντέλο Weibull (Mafart *et al.*, 2002) όπως αναφέρεται και στην ενότητα 2.5. Από τις μαθηματικές εξισώσεις αυτές φαίνεται ότι το τελικό pH των προϊόντων, το οποίο είναι και ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp., περιγράφεται από μία γραμμική συνάρτηση της μορφής $y = a \cdot x + b$ και επηρεάζεται τόσο από τη συγκέντρωση της πατάτας που προστίθεται όσο και από το αρχικό pH της βάσης σαλάτας.

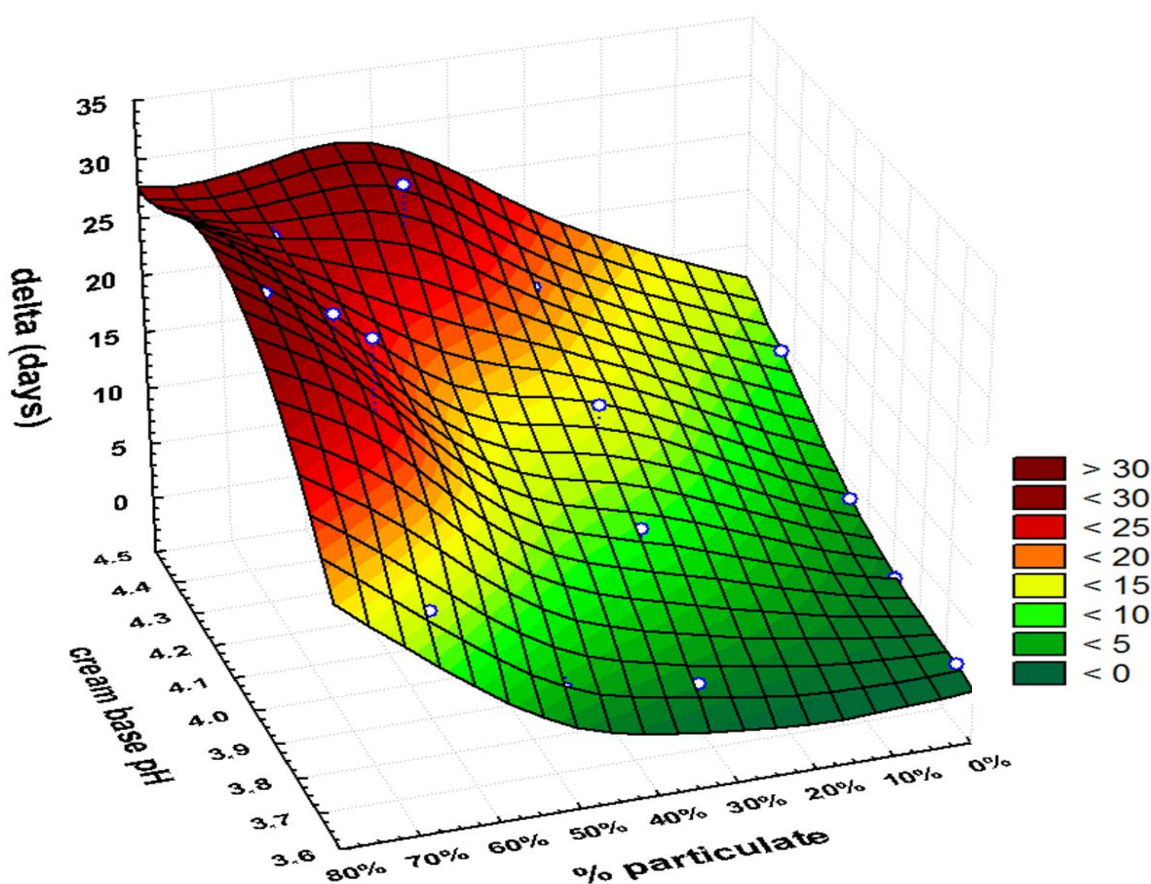
Οι μαθηματικές εξισώσεις του δευτερογενούς μοντέλου που περιγράφονται στην ενότητα 2.5 χρησιμοποιήθηκαν για να γενικεύσουν τα γραφήματα της επιφάνειας απόκρισης, που φαίνονται στα **Γραφήματα 28, 29, 30** και **31**. Με αυτόν τον τρόπο φαίνεται οπτικά η επίδραση του αρχικού pH της βάσης σαλάτας και της συγκέντρωσης της πατάτας στην τιμή της παραμέτρου «δ» της εξίσωσης Weibull του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. στις πατατοσαλάτες.

Το pH είναι ο πιο κρίσιμος και σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας που συντηρούνται στους 5 °C, όπως φαίνεται και από τα ακόλουθα σχεδιαγράμματα. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα αποτελέσματα θα πρέπει στο άμεσο μέλλον να επικυρωθούν μέσω κάποιου άλλου πειράματος.

Στα δείγματα με οξικό οξύ χωρίς συντηρητικό (Γράφημα 28) φαίνεται ότι όσο αυξάνεται το pH της βάσης σαλάτας και ταυτόχρονα το ποσοστό της πατάτας που προστίθεται, τόσο μεγαλύτερες τιμές λαμβάνει η παράμετρος «δ», δηλαδή τόσο μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης έχουμε στα δείγματα. Σε αυτή την περίπτωση η εξίσωση διαμορφώνεται ως εξής:

$$\text{SQRT}(\delta) = -59.77 + 10.86 (\% \text{ πατάτα}) + 26.52 (\text{αρχικό pH}) + 1.27 (\% \text{ πατάτα})^2 - 2.78 (\text{αρχικό pH})^2 - 1.80 (\% \text{ πατάτα} * \text{αρχικό pH})$$

Με $R^2=0.932$.

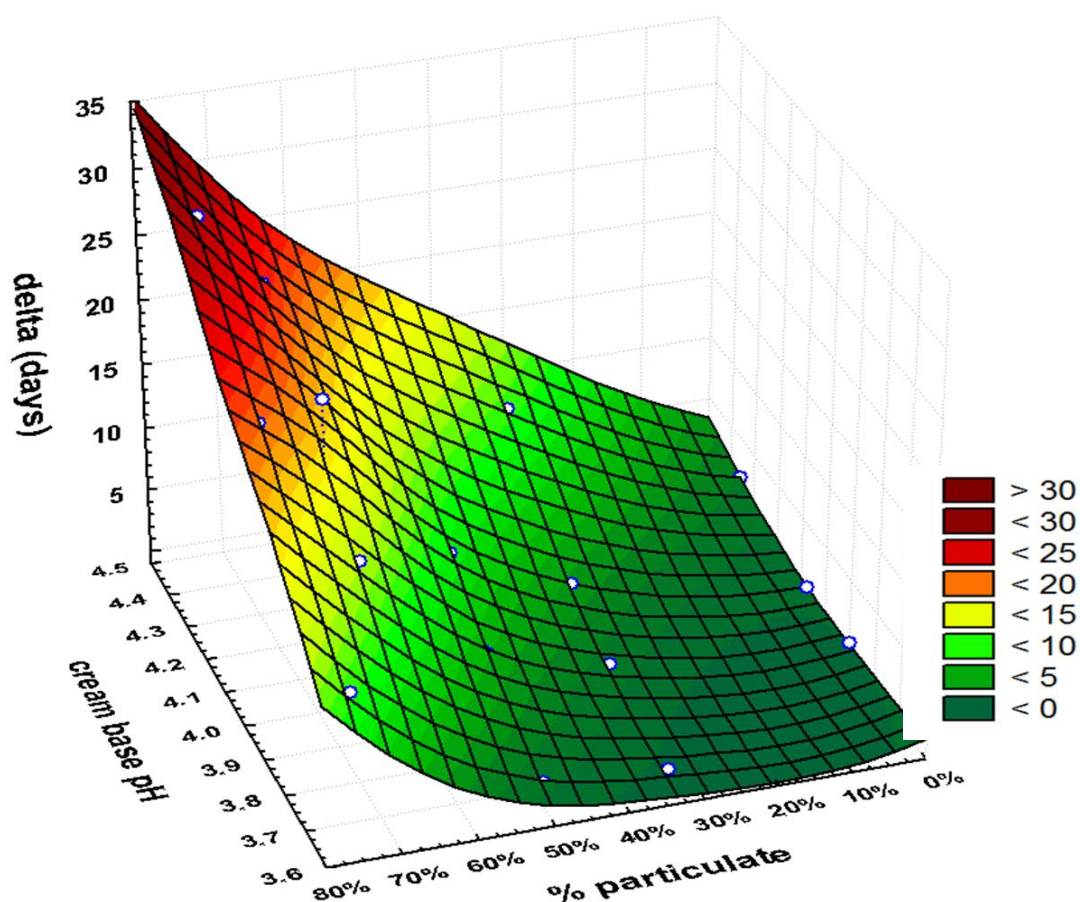


Γράφημα 28: Συνδυασμένη επίδραση του αρχικού pH της βάσης σαλάτας και της συγκέντρωσης της πατάτας στις τιμές της παραμέτρου «δ» του παθογόνου *Salmonella* spp., όπως αυτές υπολογίστηκαν από το μοντέλο του Weibull. Το αρχικό pH της βάσης σαλάτας ρυθμίστηκε με οξικό οξύ χωρίς συντηρητικό.

Όσο πιο υψηλό pH βάσης σαλάτας έχουμε τόσο περισσότερο αυξάνεται η επιβίωση του μικροοργανισμού (**Γράφημα 29**). Πρόκειται για περίπτωση γραμμικής συσχέτισης. Επίσης, όσο αυξάνεται το ποσοστό της πατάτας που προστίθεται τόσο μεγαλύτερες τιμές λαμβάνει η παράμετρος «δ». Σε αυτή την περίπτωση η εξίσωση είναι η ακόλουθη:

$$\text{SQRT}(\langle\delta\rangle) = -8.73 - 8.49 (\% \text{ πατάτα}) + 2.72 (\text{αρχικό pH}) + 4.49 (\% \text{ πατάτα})^2 - 0.09 (\text{αρχικό pH})^2 + 2.52 (\% \text{ πατάτα} * \text{αρχικό pH})$$

Με $R^2=0.961$.



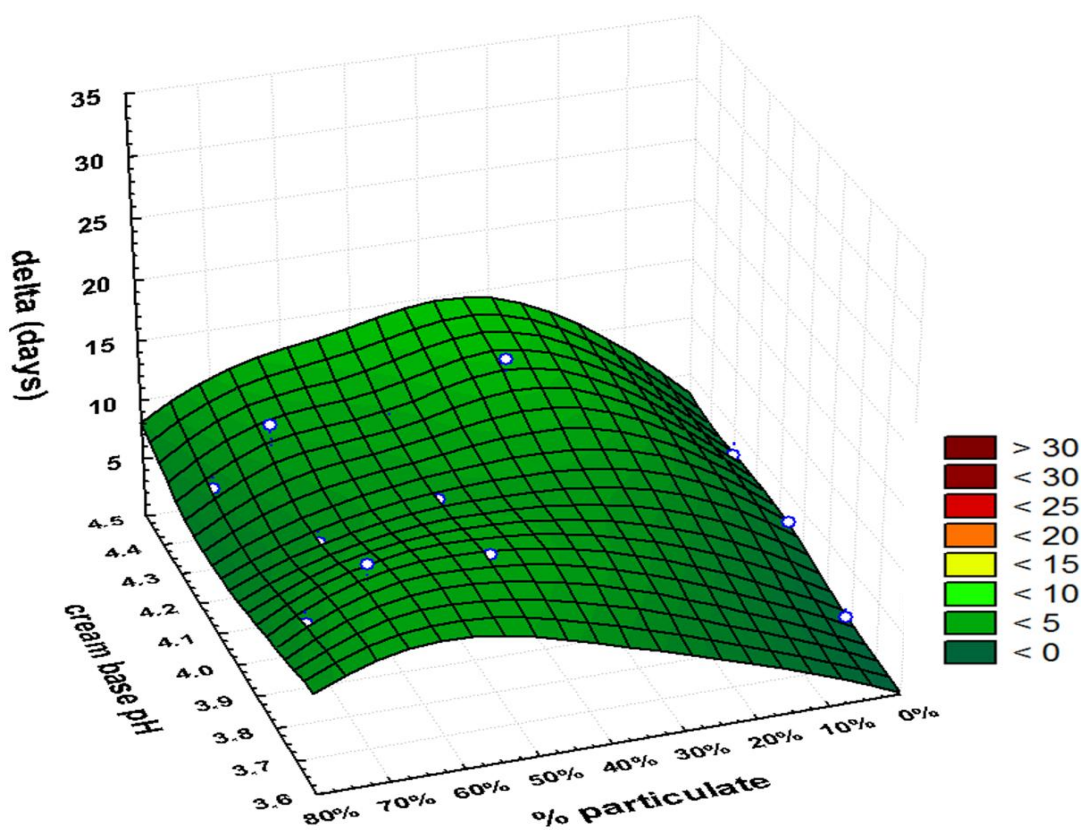
Γράφημα 29: Συνδυασμένη επίδραση του αρχικού pH της βάσης σαλάτας και της συγκέντρωσης της πατάτας στις τιμές της παραμέτρου «δ» του παθογόνου *Salmonella* spp., όπως αυτές υπολογίστηκαν από το μοντέλο του Weibull. Το αρχικό pH της βάσης σαλάτας ρυθμίστηκε με οξικό οξύ με συντηρητικό.

Στην περίπτωση του γαλακτικού οξέως χωρίς συντηρητικό (**Γράφημα 30**) δεν έχουμε τόσο ικανοποιητικά αποτελέσματα, ίσως λόγω της γρήγορης αλλοίωσης των δειγμάτων. Αυτό επιβεβαιώνει την συνιστώμενη πρακτική της ψύξης, δηλαδή

δυναμικά επικίνδυνες τροφές πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία περίπου 5 °C με διάρκεια ζωής περίπου 7 ημέρες (FDA, 2001). Για τις σαλάτες τύπου-deli, που παρασκευάζονται με βάσεις σαλάτας που μπορεί να έχουν ένα υψηλότερο pH, συνιστάται ένα μικρότερο χρονικό διάστημα συντήρησης. Όμως, παρατηρούμε ότι όσο αυξάνει το pH της βάσης σαλάτας, υπάρχει και μία μικρή τάση αύξησης της επιβίωσης, ενώ καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της πατάτας που προστίθεται, προκαλείται αύξηση στην επιβίωση του πληθυσμού. Σε αυτή την περίπτωση η εξίσωση είναι η εξής:

$$\text{SQRT}(\delta) = -8.34 - 23.97 (\% \text{ πατάτα}) + 2.47 (\text{αρχικό pH}) - 7.97 (\% \text{ πατάτα})^2 - 0.02 (\text{αρχικό pH})^2 - 3.96 (\% \text{ πατάτα} * \text{αρχικό pH})$$

Με $R^2=0.938$.

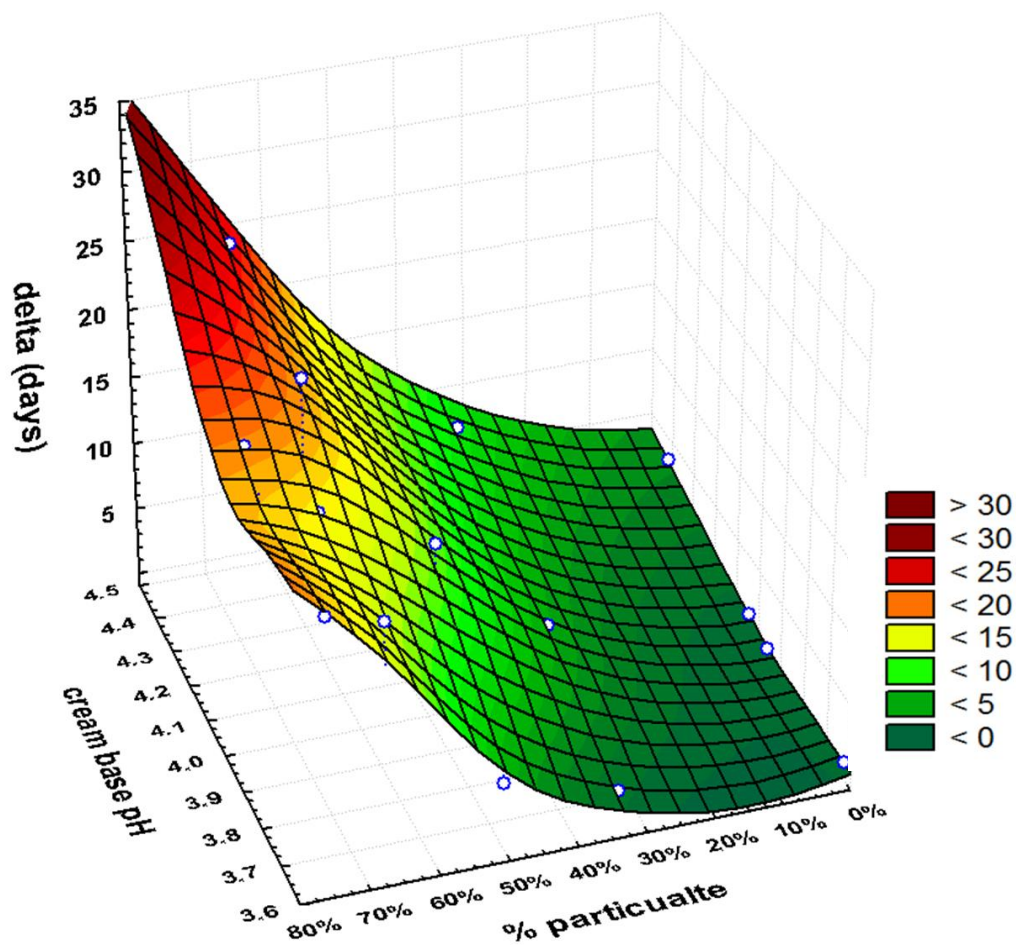


Γράφημα 30: Συνδυασμένη επίδραση του αρχικού pH της βάσης σαλάτας και της συγκέντρωσης της πατάτας στις τιμές της παραμέτρου «δ» του παθογόνου *Salmonella* spp., όπως αυτές υπολογίστηκαν από το μοντέλο του Weibull. Το αρχικό pH της βάσης σαλάτας ρυθμίστηκε με γαλακτικό οξύ χωρίς συντηρητικό.

Στα δείγματα με γαλακτικό οξύ με συντηρητικό, παρατηρούμε (Γράφημα 31) ότι όσο αυξάνεται το pH της βάσης σαλάτας και ταυτόχρονα το ποσοστό της πατάτας που προστίθεται, τόσο μεγαλύτερες τιμές λαμβάνει η παράμετρος «δ», δηλαδή τόσο μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. έχουμε. Σε αυτή την περίπτωση η εξίσωση είναι η παρακάτω:

$$\text{SQRT}(\delta) = 2.06 + 4.97 (\% \text{ πατάτα}) - 2.53 (\text{αρχικό pH}) + 2.65 (\% \text{ πατάτα})^2 + 0.55 (\text{αρχικό pH})^2 - 0.41 (\% \text{ πατάτα} * \text{αρχικό pH})$$

Με $R^2=0.942$.



Γράφημα 31: Συνδυασμένη επίδραση του αρχικού pH της βάσης σαλάτας και της συγκέντρωσης της πατάτας στις τιμές της παραμέτρου «δ» του παθογόνου *Salmonella* spp., όπως αυτές υπολογίστηκαν από το μοντέλο του Weibull. Το αρχικό pH της βάσης σαλάτας ρυθμίστηκε με γαλακτικό οξύ με συντηρητικό.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την παραγωγή έτοιμων πατατοσαλατών προς κατανάλωση υπάρχει ο κίνδυνος της επιμόλυνσης από κάποιο παθογόνο μικροοργανισμό όπως *Salmonella* spp. Στην συγκεκριμένη διπλωματική, εξετάστηκε ο παθογόνος μικροοργανισμός *Salmonella* spp. Οι τύπου-deli σαλάτες περιέχουν συστατικά, όπως πατάτα, κοτόπουλο ή καρότα, τα οποία αυξάνουν το τελικό pH των προϊόντων, που είναι έτοιμα προς κατανάλωση. Μπορεί μάλιστα το pH να αυξηθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε να καταστήσει το προϊόν μη ασφαλές.

Από την προπαραστατική διαδικασία που πραγματοποιήθηκε καταλήξαμε σε κάποια συμπεράσματα. Αρχικά, φαίνεται να μην επηρεάζεται η επιβίωση του παθογόνου από τον τρόπο εμβολιασμού των δειγμάτων. Δηλαδή ο χρόνος εισαγωγής του παθογόνου στο προϊόν (πριν ή μετά τη προσθήκη βάσης σαλάτας) δεν έχει σημασία. Επίσης, ο τρόπος δειγματοληψίας δεν έδειξε καμία διαφορά στην επιβίωση του παθογόνου. Ωστόσο, όταν παράγεται το προϊόν σχηματίζεται κάποιο είδος μικροπεριβάλλοντος, το οποίο μπορεί να επηρεάσει θετικά ή αρνητικά στην επιβίωση του παθογόνου. Όμως, επιτυγχάνεται γρήγορη εξισορρόπηση του pH του προϊόντος σε λίγες ώρες μετά την προσθήκη των συστατικών. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι όσο πιο πηχτή είναι η βάση σαλάτας, τόσο μεγαλύτερη είναι η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού.

Διαπιστώθηκε επίσης η μεγαλύτερη επιβίωση του παθογόνου στα δείγματα παρουσία συντηρητικού έναντι αυτών χωρίς συντηρητικού. Η εξήγηση αυτής της διαφοράς βρίσκεται στο γεγονός ότι τα δείγματα της βάσης σαλάτας πρώτα ρυθμίστηκαν ως προς το pH τους και μετά έγινε η προσθήκη 0.1% σορβικού καλίου, το οποίο αύξησε επιπλέον το pH. Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι καθοριστικό ρόλο στην επιβίωση του παθογόνου παίζει το pH.

Στη συνέχεια, ερευνήθηκε εάν ο κρίσιμος παράγοντας που συντελεί στην μείωση του πληθυσμού του παθογόνου είναι το pH ή η προσθήκη πατάτας. Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων φαίνεται ξεκάθαρα ότι το pH είναι ο μοναδικός παράγοντας που συντελεί στην μείωση του πληθυσμού του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. Χωρίς όμως να αμφισβητείται ότι και η προσθήκη της πατάτας είναι σημαντικός παράγοντας, αφού επιδρά στο τελικό pH των δειγμάτων λόγω της ρυθμιστικής της ικανότητας. Όσο μεγαλύτερο το ποσοστό πατάτας που προστίθεται στα δείγματα, τόσο περισσότερο αυξάνει το pH και άρα η επιβίωση του πληθυσμού του παθογόνου *Salmonella* spp.

Τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας έδειξαν ότι το τελικό pH της πατατοσαλάτας μπορεί να αυξηθεί από 0.2 έως 1.4 βαθμούς ανάλογα με την συγκέντρωση της πατάτας που προστίθεται και τον τύπο του οργανικού οξέος, δηλαδή αν έχουμε οξικό ή γαλακτικό οξύ και επιπλέον με ή χωρίς συντηρητικό. Αυτή η αύξηση συμβαίνει κατά την διάρκεια των πρώτων 12 με 24 ωρών μετά την ανάμιξη των συστατικών. Η μεγαλύτερη αύξηση του pH παρατηρήθηκε σε δείγματα που είχαν σαν μέσο οξύνισης το γαλακτικό οξύ σε σύγκριση με αυτά με οξικό οξύ, λόγω της προσθήκης της πατάτας. Το γεγονός εξηγείται από την τιμή της pK_a του γαλακτικού οξέως ($pK_a=3.8$), η οποία είναι στο χαμηλότερο όριο του υπό εξέταση εύρους pH. Συμπερασματικά το τελικό pH είναι περισσότερο ευαίσθητο στην προσθήκη της πατάτας.

Επίσης, η ρυθμιστική ικανότητα του σορβικού καλίου έχει ως συνέπεια την γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στο τελικό pH της πατατοσαλάτας και την συγκέντρωση της προστιθέμενης πατάτας, στα δείγματα που έχουν οξικό οξύ. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε κάποια τέτοια συσχέτιση στα δείγματα χωρίς συντηρητικό. Ακόμα βρέθηκε ότι ο τελικό pH της πατατοσαλάτας, όπως αυτό ρυθμίστηκε από την προσθήκη διαφορετικής συγκέντρωσης πατάτας, επηρέασε την επιβίωση του παθογόνου *Salmonella* spp., ανεξάρτητα από τον τύπο του οξέως ή την παρουσία του συντηρητικού. Ωστόσο, η προσθήκη 0.1% σορβικού καλίου στα δείγματα που οξύνθηκαν με οξικό οξύ προκλήθηκε πιο γρήγορη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου σε σύγκριση με τα δείγματα χωρίς συντηρητικό.

Στα δείγματα με 0.1% σορβικό κάλιο και τελικό pH μικρότερο από 4.8, το οξικό οξύ ήταν πιο αποτελεσματικό ενάντια στον παθογόνο *Salmonella* spp. σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα που περιείχαν γαλακτικό οξύ. Αντιθέτως, σε δείγματα με pH μεγαλύτερο από 4.8, τα οποία είχαν ρυθμιστεί με γαλακτικό οξύ, η αύξηση αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (π.χ., οξυγαλακτικά βακτήρια) μείωσε το pH των προϊόντων κατά την διάρκεια της συντήρησης και συνεπώς έδειξε σημαντική επίδραση στην επιβίωση του παθογόνου. Ενώ τέλος, η απουσία του σορβικού καλίου στα δείγματα που είχαν ως μέσο οξύνισης το γαλακτικό οξύ, προκάλεσε πρόωρη επιδείνωση των προϊόντων (ειδικά εκείνων με pH μεγαλύτερο από 4.8) και έπειτα, προκάλεσε πιο γρήγορη θανάτωση του παθογόνου *Salmonella* spp. Άρα, παρατηρήθηκε μη γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές της παραμέτρου «δ» της εξίσωσης Weibull του παθογόνου και στο τελικό pH των προϊόντων.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης μπορούν να βοηθήσουν στην εκτίμηση της συσχέτισης του pH στις πατατοσαλάτες (όπως αυτό επηρεάζεται και διαμορφώνεται από την συγκέντρωση της πατάτας που προστίθεται) με την επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. Μία τέτοια συσχέτιση μπορεί να βοηθήσει στον καθορισμό του σχηματισμού ανάλογων προϊόντων, με σκοπό να διασφαλιστεί η μικροβιακή ασφάλεια τους. Σε μελλοντικές έρευνες μπορούν να μελετηθούν διαφορετικά συστατικά των σαλατών τύπου-deli, όπως για παράδειγμα κοτόπουλο.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Πίνακας 1: Σύσταση της βάσης σαλάτας με οξικό οξύ και χωρίς συντηρητικό.

ΒΑΣΗ ΣΑΛΑΤΑΣ 30%	ΧΩΡΙΣ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΟ			
	ΔΕΙΓΜΑ 1	ΔΕΙΓΜΑ 2	ΔΕΙΓΜΑ 3	ΔΕΙΓΜΑ 4
ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ	%	%	%	%
Φυτικό έλαιο	30,000	30,000	30,000	30,000
Κρόκος αυγού	5,500	5,500	5,500	5,500
Ξύδι	10,000	5,200	3,500	1,700
Μουστάρδα	2,000	2,000	2,000	2,000
Άμυλο κρύας	4,600	4,600	4,600	4,600
Αλάτι	0,400	0,400	0,400	0,400
Πιπέρι	0,040	0,040	0,040	0,040
Κόλιανδρος	0,050	0,050	0,050	0,050
Hamulsion SFLM	0,400	0,400	0,400	0,400
Νερό	47,010	51,810	53,510	55,310
	100,00	100,00	100,00	100,00
	PH: 3,52- 22,4°C	PH: 3,75- 21,5°C	PH: 3,90- 21,7°C	PH: 4,21- 20,7°C

Πίνακας 2: Σύσταση της βάσης σαλάτας με οξικό οξύ και με συντηρητικό.

ΒΑΣΗ ΣΑΛΑΤΑΣ 30%	ΜΕ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΟ			
	ΔΕΙΓΜΑ 5	ΔΕΙΓΜΑ 6	ΔΕΙΓΜΑ 7	ΔΕΙΓΜΑ 8
ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ	%	%	%	%
Φυτικό έλαιο	30,000	30,000	30,000	30,000
Κρόκος αυγού	5,500	5,500	5,500	5,500
Ξύδι	22,400	12,800	10,000	5,200
Μουστάρδα	2,000	2,000	2,000	2,000
Άμυλο κρύας	4,600	4,600	4,600	4,600
Αλάτι	0,400	0,400	0,400	0,400
Πιπέρι	0,040	0,040	0,040	0,040
Κόλιανδρος	0,050	0,050	0,050	0,050
Hamulsion SFLM	0,400	0,400	0,400	0,400
Σορβικό κάλιο	0,300	0,300	0,300	0,300
Νερό	34,310	43,910	46,710	51,510
	100,00	100,00	100,00	100,00
	PH: 3,58- 24,6°C	PH: 3,78- 20,4°C	PH: 3,91- 21,4°C	PH: 4,21- 20,7°C

Πίνακας 3: Σύσταση της βάσης σαλάτας με γαλακτικό οξύ και χωρίς συντηρητικό.

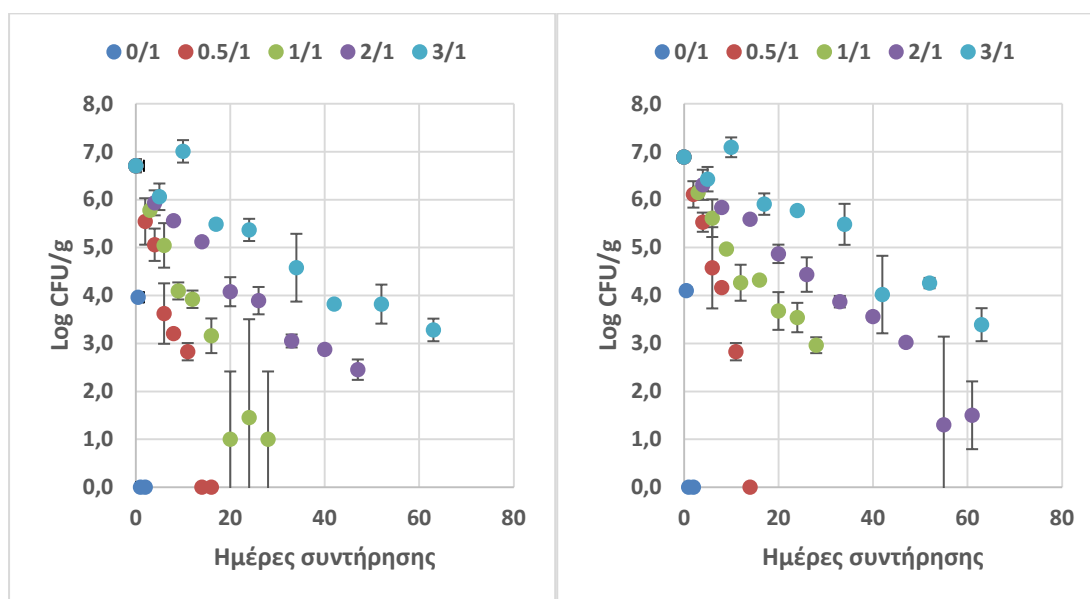
ΒΑΣΗ ΣΑΛΑΤΑΣ 30%	ΧΩΡΙΣ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΟ			
	ΔΕΙΓΜΑ 1	ΔΕΙΓΜΑ 2	ΔΕΙΓΜΑ 3	ΔΕΙΓΜΑ 4
ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ	%	%	%	%
Φυτικό έλαιο	30,000	30,000	30,000	30,000
Κρόκος αυγού	5,500	5,500	5,500	5,500
Γαλακτικό οξύ	0,400	0,250	0,190	0,150
Μουστάρδα	2,000	2,000	2,000	2,000
Άμυλο κρύας	4,600	4,600	4,600	4,600
Αλάτι	0,400	0,400	0,400	0,400
Πιπέρι	0,040	0,040	0,040	0,040
Κόλιανδρος	0,050	0,050	0,050	0,050
Hamulsion SFLM	0,400	0,400	0,400	0,400
Νερό	56,610	56,760	56,820	56,860
	100,000	100,000	100,000	100,000
	PH:3,41- 22,6°C	PH:3,65- 23,0°C	PH:3,89- 22,4°C	PH:4,1- 22,6°C

Πίνακας 4: Σύσταση της βάσης σαλάτας με γαλακτικό οξύ και με συντηρητικό.

ΒΑΣΗ ΣΑΛΑΤΑΣ 30%	ΜΕ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΟ			
	ΔΕΙΓΜΑ 5	ΔΕΙΓΜΑ 6	ΔΕΙΓΜΑ 7	ΔΕΙΓΜΑ 8
ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ	%	%	%	%
Φυτικό έλαιο	30,000	30,000	30,000	30,000
Κρόκος αυγού	5,500	5,500	5,500	5,500
Γαλακτικό οξύ	0,870	0,620	0,500	0,370
Μουστάρδα	2,000	2,000	2,000	2,000
Άμυλο κρύας	4,600	4,600	4,600	4,600
Αλάτι	0,400	0,400	0,400	0,400
Πιπέρι	0,040	0,040	0,040	0,040
Κόλιανδρος	0,050	0,050	0,050	0,050
Hamulsion SFLM	0,400	0,400	0,400	0,400
Σορβικό κάλιο	0,300	0,300	0,300	0,300
Νερό	55,840	56,090	56,210	56,340
	100,000	100,000	100,000	100,000
	PH:3,54- 23,3°C	PH:3,79- 21,3°C	PH:4,01- 21,1°C	PH:4,33- 20,5°C

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Οξικό οξύ - pH 3.6 - χωρίς συντηρητικό

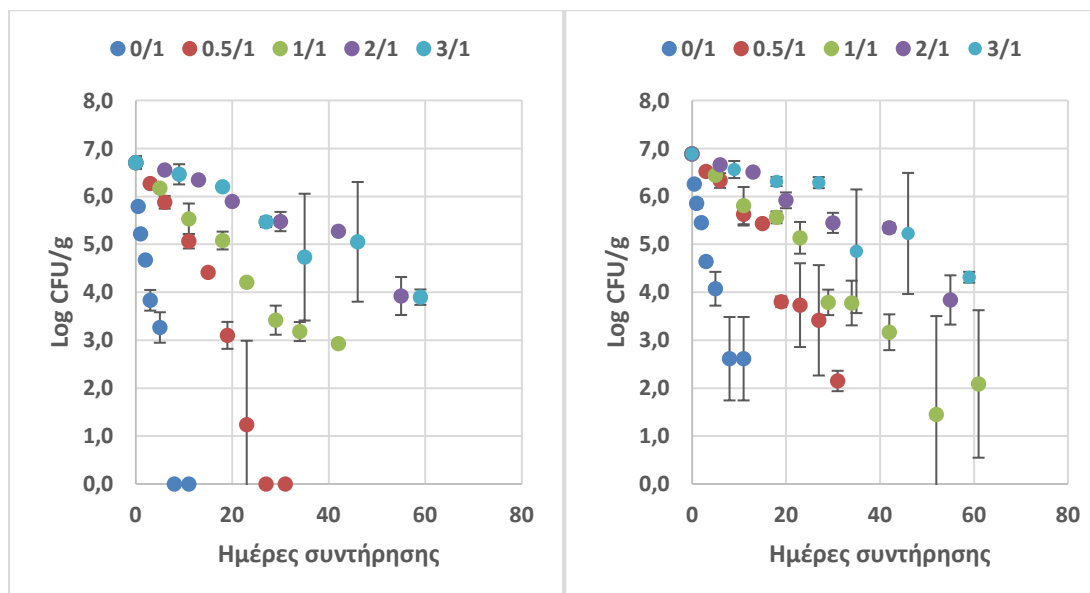


(A)

(B)

Γράφημα 1: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Οξικό οξύ - pH 3.9 - χωρίς συντηρητικό

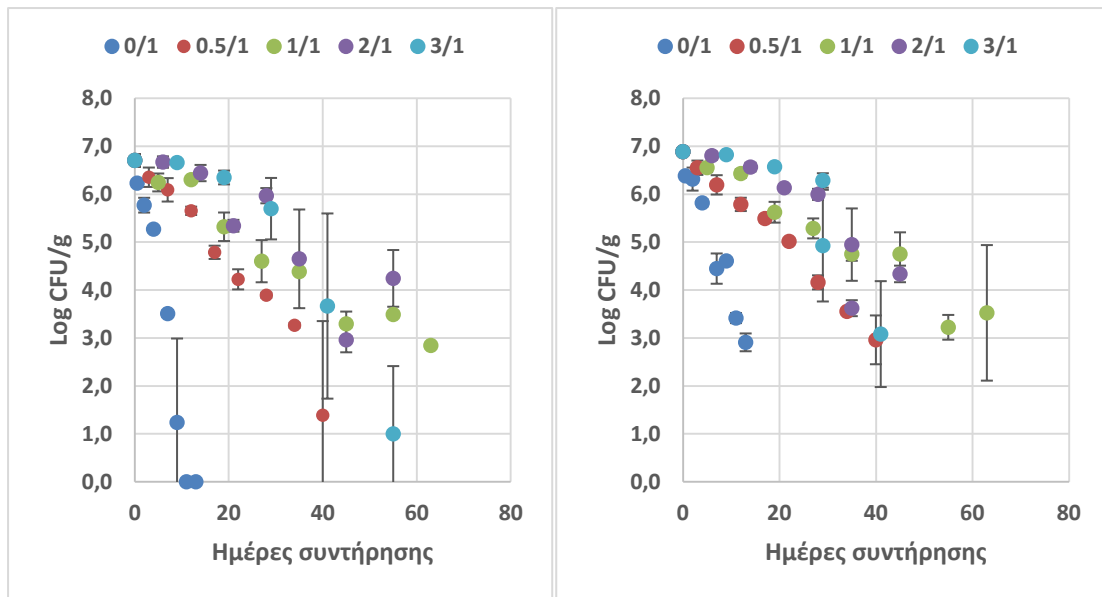


(A)

(B)

Γράφημα 2: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Οξικό οξύ - pH 4.1 - χωρίς συντηρητικό

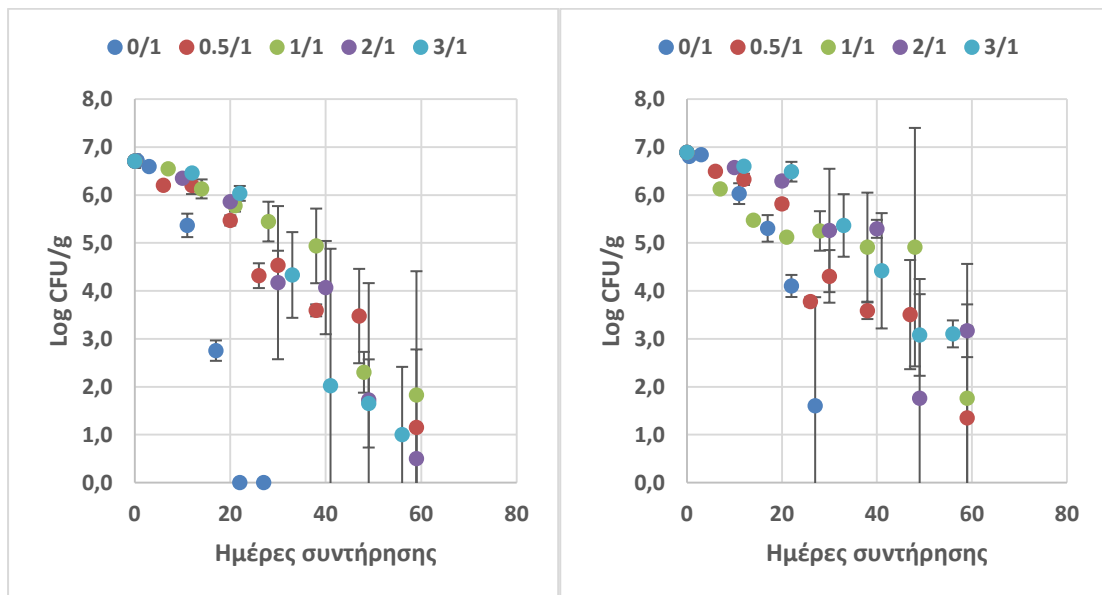


(A)

(B)

Γράφημα 3: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Οξικό οξύ - pH 4.4 - χωρίς συντηρητικό

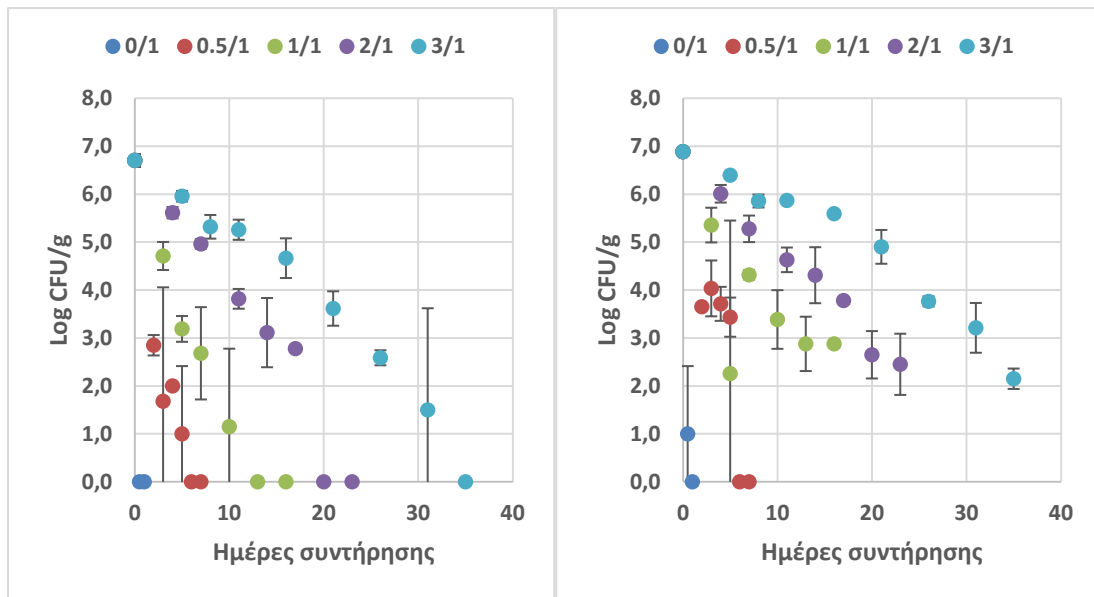


(A)

(B)

Γράφημα 4: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Οξικό οξύ - pH 3.6 - με συντηρητικό

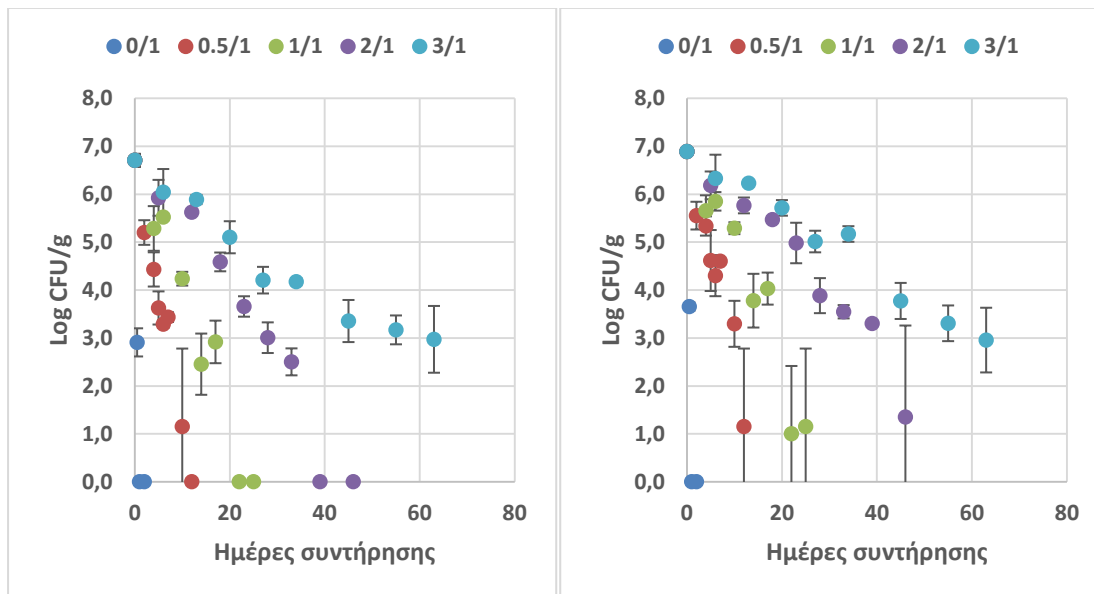


(A)

(B)

Γράφημα 5: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Οξικό οξύ - pH 3.9 - με συντηρητικό

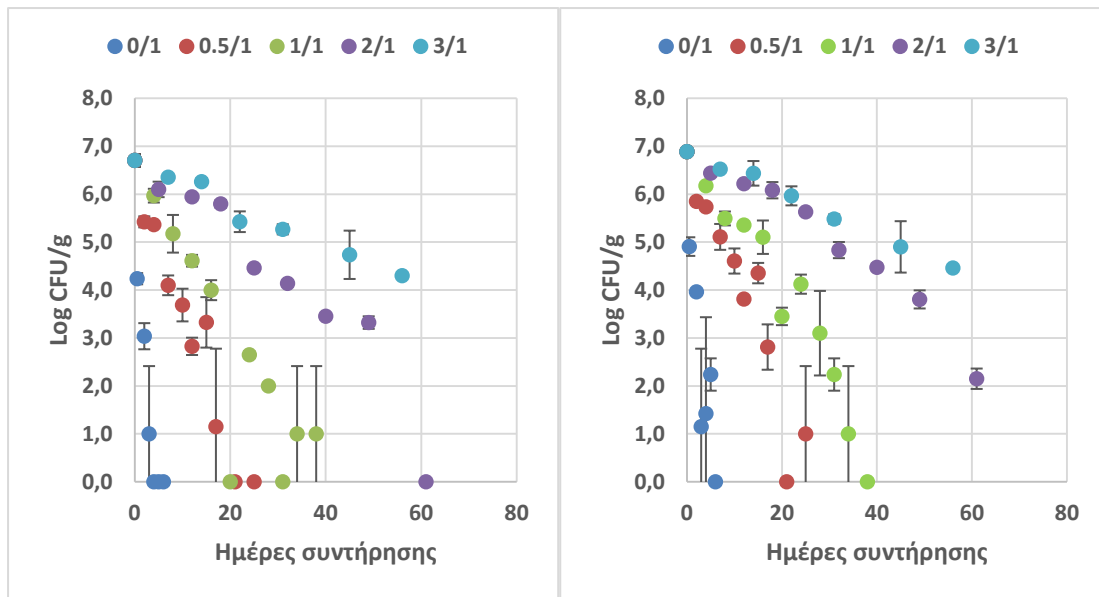


(A)

(B)

Γράφημα 6: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Οξικό οξύ - pH 4.1 - με συντηρητικό

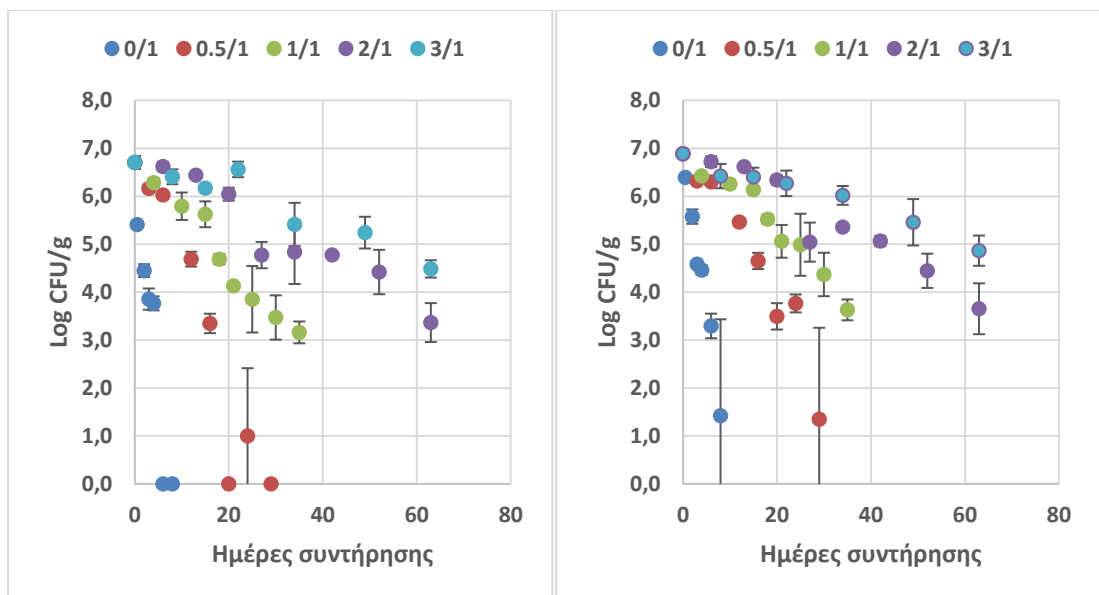


(A)

(B)

Γράφημα 7: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Οξικό οξύ - pH 4.4 - με συντηρητικό

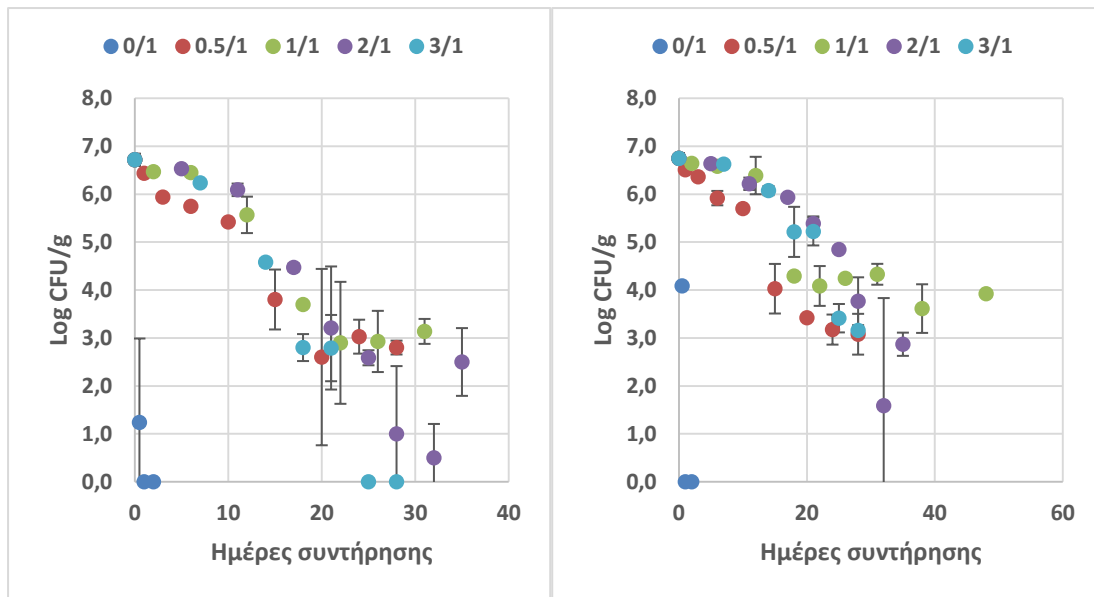


(A)

(B)

Γράφημα 8: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Γαλακτικό οξύ - pH 3.6 - χωρίς συντηρητικό

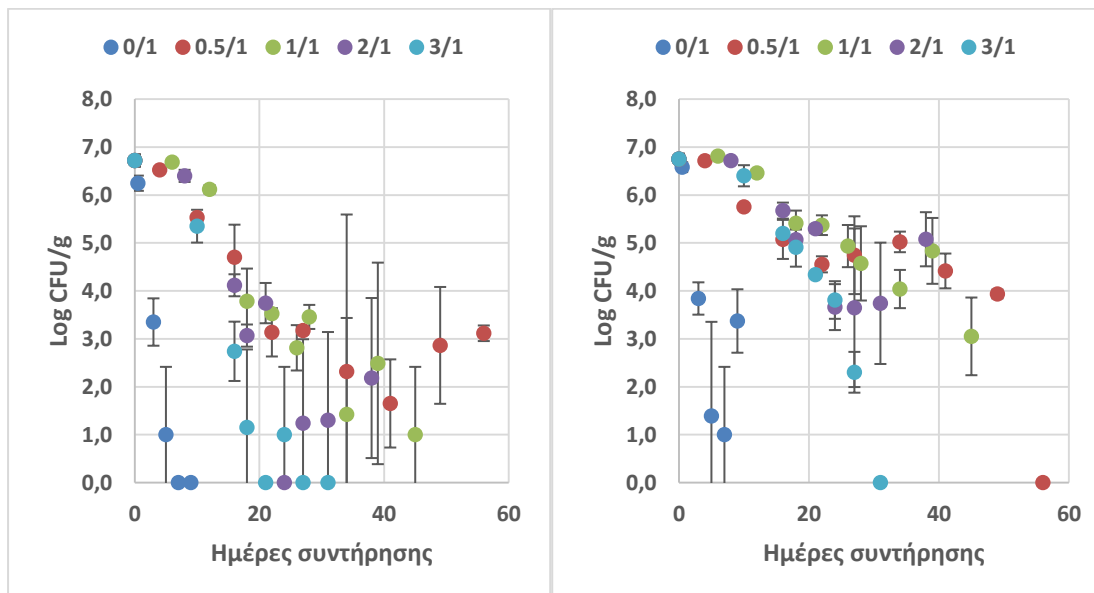


(A)

(B)

Γράφημα 9: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Γαλακτικό οξύ - pH 3.9 - χωρίς συντηρητικό

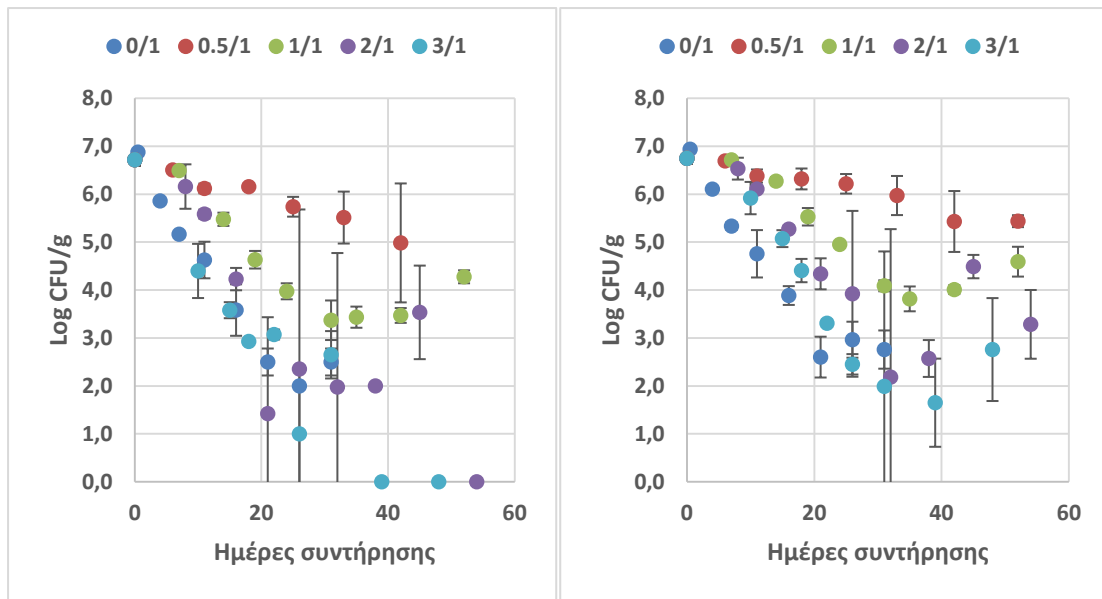


(A)

(B)

Γράφημα 10: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Γαλακτικό οξύ - pH 4.1 - χωρίς συντηρητικό

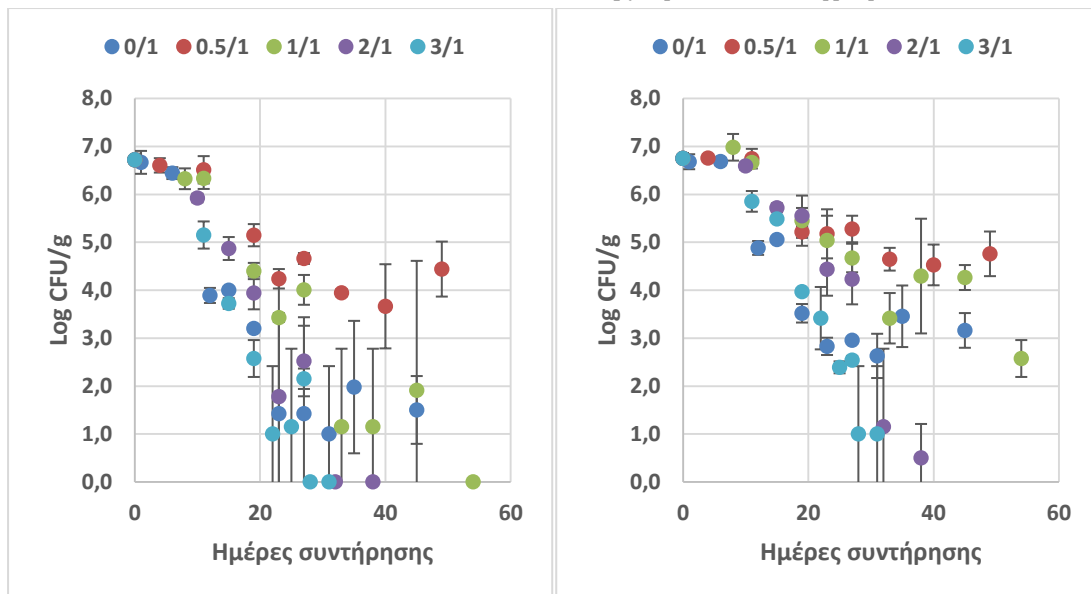


(A)

(B)

Γράφημα 11: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Γαλακτικό οξύ - pH 4.4 - χωρίς συντηρητικό

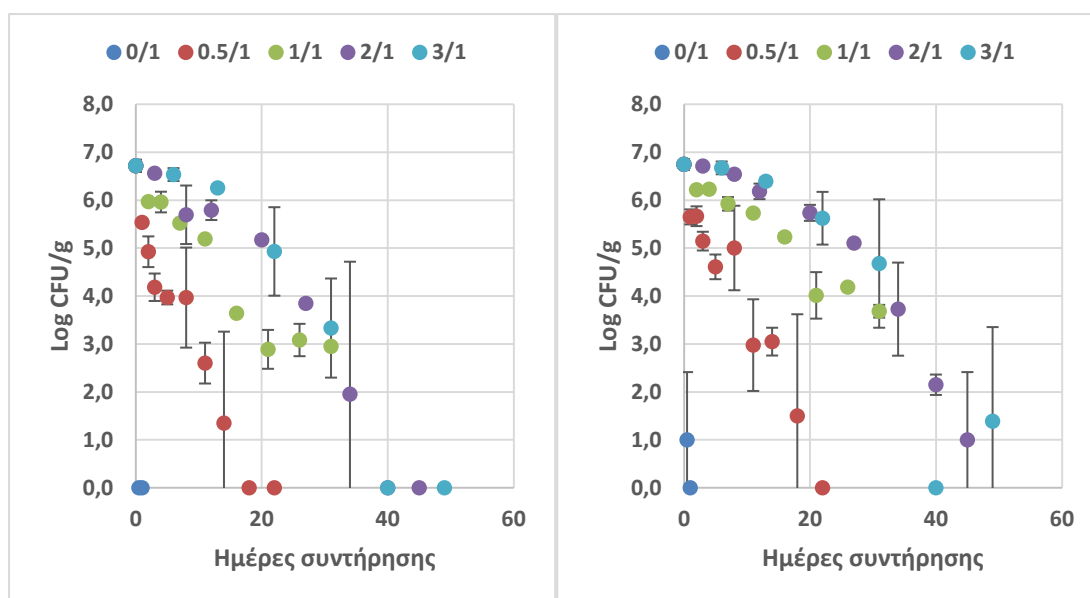


(A)

(B)

Γράφημα 12: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Γαλακτικό οξύ - pH 3.6 - με συντηρητικό

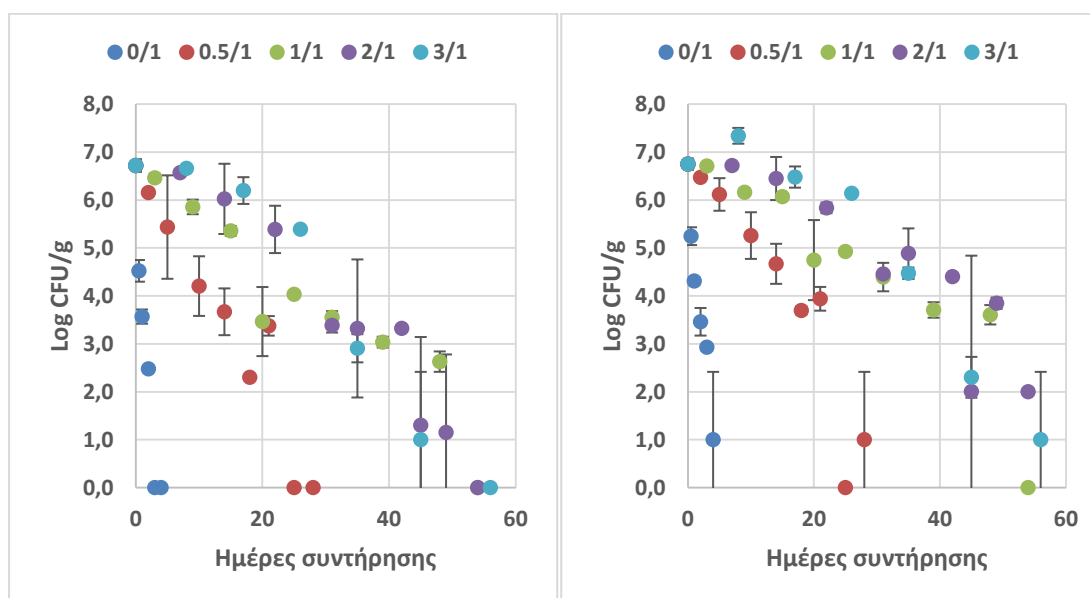


(A)

(B)

Γράφημα 13: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Γαλακτικό οξύ - pH 3.9 - με συντηρητικό

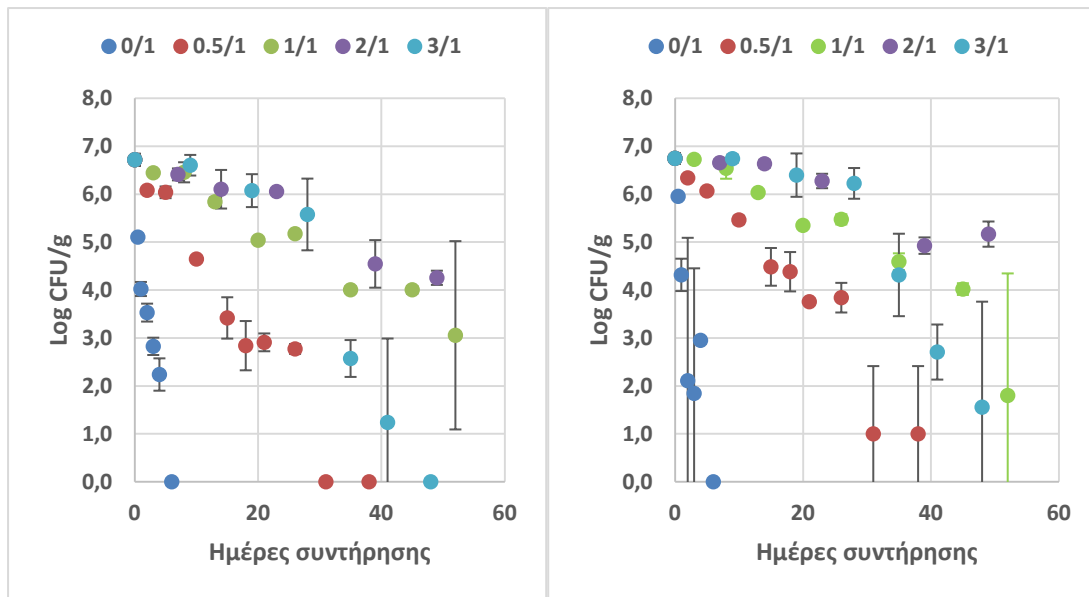


(A)

(B)

Γράφημα 14: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Γαλακτικό οξύ - pH 4.1 - με συντηρητικό

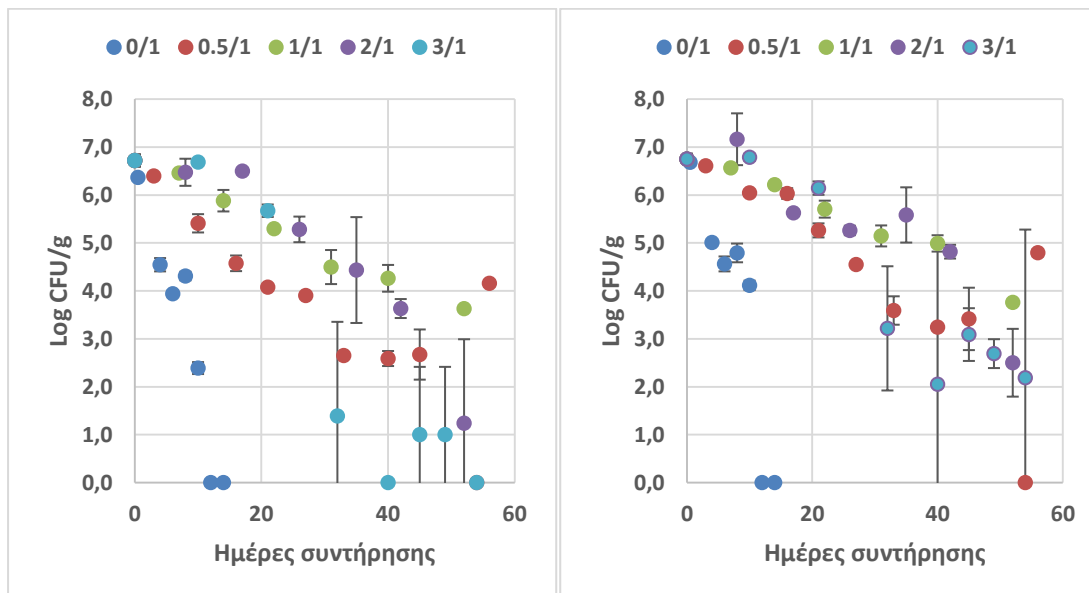


(A)

(B)

Γράφημα 15: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

Γαλακτικό οξύ - pH 4.4 - με συντηρητικό



(A)

(B)

Γράφημα 16: Επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε δείγματα πατατοσαλάτας με διάφορες αναλογίες πατάτας/βάσης σαλάτας και καταμέτρηση σε επιλεκτικό (A) ή μη επιλεκτικό (B) υπόστρωμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adamberg, K., S. Kask, T-M. Laht, and T. Paalme. (2002). The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria : a pH-auxostat study. *Int. J. Food. Microbiol.* 85:171-183.
2. Adams, M.R. and Moss, M.O. (1995). Fermented and Microbial Foods. In: *Food Microbiology*, Royal Society of Chemistry, UK, pp.263-266
3. Allan, J. T., Z. Yan, L. L. genzlinger, and J. L. Kornacki. (2004). Temperature and biological soil effects on the survival of selected foodborne pathogens on a mortar surface. *J. Food Prot.* 12:2661-2665.
4. Altekruse, S.F., Bauer, N., Chanlongbutra, A., DeSagun, R., Naugle, A., Schlosser, W., Umholtz, R., and White, P., *Salmonella enteritidis* in broiler chickens, United States, 2000-2005, *Emerg. Infect. Dis.*, 12(12), 1848, 2006.
5. Alvarez-Martin, P., A. B. Florez, A. Hernandez-Barranco, and B. Mayo. (2007). Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control* 19:62-70.
6. Andrews, H.L. and Baumler, A.J., *Salmonella* species. In *Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*, Fratamico, P.M. Bhunia. A.K., and Smith, J.L., Eds., Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2005, p. 327,
7. Anonymous, *Salmonella enteritidis* infection and grade A shell eggs-United States, 1989, *Dairy Food Environ. Sanit.*, 10,507. 1990.
8. Baird-Parker, A.C., Organic acids, in *Microbial Ecology of Foods*, Vol. 1, Silliker, J.H . Ed., Academic Press, New York, 1980, p. 126.
9. Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH and osmotic stress: A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety.* 3:1-20.
10. Bean, N.H. and Griffin, P.M., Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987.1. *Food Prof.*, 53,804, 1990.
11. Bean, N.H., Griffin, P.M., Goulding, J.S., and Ivey, C.B., Foodborne disease outbreaks, 5 year summary, 1983-1987,1. *Food Prof.*, 53, 711, 1990.
12. Beuchat, L. R. (1982). Thermal inactivation of yeasts in fruit juices supplemented with food preservatives and sucrose. *J. Food Sci.* 47:1679-1682.

13. Beuchat, L. R., and R. E. Brackett. (1990). Behaviour of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. *Appl. Env. Microbiol.* 57:1367-1371.
14. Bhunia, A.K. 2008. Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis. United States of America: Springer Science + Business Media, LLC.
15. Bills S., Restaino L, Lenovich LM. (1982). Growth response of an osmotolerant sorbate-resistant yeast, *Saccharomyces rouxii*, at different sucrose and sorbate levels. *J Food Prot* 45:1120–1124.
16. Boch – Sorensen, L. (1994). Description of hurdles. In: Leistner, L. and L. G. M. Gorris (eds.), *Food preservation by combined processes – Final Report. FLAIR Concerted Action No. 7, Subgroup. B.* pp. 1-6.
17. Booth, I.R. and Kroll, R.G, The preservation of foods by low pH. In *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, Gould, GW. Ed, Elsevier Applied Science, New York, 1989, p. 119.
18. Borch, E., M-L. Kant-Muermans, and Y. Blixt. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 33:103-120.
19. Bouchrif, B., Paglietti, B., Murgia, M., Piana, A., Cohen, N., Ennaji, M., Rubino, S. and Timinouni, M., (2009). Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from in Morocco. *Journal of Infection in Developing Countries* 20(3);35-40.
20. Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. and Pasmans, F. 2008. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary Microbiology* 130(1-2): 1-19.
21. Brocklehurst T. F. (1992). Delicatessen salads and chilled prepared fruit and vegetable products. In: *Shelf life evaluation of foods* Blackie Academic & Professional, London, UK.
22. Brown, M.H. and Booth, I.R., Acidulants and low pH. In *Food Preservatives*, Russell, N.J. and Gould G.W. Eds., Van Nostrand Reinhold, New York, 1990, p. 22.
23. Conner, D. E., R. E. Brackett, and L. R. Beuchat. (1986). Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Appl. Env. Microbiol.* 52:59-63.
24. Corlett, D.A., Jr. and Brown, M.H., pH and acidity, in *Microbial Ecology of Foods*, Vol. I, Silliker, J.H., Bd., Academic Press. New York, 1980, p. 92.
25. Daly, M., Buckley, J., Power, E., O'Hare, C., Cormican, M., Cryan, B., Wall, P.T., and Fanning, S., Molecular characterization of Irish *Salmonella enterica*

- serotype Typhimurium*: detection of class I integrons and assessment of genetic relationships by DNA amplification fingerprinting, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 614, 2000.
26. D'Aoust, J.-Y, *Salmonella*. In *Foodborne Bacterial Pathogens*, Doyel, M.P., Ed., Marcel Dekker, New York, 1989, p. 327.
 27. Davidson, P. M., and M.A. Harrison. (2002). Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technol.* 56:69-78.
 28. Davidson, P. M., and M.A. Harrison. (2003). Microbial adaptation to stresses by food preservatives. In: Yousef, A. F., and Juneja (eds.). *Microbial stress adaptation and food safety*. CRC Press. pp. 55-74.
 29. Davidson, P.M. and Branen, A.L.. Eds., *Antimicrobials in Foods*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 1993.
 30. Dillin, V.M. and Board, R.G, Eds., *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation*, CAB International, Wallingford, U.K., 1994.
 31. Doors, S., Organic acid. In *Antimicrobials in Foods*, Davidson, P.M. and Branen, A.L., Eds., Marcel Dekker, New York, 1993, p. 95.
 32. Eklund, T. (1989). Organic acids and esters. In: Gould G. W, editor. *Mechanisms of action of food preservation procedures*. London: Elsevier Applied Science. pp: 161-200.
 33. Erickson, J. P., and P. Jenkins. 1991. Comparative *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* inactivation rates in four commercial mayonnaise products. *J. Food Prot.* 54:913–916.
 34. Erickson, J. P., D. N. McKenna, M. A. Woodruff, and J. S. Bloom. 1993. Fate of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and spoilage microorganisms in home-style salads prepared with commercial real mayonnaise or reduced calorie mayonnaise dressings. *J. Food Prot.* 56:1015–1021.
 35. Fakruddin, M., Mazumber, R.M., & Mannah, K.S. Bin. (2011). Predictive microbiology: Modelling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science*, 40:121-131.
 36. Fiavola, J., J. Chumchalova, K. Mikova, and I. Hrusova. (2007). Effect of food preservation on the growth of spoilage *lactobacilli* isolated from mayonnaise – based sauces. *Food Control*
 37. Giese, J., *Antimicrobials: assuring food safety*, *Food Technol.*, 49(6), 102, 1994.

38. Glass, K.A., Doyle, M.P., 1991. Fate of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in commercial, reduced-calorie mayonnaise. *J. Food. Prot.* 54, 691–695.
39. Gray, J.T. and Fedorka-Cray, P.J. 2002. *Salmonella*. In Cliver, D.O. and Riemann, H.P. (Eds.). *Foodborne diseases*, p. 55-68. San Diego: Academic Press.
40. Groisman, E.A. and Ochman H., 1997. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* 5(9):343-349.
41. Hanes, D. 2003. Nontyphoid *Salmonella*. In Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H. and Vogt, P.H. (Eds). *International handbook of foodborne pathogens*, p. 137-149. New York: Marcel Dekker, Inc.
42. Hengge-Aronis, R. (1996). Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, pp.1497-1512. Edited by F. C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology.
43. Holt J.G., 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 4nd ed. Williams & Wilkins (Baltimore), 253-268 & 341-353.
44. Huis in't Ved, J.H., 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 189-201.
45. Hwang, C.A., 2005. The effect of mayonnaise pH and storage temperature on the behavior of *Listeria monocytogenes* in ham salad and potato salad. *J. Food Prot.* 68,1628-1634.
46. Hwang, C.A., Tamplin, M.L.,2005. The influence of mayonnaise pH and storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* in seafood salad. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 277-285.
47. Jay M (1996). *Modern Food Microbiology*. New York: Chapman and Hall. pp.661
48. Leistner, L. (1994). Introduction to hurdle technology. In: Leistner, L. and L. G. M. Gorris (eds.), *Food preservation by combined processes – Final Report. FLAIR Concerted Action No. 7, Subgroup. B.* pp. 7-24.
49. Leistner, L., Rodel W. and Krispien K. (1981). In: *Water activity: Influences on Food Quality* (Rockland L .B. and Stewart G. F, eds.), pp. 855 – 916, Academic Press
50. Luck, E. and Jager, M., 1997. Antimicrobial action of preservatives. In: *Antimicrobial Food Additives*, pp. 36-57. Berlin: Springer.

51. Mafart, P., Couvert, O., Gaillard S. and Leguerinel I., 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 107-113
52. Manios, S.G., Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N. (2014). A generic model for spoilage of acidic emulsified foods: Combining physicochemical data, diversity and levels of specific spoilage organisms. *Int. J. Food Prot.* 170,1-11.
53. McKellar, R.C., & Lu, X. (2004). Primary Models. In: *Modelling microbial responses in foods*. Ed: McKellar, R.C. & Lu, X. Chapter2. CRC Press.
54. McMeekin, T.A., & Ross, T. (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*, 78:133-153.
55. Montville, T.J., & Matthews, K.R. (2008). *Food Microbiology: An introduction*, 2nd ed., ASM press, ISBN 978-1-55581-396-3. Washington, DC.
56. Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., et al. (2010). Food-borne diseases-the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139 (Suppl 1), S3-S15.
57. Nikaido, H. and Varra, T. (1985). Molecular basis of bacteria outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49:1-32.
58. Park, T.K., Bearson, B., Bang, S.H., Bang, I.S. and Foster, J.W. (1996) Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 20, 605-611.
59. Ray, B. and Sandine, W.E., Acetic, propionic and lactic acid of starter culture bacteria as biopreservatives. In *Food Biopreservatives of Microbial Origin*, Ray, B. and Daeschel, M.A., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL. 1992, p 103.
60. Ross, T., & McMeekin, T.A. (1995). Predictive microbiology and HACCP. In: *HACCP in meat, poultry and fish processing*. Ed: Pearson, A.M. Dutson, T.R. pp. 330-353. Blackie Academic and Professional.
61. Russell, A. D. (1991). Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *J. Appl. Bacteriol.* 71:191-201
62. Russell, N.J. and Gould, G.W., Eds., *Food Preservatives*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1990, pp. 4-6, 9, 11.
63. Silliker, J.H., Ed., *Microbial Ecology of Foods*, Vol. I, Academic Press, New York, 1980, pp. 8-10.
64. Smittle, R. B. 1977. Microbiology of mayonnaise and salad dressing: a review. *J. Food Prot.* 40:415-422.

65. Smittle, R.B. 2000. Microbiological safety of mayonnaise, salad dressings, and sauces produced in the United States: a review. *J. Food Prot.* 63:1144-1153.
66. Smittle, R.B. and Flowers, R.M., Acid tolerant microorganisms involved in the spoilage of salad dressings, *J. Food Prot.*, 45, 977, 1982.
67. Sofos J. N. and Busta, F. F. (1981). Antimicrobial activity of sorbate. *J. Food Prot.* 44: 614-622
68. Sofos, J.N. and Busta, F.F., Sorbic acid and sorbates. In *Antimicrobials in Foods*, Davidson, P.M. and Branen, A.L., Eds., Marcel Dekker, New York, 1993, p. 49.
69. Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, E.J.J., Geeraerd, A.H., & Van Impe, J.F. (2004). Predictive modeling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology.* 94:137-159.
70. Taniguchi, M., Nakazawa, H., Takeda, O., Kaneko, T., Hoshino, K., and Tanaka, T. 1998. Production of a mixture of antimicrobial organic acids from lactose by co-culture of *Bifidobacterium lonum* and *Propionibacterium freudenreichii*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 62:1522-1527.
71. Tauxe, R.V., *Salmonella*: a postmodern pathogen. *J. Food Prof.*, 54,563, 1991.
72. Taylor, W.I. 1965. Isolation of shigellae. I. Xylose lysine agars: new media for isolation of enteric pathogens. *Am. J. Clin. Pathol.*,44:471-475.
73. Vanderzant. C. and Splittstoesser, D.E, Eds., *Compendium of Methods for the Microbiologic Examination of Foods*, American Public Health Association, Washington, D.C., 1992, chs. 44-61.
74. Vermeulen, A., Devlieghere, F., Bernaerts, K., Van Impe, J.F., Debevere, J., 2007. Growth/no growth models describing the influence of pH, lactic and acetic acid on lactic acid bacteria developed to determine the stability of acidified sauces. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 258-269.
75. Warth, A. D. (1977). Mechanism of resistance of *Saccharomyces bailii* to benzoic, sorbic and other weak acids used as food preservatives. *J. Appl. Bacteriol.* 43:215-230.
76. Whiting, R.C., Buchanan, R.L., 1993. A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiology* 10:175-177.
77. Wong, D.M.A.L.F., Hald, T., Wolf, P.J.V.D. & Swanenburg, M. (2002). Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork, *Livestock Production Science*, Vol. 76, No. 3, (September 2002), pp. 215-222, ISSN 0301-6226.

78. Yousef, A. E., and P. D. Courtney. (2003). Basics of stress adaptation and implications in New-Generation foods. In: Yousef, A. E., and Juneja (eds.). Microbial stress adaptation and food safety. CRC Press. pp. 1-30.
79. Yousef, A.E. AND Carlstrom, C. 2003. *Salmonella*. In Yousef, A.E. and Carlstrom, C. (Eds.). Food microbiology: A laboratory manual, p. 167-205. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
80. Κωμαΐτης, Μ. Ε., (2002). Θέματα Χημείας Τροφίμων. Γ.Π.Α.
81. Νυχάς Γ. Ι. (2005). Σημειώσεις Μ.Π.Ε Ποσοτικής Μικροβιολογίας, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α.
82. Ρόδης, Π. Σ. (1995). Χημικά Πρόσθετα., Μέθοδοι Συντήρησης Τροφίμων, Α. Σταμούλης, Αθήνα, σελ. 450 – 467