

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 53, No 2 (2002)



### Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 in cultured butter during storage.

A. GOVARIS (Α. ΓΚΟΒΑΡΗΣ), D. K. PAPAGEORGIOU (Δ.Κ. ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ), K. PAPATHEODOROU (Κ. ΠΑΠΑΘΕΟΔΩΡΟΥ)

doi: [10.12681/jhvms.15371](https://doi.org/10.12681/jhvms.15371)

Copyright © 2018, A GOVARIS, DK PAPAGEORGIOU, K PAPATHEODOROU



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

### To cite this article:

GOVARIS (Α. ΓΚΟΒΑΡΗΣ) A., PAPAGEORGIOU (Δ.Κ. ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ) D. K., & PAPATHEODOROU (Κ. ΠΑΠΑΘΕΟΔΩΡΟΥ) K. (2018). Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 in cultured butter during storage. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 53(2), 147–161. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15371>

## Επιβίωση της *Escherichia coli* O157:H7 σε βούτυρο βιολογικής ωρίμανσης κατά τη διάρκεια της συντήρησής του.

Α. Γκόβαρης<sup>1</sup>, Δ.Κ. Παπαγεωργίου<sup>2</sup>,  
Κ. Παπαθεοδώρου<sup>3</sup>

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Μελετήθηκε η επιβίωση της *Escherichia coli* O157:H7 σε 3 τύπους βουτύρου: α) χωρίς αλάτι, β) με αλάτι 0,46% και γ) με αλάτι 0,93%, που ενοφθαλμίσθηκαν με μικρό (ca. 3,14 log CFU/g) ή μεγάλο (ca. 4,80 log CFU/g) βακτηριακό πληθυσμό και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασίες 4°C και 12°C. Η συντήρηση διήρκεσε 2 μήνες στους 4°C και μέχρι την εμφάνιση αλλοίωσης (20–26 ημέρες) στους 12°C. Στους πειραματισμούς με μεγάλο πληθυσμό της *E. coli* O157:H7 η μείωση των πληθυσμών στο τέλος της συντήρησης στους 4°C ήταν 2,26 log CFU/g για τους τύπους χωρίς αλάτι και με αλάτι 0,46% και 2,74 log CFU/g για τον τύπο με αλάτι 0,93%. Στους πειραματισμούς με μικρό πληθυσμό της *E. coli* O157:H7 η μείωση των πληθυσμών ήταν 1,81 log CFU/g για τον τύπο του βουτύρου χωρίς αλάτι, ενώ για τους άλλους δύο τύπους βουτύρου η *E. coli* O157:H7 ήταν ανιχνεύσιμη μόνο μετά από εμπλουτισμό. Στους πειραματισμούς που έγιναν στους 12°C με μεγάλο πληθυσμό της *E. coli* O157:H7 η μείωση των πληθυσμών ήταν 2,71 και 3,17 log CFU/g για τους τύπους του βουτύρου χωρίς αλάτι και με αλάτι 0,46%, στις 20 και 22 ημέρες αντίστοιχα και η *E. coli* O157:H7 ήταν ανιχνεύσιμη μόνο μετά από εμπλουτισμό για τον τύπο με αλάτι 0,93% στις 26 ημέρες. Στους πειραματισμούς με μικρό πληθυσμό της *E. coli* O157:H7 η μείωση των πληθυσμών ήταν 1,88 log CFU/g για τον τύπο χωρίς αλάτι στις 20 ημέρες και η *E. coli* O157:H7 ήταν ανιχνεύσιμη μόνο μετά από εμπλουτισμό για τους τύπους με αλάτι 0,46% και 0,93% στις 22 και 24 ημέρες, αντίστοιχα. Το pH από μια αρχική τιμή 5,18±0,01 σε όλα τα εξετασθέντα δείγματα μειώθηκε από 0,06 έως 0,10 στο τέλος της συντήρησης στους 4°C και από 0,48 έως 0,54 στο τέλος της συντήρησης στους 12°C.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** *E. coli* O157:H7, βούτυρο

## Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in cultured butter during storage.

Govaris A<sup>1</sup>, Papageorgiou DK<sup>2</sup>, Papatheodorou K<sup>3</sup>

**ABSTRACT.** The survival of *E. coli* O157:H7 was examined in 3 types of butter: unsalted, salted with 0.46% and 0.93% salt. The butter samples were inoculated with a low (c.a. 3.14 log CFU/g) or high concentration (c.a. 4.80 log CFU/g) inoculum of the pathogen and were stored at 4°C and 12°C. The contaminated butter samples were stored for 2 months at 4°C and up to visible spoilage (20–26 days) at 12°C. By the end of the storage at 4°C, the tests with the high inoculum of the pathogen revealed that populations of *E. coli* O157:H7 were decreased by 2.26 log CFU/g in the unsalted and in 0.46% salted types of butter, and by 2.74 log CFU/g in the 0.93% salted type of butter, while the tests with the low inoculum of the pathogen revealed that populations of *E. coli* O157:H7 decreased by 1.81 log CFU/g in the unsalted type of butter and were detectable in the other types of butter only after enrichment. By the end of the storage at 12°C, the tests with the high inoculum of the pathogen revealed that populations of *E. coli* O157:H7 decreased by 2.71 and 3.17 log CFU/g in the unsalted and 0.46% salted types of butter, after 20 and 22 days, respectively and were detectable, in the 0.93% salted type of butter after 26 days, only after enrichment, while the tests with the low inoculum of the pathogen revealed that populations of *E. coli* O157:H7 were decreased by 1.88 log CFU/g in the unsalted type of butter after 20 days, and were detectable, in the 0.46% and 0.93% salted types of butter after 22 and 24 days, respectively, only after enrichment. The initial pH of all butter samples (5.18±0.01) decreased slightly (0.06 - 0.10) during storage at 4°C, and more (0.48 - 0.54) during storage at 12°C.

**Key words:** *E. coli* O157:H7, butter

<sup>1</sup> Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Καρδίτσα.

<sup>2</sup> Τομέας Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Εργαστήριο Υγιεινής και Τεχνολογίας του Γάλακτος, Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Τ.Κ. 540 06.

<sup>3</sup> Εργοστάσιο Γάλακτος "ΟΛΥΜΠΟΣ", Ένωση Αγροτικών Συνεταιρισμών Λάρισας, Λάρισα.

<sup>1</sup> Laboratory of Foods Hygiene of Animal Origin, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Karditsa, Greece

<sup>2</sup> Department of Food Hygiene and Technology, Laboratory of Milk Hygiene and Technology, School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 54006, Greece

<sup>3</sup> Dairy "OLYMPUS", Agricultural Union of Larisa, Larisa, Greece



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρώτη σημαντική τροφογενής λοίμωξη από *Escherichia coli* O157:H7 αναγνωρίστηκε το 1982 στις ΗΠΑ, μετά από κατανάλωση μπιφτεκιών βοείου κρέατος που δεν είχαν ψηθεί επαρκώς (Karmali 1989, Taylor 1990). Έκτοτε, η *E. coli* O157:H7 έχει δημιουργήσει σοβαρές τροφογενείς λοιμώξεις σε παγκόσμια κλίμακα με θανατηφόρα κρούσματα (Kuntz and Kuntz 1999), ενώ την τελευταία δεκαετία παρατηρείται αύξηση της συχνότητας εμφάνισης των λοιμώξεων αυτών (Betts 2000).

Η *E. coli* O157:H7 ασκεί παθογόνο δράση μέσω της παραγωγής κυτταροτοξικών τοξινών τύπου Shiga (I και II) και αιμολυσίνης καθώς και μέσω της ικανότητάς της να προσκολλάται στο βλεννογόνο του εντέρου (Betts 2000). Προκαλεί αιμορραγική κολίτιδα, αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και αιμορραγική πορφύρα με αποτελέσματα ενίοτε θανατηφόρα (Doyle and Schoeni 1987). Τα νεαρά και τα ηλικιωμένα άτομα είναι πλέον ευπαθή στην εκδήλωση ουραιμικού συνδρόμου και αιμορραγικής πορφύρας (Kuntz and Kuntz 1999, Betts 2000).

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, οι περισσότερες από τις λοιμώξεις ή τοξινώσεις εξ αιτίας της κατανάλωσης βουτύρου, οφείλονταν σε *Staphylococcus aureus* (CDC 1970, CDC 1977). Σοβαρές λοιμώξεις με θανάτους έχουν αναφερθεί στη Φινλαδία από την κατανάλωση βουτύρου μολυσμένου με *Listeria monocytogenes* (Lytikainen *et al.* 2000). Περιστατικά λοιμώξεων από κατανάλωση βουτύρου μολυσμένου με *E. coli* O157:H7 δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα, αλλά τα περισσότερα περιστατικά από αυτό το παθογόνο στέλεχος οφείλονται σε κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων από αγελαδινό γάλα και κρεατοσκευασμάτων από βόειο κρέας (Kuntz and Kuntz 1999). Περιστατικό σοβαρής λοίμωξης από παστεριωμένο γάλα που επιμολύνθηκε με *E. coli* O157:H7 έχει αναφερθεί στη Σκωτία (Upton and Coia 1994), όπως έχουν αναφερθεί επιμολύνσεις και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων (τυριά, γιαούρτια) από το στέλεχος αυτό (Morgan *et al.* 1993).

Η ανάπτυξη και η επιβίωση της *E. coli* O157:H7 έχει μελετηθεί σε απαστερίωτο και παστεριωμένο γάλα (Wang *et al.* 1997, Farrag *et al.* 1992), σε όξινη κρέμα, βουτυρόγαλα και γιαούρτι καθώς και σε διάφορα τυριά όπως Cottage, Cheddar, Φέτα και τυριά τυρογάλακτος (Hudson *et al.* 1997, Govaris *et al.* 2002, Govaris *et al.* 2001, Reitsma and Heining 1996, Kasrazadeh and Genigeorgis 1995). Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό τη μελέτη της επιβίωσης της *E. coli* O157:H7 σε βούτυρο κατά τη διάρκεια της συντήρησής του.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Καλλιέργειες

Τα στελέχη EDL-932 και EDL-933 της *E. coli* O157:H7 που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα αυτή, παραχωρήθηκαν από τον καθηγητή Κ. Γενηγιώργη. Κάθε στέλεχος αναπύχθηκε χωριστά σε 50 ml αποστεριωμένου ζωμού σόγιας TSB (Trypticase soy broth, Oxoid, Basingstoke,

## INTRODUCTION

The first important foodborne outbreak caused by *Escherichia coli* O157:H7 was recognized in 1982 in USA, after consumption of undercooked beef burgers (Karmali 1989, Taylor 1990). Since 1982, *E. coli* O157:H7 has caused severe foodborne outbreaks, sometimes causing deaths (Kuntz and Kuntz 1999), and during the last decade an increase of *E. coli* O157:H7 outbreaks has been observed (Betts 2000).

The virulence of *E. coli* O157:H7 is attributed to the production of the cytotoxic Shiga-like toxins (I and II) hemolysin synthesis and the ability to adhere and colonize intestinal surfaces (Betts 2000). *E. coli* O157:H7 can cause hemorrhagic colitis, hemolytic uremic syndrome, thrombocytopenic purpura and occasionally may lead to death (Doyle and Schoeni 1987). Young children and the elderly are most vulnerable to hemolytic uremic syndrome and thrombocytopenic purpura (Kuntz and Kuntz 1999, Betts 2000).

Most of the outbreaks or intoxications due to consumption of contaminated butter, reported worldwide have been caused by *Staphylococcus aureus* (CDC 1970, CDC 1977). Outbreaks with consumer deaths have been also reported in Finland after consumption of butter contaminated with *Listeria monocytogenes* (Lytikainen *et al.* 2000). Outbreaks from butter contaminated with *E. coli* O157:H7 have not been reported so far. The majority of *E. coli* O157:H7 outbreaks were due to consumption of contaminated dairy products produced from cow's milk and beef meat products (Kuntz and Kuntz 1999). A severe outbreak from pasteurized milk contaminated with *E. coli* O157:H7 was reported in Scotland (Upton and Coia 1994), and there are reports of other dairy products (cheese, yogurt) contaminated with this pathogen (Morgan *et al.* 1993).

The growth and survival of *E. coli* O157:H7 has been studied in pasteurized and unpasteurized milk (Wang *et al.* 1997, Farrag *et al.* 1992) in various dairy products such as sour cream, buttermilk and yogurt in cheese such as Cottage, Cheddar, Feta and whey cheese (Hudson *et al.* 1997, Govaris *et al.* 2002, Govaris *et al.* 2001, Reitsma and Heining 1996, Kasrazadeh and Genigeorgis 1995). The purpose of the present work was to study the survival of *E. coli* O157:H7 in butter during storage.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains

The two *E. coli* O157:H7 strains EDL-932 and EDL-933 used in this study were kindly provided by Prof. Genigeorgis. Each strain was grown separately in 50 ml sterile trypticase soy broth (TSB of Oxoid, Basingstoke, England) for 24 h at 37°C, with two consecutive transfers. The inoculum of *E. coli* O157:H7 was prepared according to Govaris *et al.* (2001) and was used for the contamination tests of butter. The bacterial cells were pelleted by centrifugation at 2,500x g for 20 min, washed once in 10 ml



England) στους 37°C για 24h, με δύο διαδοχικές ανακαλλιέργειες. Η καλλιέργεια της *E. coli* O157:H7, παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται από τους Govaris και συν. (2001) και χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική μόλυνση του βουτύρου. Τα κύτταρα του μικροβίου συγκεντρώθηκαν με φυγοκέντρηση (2.500 g/20 min), πλύθηκαν για μία φορά σε 10 ml από 0.1 Phosphate Buffered Saline (PBS) (Oxoid) και αραιώθηκαν σε  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml σε PBS. Τα δύο στελέχη ενώθηκαν σε περίπου ίσες συγκεντρώσεις. Η μέτρηση των κυττάρων του μικροβίου έγινε με διαδοχικές αραιώσεις και ακολούθη μέτρηση σε Tryptone Soy Agar (Oxoid). Η παραχθείσα καλλιέργεια της *E. coli* O157:H7 (περίπου  $10^8$  log CFU/ml) χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική μόλυνση του βουτύρου.

Η οξυγαλακτική καλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε για την ωρίμανση της κρέμας ήταν ένα μίγμα από εμπορικά στελέχη μεσόφιλων οξυγαλακτικών βακτηρίων *Lactococcus lactis* susp. *lactis*, *Lactococcus lactis* susp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* susp. *diacetylactis* και *Leuconostoc mesenteroides* susp. *cremoris* 1:1:1:1, CH-N-22 (Chr. Hansen A/S, Horlom, Denmark) σε αναλογία 10 g/200 Kg κρέμας. Η οξυγαλακτική καλλιέργεια ενοφθαλμίστηκε σε 250 ml αποστειρωμένου γάλακτος και επωάστηκε για 30 min στους 28°C πριν από την προσθήκη της στην κρέμα.

#### Παραγωγή βουτύρου και επιμόλυνσή του με *E. coli* O157:H7

Η παραγωγή του βουτύρου έγινε σε εγκαταστάσεις γαλακτοβιομηχανίας κάτω από αυστηρές συνθήκες υγιεινής, όπως περιγράφεται από τους Ryser και συν. (1985). Για την παρασκευή του βουτύρου χρησιμοποιήθηκε παστεριωμένη κρέμα (48% λιπαρά) από αγελαδινό γάλα. Η κρέμα (200 Kg) ενοφθαλμίστηκε με την οξυγαλακτική καλλιέργεια, επωάστηκε στους 18°C για 24 ώρες, συνέχεια ψύχθηκε στους 16°C για 15 ώρες και ακολούθησε η βουτυροποίηση της.

Η παραγωγή του βουτύρου έγινε σε περιστρεφόμενη κυλινδρική βουτυροκάδη ZP 500, (Petribiaci, Marano, Italy). Μετά τη βουτυροποίηση της κρέμας για 40 min, έγινε απομάκρυνση του βουτυρογάλακτος και προστέθηκε αποστειρωμένο νερό θερμοκρασίας 4°C, για την έκπλυση του βουτύρου. Μετά τη βουτυροποίηση διαχωρίστηκε ποσότητα βουτύρου 2 Kg εις τριπλούν και παρασκευάστηκαν οι εξής 3 τύποι βουτύρου: Βούτυρο χωρίς αλάτι, βούτυρο με μικρό ποσοστό αλατιού 0,5% και βούτυρο με μεγάλο ποσοστό αλατιού 1,0%. Η μάλαξη του βουτύρου στους 14-15°C για περίπου 15 min και η προσθήκη του αλατιού έγινε με το χέρι σε ανοξείδωτο τραπέζι που είχε εξυγιανθεί με ατμό. Στο τέλος της διαδικασίας μάλαξης, έγινε έλεγχος της περιεκτικότητας σε χλωριούχο νάτριο.

Στη συνέχεια έγινε ο ενοφθαλμισμός του βουτύρου με την καλλιέργεια της *E. coli* O157:H7. Κάθε τύπος βουτύρου (χωρίς αλάτι, με μικρό ή μεγάλο ποσοστό αλατιού) χωρίστηκε σε 2 μέρη (του 1 Kg) και το κάθε μέρος ενοφθαλμίστηκε με μικρό ή μεγάλο πληθυσμό της *E. coli*

of 0.1 Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.0, and diluted to  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml in PBS. The two strains were combined at about equal concentrations. Cell counts were determined by serial dilution and subsequent enumeration on Tryptone Soy Agar (Oxoid). The inoculum of *E. coli* O157:H7 (ca  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml) was used to contaminate butter samples.

The starter culture used for biological ripening of cream was a mixture of commercial dehydrated mesophilic strains of lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* susp. *lactis*, *Lactococcus lactis* susp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* susp. *diacetylactis* και *Leuconostoc mesenteroides* susp. *cremoris* 1:1:1:1, CH-N-22 (Chr. Hansen A/S, Horlom, Denmark) in a dose of 10 g/200 Kg cream. The dehydrated culture was first regenerated in 250 ml of sterile milk for 30 min at 28°C before its addition to cream.

#### Butter production and contamination with *E. coli* O157:H7 tests

The butter was manufactured in a commercial milk plant facility under strict hygienic control according to Ryser *et al.* (1985). Pasteurized cow's milk cream (48% fat) was used for production of butter. The cream (200 Kg) was mixed with the starter culture and then incubated at 18°C for 24 h. Then it was cooled at 16°C for 15 h before churning. Churning was made in a rotated cylindrical churn ZP 500, (Petribiaci, Marano, Italy) for 40 min. After churning the buttermilk was removed and sterile cold water (4°C) was added, for butter washing. Three portions of butter of 2 Kg each were used for the preparation of the three butter types: a) unsalted, b) salted with low dosage of salt (0.5%) and c) salted with high dosage of salt (1.0%). Working of butter was made at 14-15°C for 15 min and mixing of salt was made manually at a steam sanitized stainless table. After working of butter, the salt content of butter samples was measured.

Afterwards, the butter was mixed with the inoculum of *E. coli* O157:H7. Each butter type was split and each portion of 1 Kg was inoculated with the low or the high population of *E. coli* O157:H7. To ensure adequate distribution of *E. coli* O157:H7, the inoculated butter was mixed thoroughly for about 15 min manually at a steam sanitized stainless table. Each type of butter was inoculated with *E. coli* O157:H7 to contain c.a.  $3.14 \log$  CFU/g or c.a.  $4.80 \log$  CFU/g of butter for the tests with the low or high inoculum, respectively. Each type of butter with the low or high inoculum of *E. coli* O157:H7, was divided in four portions of 250 g, which were placed in sterile plastic cups and cooled with cold water (2°C) for 30 min. The samples of butter were stored at 4°C and 12°C for resembling proper and improper storage conditions, respectively.

#### Enumeration of *E. coli* O157:H7

Sampling of butter was made according to the IDF procedures (IDF Standard 50C: 1955), at the following time intervals: every 4 days for samples stored at 4°C and



O157:H7. Η συγκέντρωση του μικρού ενοφθαλμίσματος ήταν ca. 3,14 log CFU/g και του μεγάλου ενοφθαλμίσματος ήταν ca. 4,80 log CFU/g. Η μάλαξη του βουτύρου συνεχίστηκε για περίπου 15 min για να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή ανάμειξή του με την *E. coli* O157:H7. Στη συνέχεια, ο κάθε τύπος του βουτύρου με μικρό ή μεγάλο πληθυσμό της *E. coli* O157:H7, χωρίστηκε σε 4 μέρη των 250 g περίπου, τα οποία τοποθετήθηκαν σε στείρα πλαστικά κύπελλα και ψύχθηκαν σε νερό θερμοκρασίας 2°C για 30 min. Τα δείγματα του βουτύρου παρέμειναν σε θερμοκρασίες συντήρησης 4°C και 12°C, για την προσομοίωση κανονικής και μη κανονικής συντήρησης, αντίστοιχα.

#### Αρίθμηση της *E. coli* O157:H7

Η δειγματοληψία του βουτύρου γινόταν σύμφωνα με τις οδηγίες της IDF (IDF Standard 50C, 1995) και μετά την επιμόλυνση του βουτύρου με την *E. coli* O157:H7 στα ακόλουθα χρονικά διαστήματα: Κάθε 4 ημέρες στα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 4°C και κάθε 2 ημέρες στα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 12°C.

Σε κάθε προγραμματισμένη δειγματοληψία, διπλά δείγματα από 10 g βουτύρου μεταφέρονταν σε αποστειρωμένες σακούλες stomacher και αραιώνονταν 1:10 σε αποστειρωμένο tryptose broth με 2% sodium citrate θερμοκρασίας 40±1°C. Μετά τη 10<sup>-1</sup> αραιώση, οι επόμενες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις γίνονταν σε στείρο 0,1% phosphate buffer saline (PBS, Oxoid) θερμοκρασίας 40±1°C και ακολουθούσε ενοφθαλμισμός (0,1 ml) στην επιφάνεια του Sorbitol-McConkey Agar (SMAC, Oxoid). Στη συνέχεια τα τρυβλία επωάζονταν στους 37°C για 48 h. Όταν η *E. coli* O157:H7 δεν ήταν ανιχνεύσιμη στο υπόστρωμα SMAC, για την αναζήτηση των επιζώντων ή τραυματισμένων κυττάρων κάτω από το όριο αρίθμησης, γινόταν εμπλουτισμός σε τροποποιημένο ζωμό *E. coli* (CM 990, Oxoid) που περιείχε novobiocin (SR 181, Oxoid) (Wang *et al.* 1997). Τα εμπλουτισμένα δείγματα επωάζονταν στους 37°C για 16–18 h σε επωαστήρα με μηχανισμό ανακίνησης (150 rpm). Η παρουσία ή όχι της *E. coli* O157:H7 στον εμπλουτιστικό ζωμό, επιβεβαιωνόταν με απευθείας επιφανειακό ενοφθαλμισμό (0,1 ml) σε Sorbitol-McConkey Agar (SMAC, Oxoid). Τα τρυβλία επωάζονταν στους 37°C για 48 h. Σε περιπτώσεις αμφίβολης αναγνώρισης των χαρακτηριστικών αποικιών, αυτές υποβάλλονταν σε έλεγχο με API tests και συγκόλληση με αντιγόνο O:157 (*E. coli* O157 Latex test, Oxoid).

#### Φυσικοχημική εξέταση

Οι δειγματοληψίες για τη φυσικοχημική εξέταση του βουτύρου γίνονταν στα ίδια διαστήματα που γίνονταν δειγματοληψίες για την αρίθμηση της *E. coli* O157:H7. Το λίπος, η υγρασία, καθώς και το χλωριούχο νάτριο του βουτύρου προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τους Bradley και συν. (1992). Το pH των δειγμάτων του βουτύρου προσδιοριζόταν με πεχάμετρο τύπου 525, WTW (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, GmbH, D 82362 Weilheim, Germany).

every 2 days for samples stored at 12°C.

At each designated sampling period, duplicate samples of 10g of butter were placed in sterile stomacher bags and were diluted 1:10 in warm (40±1°C) sterile tryptose broth with 2% sodium citrate. After the 10-1 dilution, the rest serial decimal dilutions were made into a warm (40±1°C) sterile 0.1% phosphate buffer saline (PBS, Oxoid), followed by direct plating of 0.1 ml of appropriate dilutions on sorbitol-McConkey agar (SMAC; Oxoid). Plates were incubated at 37°C for 48 h. Whenever *E. coli* O157:H7 was not detected by direct plating on to SMAC and surviving or stressed cells of the pathogen below the lower counting limit were detected by enrichment into modified *E. coli* broth (CM 990, Oxoid) supplemented with novobiocin (SR 181, Oxoid) (Wang *et al.* 1997). Enriched samples were incubated at 37°C for 16–18 h, in a shaker incubator (150 rpm). The presence or absence, of *E. coli* O157:H7 in the enrichment broth, was confirmed by direct plating (0.1 ml) on Sorbitol-McConkey Agar (SMAC, Oxoid). Plates were incubated at 37°C for 48 h. In cases of non-characteristic colonies of *E. coli* O157:H7, confirmation was made using the API test and O157 antiserum (*E. coli* O157 Latex test, Oxoid).

#### Physicochemical analysis

Sampling for physicochemical analysis of butter was made at the same sampling time intervals for enumeration of *E. coli* O157:H7. Moisture, sodium chloride and fat content of butter samples were estimated according to procedures described by Bradley *et al.* (1992), while the pH was measured with a type 525 WTW pH meter, (Wissenschaftlich – Technische Werkstätten, GmbH, D 82362 Weilheim, Germany).

#### Statistical analysis

All the experiments were performed in duplicate and the entire study comprised of 24 trials (three butter types X two inoculum X two storage temperature, all in duplicate: 3 x 2 x 2 x 2 = 24). All microbiological assays were performed in duplicate. Statistical differences were determined using the Students t-test, after analysis of variance.

#### RESULTS AND DISCUSSION

The possibility of pre-existing contamination of the butter with *E. coli* during butter preparation and handling was checked by examining it for *E. coli* presence before inoculation with the test strain. The absence of *E. coli* O157:H7 in the produced butter types was verified by the enrichment culture and subsequent plating on SMAC, before they were inoculated with the pathogen.

The composition of butter used in the tests was in accordance with the Greek State Regulations of Foods and Beverages (1994) (Table 1). The analysis of butter samples showed that the sodium chloride content was 0.46±0.05% and 0.93±0.04%, which is almost identical to aimed salt content of 0.5% and 1.0%, for the butter types with low and



## Στατιστική ανάλυση

Όλοι οι πειραματισμοί έγιναν εις διπλούν και η εργασία περιελάμβανε 24 δοκιμές (τρεις τύποι βουτύρου x δύο ενοφθαλμίσματα x δύο θερμοκρασίες επώασης, όλα εις διπλούν:  $3 \times 2 \times 2 \times 2 = 24$ ). Οι μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε διπλά δείγματα. Οι στατιστικές διαφορές αξιολογήθηκαν με το t-test, μετά από ανάλυση των διακυμάνσεων.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πιθανότητα επιμόλυνσης του βουτύρου με *E. coli* O157:H7, κατά την παρασκευή του και κατά τους χειρισμούς που ακολούθησαν ελέγχθηκε με την εξέτασή του για παρουσία της *E. coli* O157:H7 πριν από τον ενοφθαλμισμό του βουτύρου με το παθογόνο. Η *E. coli* O157:H7 δεν ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο του εμπλουτισμού και ακόλουθο ενοφθαλμισμό σε υπόστρωμα SMAC στο βούτυρο που παρασκευάσθηκε, πριν από την πειραματική μόλυνσή του.

Η σύσταση του βουτύρου που χρησιμοποιήθηκε στους πειραματισμούς πληρούσε τις προδιαγραφές που ορίζει ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (1994) (Πίνακας 1). Η ανάλυση των δειγμάτων βουτύρου έδειξε ότι το χλωριούχο νάτριο που βρέθηκε  $0,46 \pm 0,05\%$  και  $0,93 \pm 0,04\%$  ήταν σχεδόν ταυτόσημο με το στόχο της περιεκτικότητας με  $0,5\%$  και  $1,0\%$  αλάτι, στους τύπους του βουτύρου με μικρό και μεγάλο ποσοστό αλατιού, αντίστοιχα. Τρεις διαδοχικές φυσικοχημικές αναλύσεις σ' όλη τη διάρκεια των πειραματισμών (αρχή, μέση και τέλος του χρόνου συντήρησης) έδειξαν ότι το λίπος, η υγρασία και το χλωριούχο νάτριο του βουτύρου δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά ( $P < 0,05$ ) μέχρι το τέλος της συντήρησης στους  $4^\circ\text{C}$  και  $12^\circ\text{C}$  (Πίνακας 1). Το pH από μια αρχική τιμή  $5,18 \pm 0,01$  σε όλα τα εξετασθέντα δείγματα μειώθηκε από  $0,06$  έως  $0,10$  στο τέλος της συντήρησης στους  $4^\circ\text{C}$  και από  $0,48$  έως  $0,54$  στο τέλος της συντήρησης στους  $12^\circ\text{C}$ .

## Συντήρηση του βουτύρου στους $4^\circ\text{C}$

Η συμπεριφορά της *E. coli* O157:H7 στα δείγματα βουτύρου με μεγάλο πληθυσμό ( $4,88 \pm 0,15 \log \text{CFU/g}$ ) και συντήρησής τους σε θερμοκρασία  $4^\circ\text{C}$  για 2 μήνες, φαίνεται στο Σχήμα 1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αρχικοί πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7, από ( $4,88 \pm 0,15 \log \text{CFU/g}$ ) σε όλα τα εξετασθέντα δείγματα του βουτύρου, μειώθηκαν κατά μέσον όρο  $2,26 \log \text{CFU/g}$  για τα δείγματα του βουτύρου χωρίς αλάτι και με αλάτι σε ποσοστό  $0,46\%$  και κατά μέσον όρο  $2,74 \log \text{CFU/g}$  για τα δείγματα του βουτύρου με αλάτι σε ποσοστό  $0,93\%$ . Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1 η μείωση των πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 ήταν μεγαλύτερη στην αρχική διάρκεια της συντήρησης στους  $4^\circ\text{C}$  και μέχρι τη 16η ημέρα για όλους τους εξετασθέντες τύπους του βουτύρου, ενώ μετέπειτα και μέχρι το τέλος της συντήρησης ο ρυθμός της πτώσης ήταν μικρότερος σε σχέση με εκείνη της αρχικής συντήρησης. Σ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους  $4^\circ\text{C}$  οι πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 στο βούτυρο με ποσοστό αλατιού  $0,93\%$  ήταν σημαντικά μικρότεροι ( $P < 0,01$ ) των α-

**Πίνακας 1.** Φυσικοχημικές παράμετροι του βουτύρου που χρησιμοποιήθηκε στους πειραματισμούς.

Τύπος βουτύρου	Λίπος (%)*	Υγρασία (%)*	Χλωριούχο νάτριο (προσδιορισμένο) (%)*
Βούτυρο χωρίς αλάτι	$83,2 \pm 0,09$	$15,4 \pm 0,10$	-
Βούτυρο με μικρό ποσοστό αλατιού	$83,3 \pm 0,05$	$15,2 \pm 0,08$	$0,46 \pm 0,05$
Βούτυρο με μεγάλο ποσοστό αλατιού	$83,5 \pm 0,02$	$14,7 \pm 0,08$	$0,93 \pm 0,04$

\* Μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση.

**Table 1.** Physicochemical composition of butter used in contamination tests.

Butter type	Fat (%)*	Moisture (%)*	Sodium Chloride (measured) (%)*
Unsalted butter	$83,2 \pm 0,09$	$15,4 \pm 0,10$	-
Butter with low content of salt	$83,3 \pm 0,05$	$15,2 \pm 0,08$	$0,46 \pm 0,05$
Butter with high content of salt	$83,5 \pm 0,02$	$14,7 \pm 0,08$	$0,93 \pm 0,04$

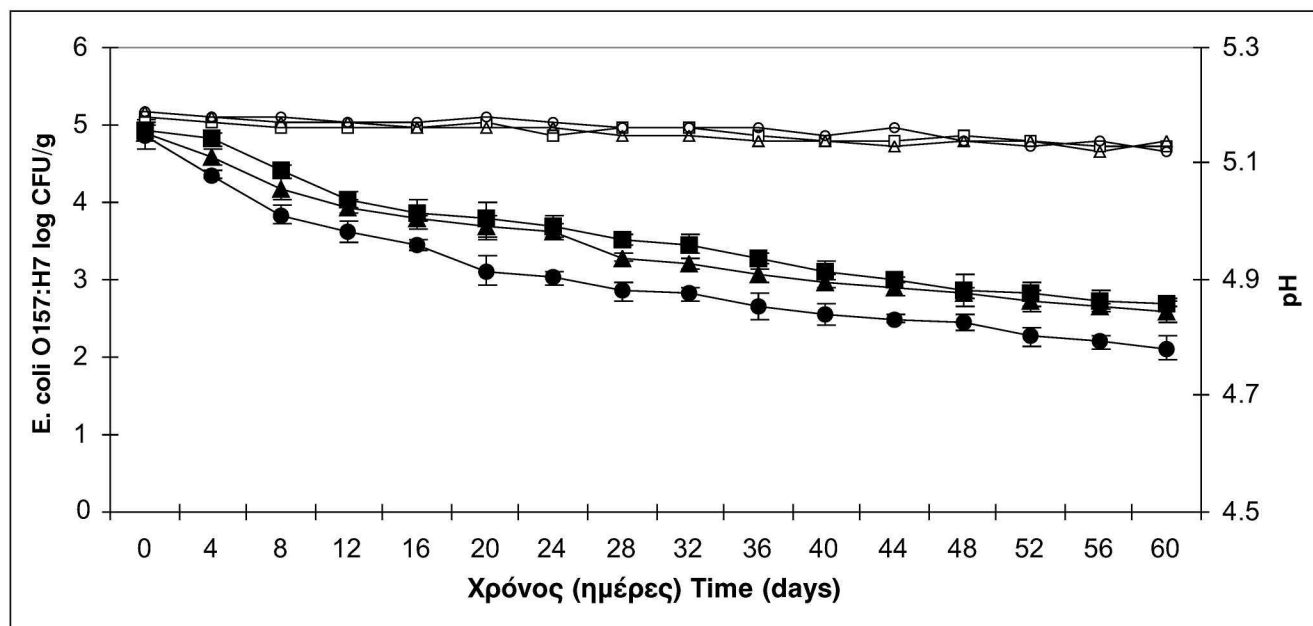
\* Mean value  $\pm$  standard deviation.

high salt content, respectively. Three subsequent physicochemical analyses during the tests (beginning, middle and end of storage period) showed that the fat, moisture and the sodium chloride content of butter were not changed significantly ( $P < 0,05$ ) up to the end of storage period at  $4^\circ\text{C}$  and  $12^\circ\text{C}$  (Table 1). The pH from an initial value of  $5,18 \pm 0,01$  reduced slightly ( $0,06$  to  $0,10$ ) in all examined butter samples during storage at  $4^\circ\text{C}$  and significantly ( $0,48$  to  $0,54$ ) during storage at  $12^\circ\text{C}$ .

## Storage of butter at $4^\circ\text{C}$

The behavior of *E. coli* O157:H7 in samples of butter with the high inoculum ( $4,88 \pm 0,15 \log \text{CFU/g}$ ) and storage at  $4^\circ\text{C}$  for two months is shown in Figure 1. The results showed that *E. coli* O157:H7, from an initial populations of  $4,88 \pm 0,15 \log \text{CFU/g}$  were decreased by an average of  $2,26 \log \text{CFU/g}$  in the unsalted and in  $0,46\%$  salted types of butter and by an average of  $2,74 \log \text{CFU/g}$  in the  $0,93\%$  salted type of butter. The decrease was higher at the beginning of the storage at  $4^\circ\text{C}$  and up to the 16th day for all examined butter types, while afterwards and up to the end of storage the decrease ration was lower than that of the initial period (Figure 1). Throughout the storage at  $4^\circ\text{C}$  all *E. coli* O157:H7 populations in the  $0,93\%$  salted butter





**Σχήμα 1.** Μεταβολές του πληθυσμού της *E. coli* O157:H7 ■▲● και του pH □△○ κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 4°C του βουτύρου: α) ■□ χωρίς αλάτι, β) ▲△ με αλάτι 0,42% και γ) ●○ με αλάτι 0,93%. Πειραματισμοί με μεγάλο αρχικό πληθυσμό του παθογόνου ( $4,88 \pm 0,15 \log \text{CFU/g}$ ).

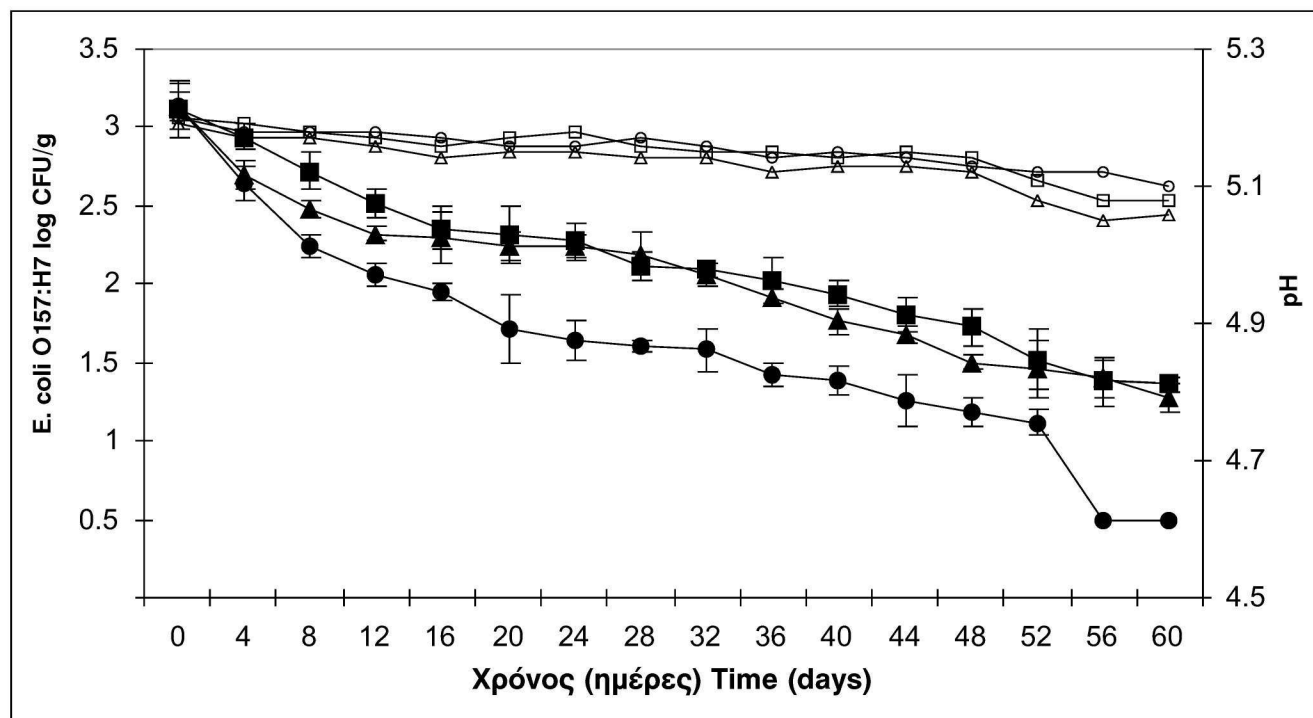
**Figure 1.** Changes in populations of *E. coli* O157:H7 ■▲● and pH □△○ during storage of butter at 4°C: a) ■□ unsalted, b) ▲△ with 0.42% salt and c) ●○ with 0.93% salt. Tests with high inoculum of the pathogen ( $4.88 \pm 0.15 \log \text{CFU/g}$ ).

ντίστοιχων πληθυσμών των άλλων εξετασθέντων τύπων του βουτύρου, χωρίς αλάτι και με αλάτι 0,46%. Οι πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 στο βούτυρο με ποσοστό αλατιού 0,46% σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς του βουτύρου χωρίς αλάτι ήταν σημαντικά μικρότεροι ( $P < 0,01$ ) στις ακόλουθες ημέρες των δειγματοληψιών: αρχικά στις 4 και 8 ημέρες καθώς και από την 28η μέχρι την 36η ημέρα, ενώ στις υπόλοιπες ημέρες των δειγματοληψιών και μέχρι το τέλος της συντήρησης στους 4°C δεν υπήρχε σημαντική διαφορά ( $P > 0,01$ ) μεταξύ τους. Το pH όλων των εξετασθέντων τύπων βουτύρου από την αρχική τιμή 5,19 μειώθηκε ελάχιστα (0,06) στο τέλος της συντήρησης στους 4°C (Σχήμα 1). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το pH των δειγμάτων των εξετασθέντων τύπων βουτύρου είχαν σχεδόν την ίδια μικρή πτώση.

Η συμπεριφορά της *E. coli* O157:H7 σε δείγματα βουτύρου με μικρό πληθυσμό ( $3,13 \pm 0,14 \log \text{CFU/g}$ ) κατά τη συντήρησή τους σε θερμοκρασία 4°C για 2 μήνες, φαίνεται στο Σχήμα 2. Για τα δείγματα του βουτύρου χωρίς αλάτι και με αλάτι σε ποσοστό 0,46%, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 μειώθηκαν κατά μέσον όρο  $1,81 \log \text{CFU/g}$  στο τέλος της συντήρησης στους 4°C. Για τα δείγματα του βουτύρου με αλάτι σε ποσοστό 0,93%, οι πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 αριθμούνταν σε υπόστρωμα SMAC με απευθείας ενοφθαλμισμό μέχρι την 52η ημέρα, ενώ στις επόμενες δειγματοληψίες την 56η και 60η ημέρα ήταν ανιχνεύσιμοι μόνο μετά από εμπλουτισμό σε τροποποιημένο ζωμό *E. coli* (CM 990 Oxoid) και ενοφθαλμισμό σε υπόστρωμα SMAC. Τα αποτελέσματα έ-

were significantly lower ( $P < 0.01$ ) than those of the other tested types of butter (the unsalted and 0.46% salted types). Moreover the populations of *E. coli* O157:H7 in the 0.46% salted type of butter were significantly lower ( $P < 0.01$ ) than those counted in the unsalted butter at the following sampling days: initially in 4th and 8th days and from the 28th up to the 36th day. However during the remaining sampling days, and up to the end of storage at 4°C there was no significant difference ( $P > 0.01$ ) between them. The pH of all examined samples of butter decreased slightly (0.06) from an initial value of 5.19 by the end of storage at 4°C (Figure 1).

The behavior of *E. coli* O157:H7 in samples of butter with the low inoculum ( $3.13 \pm 0.14 \log \text{CFU/g}$ ) during storage at 4°C for two months, is shown in Figure 2. For the unsalted and the 0.46% salted samples of butter, the results showed that the populations of *E. coli* O157:H7 decreased by an average of  $1.81 \log \text{CFU/g}$  by the end of storage at 4°C. For the 0.93% salted samples of butter, the populations of *E. coli* O157:H7 were counted by direct plating on SMAC up to the 52nd day. After that day detection at 56th up to 60th days was done only after enrichment in *E. coli* modified broth (CM 990, Oxoid) and following plating on SMAC. The results showed that the decrease of the populations of *E. coli* O157:H7 in tests with the low inoculum was similar to that of high inoculum in all examined types of butter during storage at 4°C. Figure 2 shows that the decrease of populations of *E. coli* O157:H7 was higher at the beginning of storage at 4°C and up to



**Σχήμα 2.** Μεταβολές του πληθυσμού της *E. coli* O157:H7 ■▲● και του pH □△○ κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 4°C του βουτύρου: α) ■□ χωρίς αλάτι, β) ▲△ με αλάτι 0,42% και γ) ●○ με αλάτι 0,93%. Πειραματισμοί με μικρό αρχικό πληθυσμό του παθογόνου ( $3,13 \pm 0,14$  log CFU/g). Τιμές μικρότερες των 1 log CFU/g καταγράφηκαν με τη μέθοδο του εμπλουτισμού και σημειώνονται ως θετικές.

**Figure 2.** Changes in populations of *E. coli* O157:H7 ■▲● and pH □△○ during storage of butter at 4°C: a) ■□ unsalted, b) ▲△ with 0.42% salt and c) ●○ with 0.93% salt. Tests with low inoculum of the pathogen ( $3,13 \pm 0,14$  log CFU/g). Values lower than 1 log CFU/g were recorded by using the enrichment method and marked as positive.

δειξαν ότι η μείωση των πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 στους πειραματισμούς με μικρό πληθυσμό ήταν παρόμοια με εκείνη των πειραματισμών με το μεγάλο πληθυσμό στους εξετασθέντες τύπους βουτύρου στη διάρκεια της συντήρησης στους 4°C. Στο Σχήμα 2 φαίνεται ότι η μείωση των πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 ήταν μεγαλύτερη στην αρχική διάρκεια της συντήρησης στους 4°C μέχρι τη 16η ημέρα για τους τύπους του βουτύρου χωρίς αλάτι και με ποσοστό αλατιού 0,46% και μέχρι την 20η ημέρα για τον τύπο του βουτύρου με ποσοστό αλατιού 0,93%, ενώ μετέπειτα και μέχρι το τέλος της συντήρησης ο ρυθμός της πτώσης ήταν μικρότερος σε σχέση με εκείνη της αρχικής συντήρησης για όλους τους τύπους βουτύρου. Στη συντήρηση στους 4°C των τύπων βουτύρου με μικρό πληθυσμό της *E. coli* O157:H7, οι πληθυσμοί του παθογόνου στο βούτυρο με ποσοστό αλατιού 0,93% ήταν σημαντικά μικρότεροι ( $P < 0,01$ ) των αντίστοιχων πληθυσμών των άλλων εξετασθέντων τύπων του βουτύρου χωρίς αλάτι και με αλάτι 0,46% σ' όλη τη διάρκεια των 2 μηνών της συντήρησης, εκτός της δειγματοληψίας στην 4η ημέρα όπου δεν υπήρξε σημαντική διαφορά ( $P > 0,01$ ) μεταξύ των πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων των τύπων του βουτύρου με ποσοστό αλατιού 0,46% και 0,93%. Οι πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 στο βούτυρο με ποσοστό αλατιού 0,46%

16th day, in the unsalted and in 0.46% salted types of butter and up to 20th day in the 0.93% salted type of butter, while later on, the rate of decrease was lower than this of the beginning of storage for all butter types. For the butter types with the low inoculum of *E. coli* O157:H7 during storage at 4°C, the populations of the pathogen in the 0.93% salted type of butter were significantly lower ( $P < 0.01$ ) than those of the other examined butter types (the unsalted and 0.46% salted types) during the two months of storage, except from that in the 4th day of sampling, since then there was no significant difference ( $P > 0.01$ ) between the populations of *E. coli* O157:H7 in the 0.46% and 0.93% salted butter types. The populations of *E. coli* O157:H7 in the 0.46% salted type of butter were significantly lower ( $P < 0.01$ ) than those counted in the unsalted butter at the following sampling days: initially from the 4th up to the 12th day and in 40th and 48th day, while during the remaining sampling days, and up to the end of storage at 4°C, there was no significant difference ( $P > 0.01$ ) between them. The pH of all examined samples of butter decreased slightly (0.10) from an initial value of 5.20 by the end of storage at 4°C (Figure 2).

During the two months storage period at 4°C, all types



σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς του βουτύρου χωρίς αλάτι ήταν σημαντικά μικρότεροι ( $P < 0,01$ ) στις ακόλουθες ημέρες των δειγματοληψιών: αρχικά μεταξύ της 4ης και 12ης ημέρας καθώς επίσης την 40η και την 48η ημέρα, ενώ στις υπόλοιπες ημέρες των δειγματοληψιών και μέχρι το τέλος της συντήρησης στους  $4^{\circ}\text{C}$  δεν υπήρχε σημαντική διαφορά ( $P > 0,01$ ) μεταξύ τους. Το pH όλων των εξετασθέντων τύπων βουτύρου από την αρχική τιμή 5,20 μειώθηκε ελάχιστα (0,10) στο τέλος της συντήρησης στους  $4^{\circ}\text{C}$  (Σχήμα 2). Όπως και στους πειραματισμούς με μεγάλο πληθυσμό της *E. coli* O157:H7 στη συντήρηση στους  $4^{\circ}\text{C}$ , τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το pH των δειγμάτων των εξετασθέντων τύπων βουτύρου είχαν σχεδόν την ίδια μικρή πτώση.

Σ' όλη τη διάρκεια των 2 μηνών της συντήρησης στους  $4^{\circ}\text{C}$ , κανένα από τα εξετασθέντα δείγματα όλων των τύπων του βουτύρου δεν έδειξε σημεία αλλοίωσης, είτε ενοφθαλμίστηκαν μεγάλοι είτε μικροί πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7. Άλλοι ερευνητές επίσης βρήκαν ότι το παθογόνο αυτό δεν δημιουργεί εμφανή σημεία αλλοίωσης σε παστεριωμένο γάλα κατά τη διάρκεια της συντήρησής του σε θερμοκρασία  $5^{\circ}\text{C}$  (Wang *et al.* 1997) και σε Μυζήθρα, Ανθότυρο και Μανούρι στη διάρκεια της συντήρησής τους στους  $4^{\circ}\text{C}$  (Govaris *et al.* 2001).

Η μείωση του αρχικού πληθυσμού του παθογόνου οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως, το χαμηλό pH, η ύπαρξη NaCl, ή τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα μεταβολικά προϊόντα που παράγουν, καθώς και στην αλληλεπίδραση των παραγόντων αυτών στην *E. coli* O157:H7. Οι Reitsma και Henning (1996) βρήκαν ότι η *E. coli* O157:H7 επέζησε για 158 μέρες σε τυρί Cheddar με pH 4,95–5,2, στη διάρκεια της ωρίμανσης και συντήρησης σε θερμοκρασία  $2^{\circ}\text{C}$ . Οι Hudson και συν. (1997) παρατήρησαν ότι η *E. coli* O157:H7 ήταν ανιχνεύσιμη σε τυρί Cottage με pH 4,8 μετά την παρασκευή του και την παραμονή του σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$  για 26 μέρες. Στη συντήρηση τυριών τυρογάλακτος (Μυζήθρα, Ανθότυρο και Μανούρι) σε θερμοκρασία  $2^{\circ}\text{C}$  για 30 μέρες, η *E. coli* O157:H7, από τους αρχικούς πληθυσμούς (c.a.  $6,25 \log \text{CFU/g}$ ) που ενοφθαλμίστηκαν, μειώθηκε περίπου κατά  $2,5 \log \text{CFU/g}$  (Govaris *et al.* 2001). Σε παστεριωμένο γάλα που συντηρήθηκε στους  $2^{\circ}\text{C}$  για 28 μέρες, η *E. coli* O157:H7 μειώθηκε κατά  $1,6\text{--}2,0 \log \text{CFU/g}$  (Wang *et al.* 1997). Διαφορετική ήταν η συμπεριφορά της *L. monocytogenes* σε βούτυρο που συντηρήθηκε σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$ , όπως παρατήρησαν οι Olsen και συν. (1988) που βρήκαν ότι το παθογόνο αυτό αναπτύχθηκε από ένα αρχικό πληθυσμό 3,5 σε  $6,0 \log \text{CFU/g}$  έπειτα από 6–8 εβδομάδες συντήρησης στη θερμοκρασία αυτή. Είναι όμως γνωστό ότι η *L. monocytogenes* μπορεί και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες ψύξεως (Rosenow and Marth 1987, Papageorgiou and Marth 1989, Papageorgiou *et al.* 1996).

Διαφορετικές τιμές pH έχουν αναφερθεί για την ανάπτυξη της *E. coli* O157:H7. Σε pH μικρότερο του 5,5, η ανάπτυξη της *E. coli* O157:H7 σε καλλιέργειες (Buchanan and Klawitter 1992, Conner and Controla 1995)

of the examined butter showed no sign of spoilage, independently of the populations of *E. coli* O157:H7 inoculated. Other researchers also found that this pathogen does not cause any visible signs of spoilage in pasteurized milk during storage at  $5^{\circ}\text{C}$  (Wang *et al.* 1997) and in whey cheeses Myzithra, Anthotyros and Manouri during storage at  $4^{\circ}\text{C}$  (Govaris *et al.* 2001).

The decrease in populations of the pathogen may be due to factors such as the low pH, the presence of NaCl, or the antagonism of lactic acid bacteria and their metabolic products, as well as to the effect of all these factors on *E. coli* O157:H7. Reitsma and Henning (1996) found that *E. coli* O157:H7 survived for 158 days in Cheddar cheese with pH 4.95–5.2, during ripening and storage at  $2^{\circ}\text{C}$ . Hudson *et al.* (1997) observed that *E. coli* O157:H7 was detectable in Cottage cheese with a pH 4.8 during manufacture and storage at  $4^{\circ}\text{C}$  for 26 days. During storage of whey cheeses Myzithra, Anthotyros and Manouri at a temperature of  $2^{\circ}\text{C}$  for 30 days, populations of *E. coli* O157:H7 from initial numbers of c.a.  $6.25 \log \text{CFU/g}$  were decreased by an average of  $2.5 \log \text{CFU/g}$  (Govaris *et al.* 2001). In pasteurized milk stored at  $2^{\circ}\text{C}$  for 28 days, *E. coli* O157:H7 decreased c.a.  $1.6\text{--}2.0 \log \text{CFU/g}$  (Wang *et al.* 1997). *L. monocytogenes* showed a different behavior in butter during storage at  $4^{\circ}\text{C}$ , as Olsen *et al.* (1988) found that this pathogen increased from an initial population of 3.5 to  $6.0 \log \text{CFU/g}$ , after 6–8 weeks storage at this temperature. However, it is known that *L. monocytogenes* can grow at refrigeration temperatures (Rosenow and Marth 1987, Papageorgiou and Marth 1989, Papageorgiou *et al.* 1996).

Different pH values were reported for the inhibition of growth of *E. coli* O157:H7. At pH values less than 5.5, no growth of *E. coli* O157:H7 in synthetic culture media (Buchanan and Klawitter 1992, Conner and Controla 1995) or skim milk (Guraya *et al.* 1998) was observed. Hudson *et al.* (1997) found that in White brined cheese, Romano, and Colby cheeses with pH values less than 5.2, *E. coli* O157:H7 was decreased by c.a.  $3.0 \log$  after 27, 30 and 27 days in the three cheeses, respectively. According to our results, the pH of all examined types of butter was lower than 5.2 with a low decrease (from 0.06 to 0.10) by the end of storage at  $4^{\circ}\text{C}$ . It is known that *E. coli* O157:H7 can survive for a long time in acidic environments at refrigeration temperatures, as shown by studies in foods with low pH, such as apple cider (Miller and Kaspar 1994, Tortorello *et al.* 1998), mayonnaise (Weagant *et al.* 1994, Erickson *et al.* 1995), yogurt (Massa *et al.* 1994, Dinneen *et al.* 1998), sour milk (Chang *et al.* 2000) and sausages (Clavero and Buchat 1996, Calicioglou *et al.* 1997).

It is known that during production of butter, milk components found in water phase, as well as microorganisms can be entrapped in the water phase, which is kept and distributed in the fat phase of butter (Olsen *et al.* 1988). The sodium chloride is also dissolved in the water phase resulting in the increase of its final concentration that is faced by bacteria. Thus, in the present study the salt



ή άπαχο γάλα (Guraya *et al.* 1998) σταμάτησε. Οι Hudson και συν. (1997) παρατήρησαν ότι η *E. coli* O157:H7 σε pH κάτω του 5,2 μειώθηκε κατά 3,0 log, σε σχέση με τους αρχικούς πληθυσμούς που προστέθηκαν στο γάλα, έπειτα από 27, 30 και 27 μέρες για λευκό τυρί άλμης, τυρί Romano και τυρί Colby, αντίστοιχα. Όπως έδειξαν τα αποτελέσματα μας, το pH όλων των εξετασθέντων τύπων του βουτύρου ήταν μικρότερο του 5,2 με πτώση από 0,06 μέχρι 0,1 στο τέλος της συντήρησης στους 4°C. Όμως, είναι γνωστό ότι η *E. coli* O157:H7 μπορεί και επιβιώνει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε όξινο περιβάλλον και σε θερμοκρασίες ψύξης, καθώς αυτό έδειξαν μελέτες σε τρόφιμα με χαμηλό pH, όπως ο χυμός μήλου (Miller and Kaspar 1994, Tortorello *et al.* 1998), η μαγιονέζα (Weagant *et al.* 1994, Erickson *et al.* 1995), το γιουόρτσι (Massa *et al.* 1994, Dinneen *et al.* 1998), το ζυμώμενο οξύγαλα (Chang *et al.* 2000) και τα αλλαντικά αέρος (Clavero and Buchat 1996, Calicioglou *et al.* 1997).

Είναι γνωστό ότι στη διάρκεια της παρασκευής του βουτύρου, συστατικά του γάλακτος που βρίσκονται στην υδάτινη φάση, καθώς και μικροοργανισμοί μπορεί να περιχλείονται στην υδάτινη φάση που παραμένει και κατανέμεται στη λιπαρή φάση του βουτύρου (Olsen *et al.* 1988). Το χλωριούχο νάτριο επίσης διαλύεται στην υδάτινη φάση με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πραγματική συγκέντρωση που αντιμετωπίζουν τα βακτήρια. Έτσι στην παρούσα μελέτη οι συγκεντρώσεις του αλατιού στην υδάτινη φάση υπολογίστηκε ότι ήταν 3,02% και 6,32% για τους τύπους του βουτύρου με ποσοστό αλατιού 0,46% και 0,93% αντίστοιχα. Είναι όμως γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι η *E. coli* O157:H7 παρουσιάζει μεγάλη αντοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (Glass *et al.* 1992, Ryu *et al.* 1999, Ingham *et al.* 2000). Ο Glass και συν. (1992) βρήκαν ότι το παθογόνο αυτό μπορούσε να ανυψωθεί σε ζωμό (TSB) με περιεκτικότητα σε NaCl < 6,5%. Η συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου στην υδάτινη φάση 6,32% του τύπου του βουτύρου με αλάτι 0,93% είναι κοντά στην αποτρεπτική αυτή τιμή του αλατιού (6,5%). Επομένως, το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει και τη διαφορετική συμπεριφορά της *E. coli* O157:H7 στον τύπο του βουτύρου με ποσοστό αλατιού 0,93% που παρουσίασε σημαντικά μικρότερους πληθυσμούς ( $P < 0,01$ ) σε σχέση με τους άλλους τύπους βουτύρου καθώς επίσης ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ( $P > 0,01$ ) μεταξύ βουτύρου χωρίς αλάτι και βουτύρου με ποσοστό αλατιού 0,46% στο μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, και για τους δύο πληθυσμούς επιμόλυνσης με μικρό και μεγάλο ενοφθάλμισμα στη δέμηνη συντήρηση στους 4°C.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που δεσμεύτηκαν στην υδάτινη φάση του βουτύρου θα μπορούσαν να είχαν αρνητική επίδραση στην επιβίωση της *E. coli* O157:H7, αλλά προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η ανταγωνιστική δράση (οργανικά οξέα, βακτηριοσίνες κ.ά.) των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο παθογόνο αυτό είναι μικρή (Farrag *et al.* 1992, Clavero and Beuchat 1996, Duffy *et al.* 1999). Δυσμενής επίδραση στην επιβίωση της *E. coli* O157:H7 θα

content in the water phase was estimated to be 3.02% and 6.32% for the 0.46% and 0.93% salted types of butter, respectively. It is also known from previous studies that *E. coli* O157:H7 shows resistance in high concentrations of sodium chloride (Glass *et al.* 1992, Ryu *et al.* 1999, Ingham *et al.* 2000). Glass *et al.* (1992) found that this pathogen could grow in broth (TSB) with a content of NaCl  $\leq$  6.5%. Thus in the type of butter with 0.93% (6.32% in water phase) NaCl, the concentration could be considered inhibitory for the growth of *E. coli*. This could explain the different behavior of *E. coli* O157:H7 in the butter type with 0.93% salt, which showed significantly lower populations ( $P < 0.01$ ) than those counted in the other types of butter. There were also significant differences ( $P < 0.01$ ) between unsalted butter and butter with 0.46% salt during most of the storage time, for both low and high inoculum of the pathogen during the two months storage at 4°C.

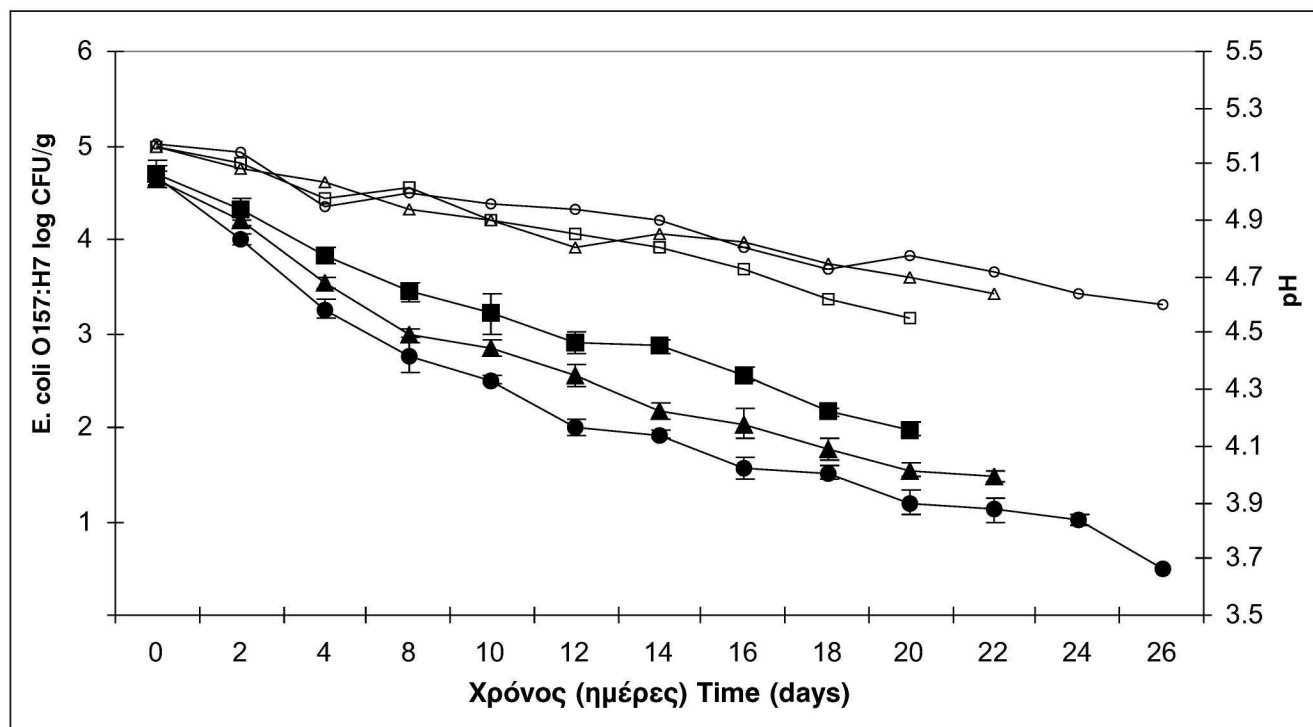
The lactic acid bacteria which were entrapped in the water phase of butter could act against survival of *E. coli* O157:H7, but previous studies showed that the antagonistic action (organic acids, bacteriocins etc) of lactic acid bacteria to the pathogen is low (Farrag *et al.* 1992, Clavero and Beuchat 1996, Duffy *et al.* 1999). A negative affect in the survival of *E. coli* O157:H7 could have the diacetyl (Davidson and Hoover 1993, Kang and Fung 1999), which is produced in fermented butter from *Lactococcus lactis* susp *diacetilactis* (like the one used in the present test) (Mantis 2000).

The results of this work showed that *E. coli* O157:H7 survived during the two months of storage at 4°C in unsalted and in salted (0.46% or 0.93%) butter, for both contamination tests with low or high inoculum of the pathogen.

#### Storage of butter at 12°C

The behavior of *E. coli* O157:H7 in tests with the high inoculum ( $4.67 \pm 0.10$  log CFU/g) of the pathogen in butter, during storage at 12°C, is shown in Figure 3. The tests lasted up to the appearance of signs of spoilage (change of color to brown yellow, rancid smell etc) which happened at the 20th, 22nd and 26th day for the unsalted, the 0.46% and the 0.93% salted butter, respectively. During storage times, the populations of *E. coli* O157:H7 were decreased by an average of 2.71 and 3.17 log CFU/g for the unsalted and the 0.46% salted type of butter, respectively. For the 0.93% salted type of butter, the populations of *E. coli* O157:H7 were counted by direct plating on SMAC up to the 24th day, while afterwards they were detected only after enrichment in broth and plating on SMAC up to the 26th day. The data of figure 3 show that the decrease in populations of *E. coli* O157:H7 was higher at the beginning of storage at 12°C and up to the 12-14 days for all the butter types, while later on and up to the end of storage the rate of decrease was lower than this of the beginning of storage. Throughout the storage at 12°C, all *E. coli* O157:H7 populations in the 0.93% salted type of butter





**Σχήμα 3.** Μεταβολές του πληθυσμού της *E. coli* O157:H7 ■▲● και του pH □△○ κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 12°C του βουτύρου: α) ■□ χωρίς αλάτι, β) ▲△ με αλάτι 0,42% και γ) ●○ με αλάτι 0,93%. Πειραματισμοί με μεγάλο αρχικό πληθυσμό του παθογόνου ( $4,67 \pm 0,10 \log \text{CFU/g}$ ). Τιμές μικρότερες των 1 log CFU/g καταγράφηκαν με την μέθοδο του εμπλουτισμού και σημειώνονται ως θετικές.

**Figure 3.** Changes in populations of *E. coli* O157:H7 ■▲● and pH □△○ during storage of butter at 12°C: a) ■□ unsalted, b) ▲△ with 0.42% salt and c) ●○ with 0.93% salt. Tests with high inoculum of the pathogen ( $4,67 \pm 0,10 \log \text{CFU/g}$ ). Values lower than 1 log CFU/g were recorded by using the enrichment method and marked as positive.

μπορούσε να έχει και το διακετύλιο (Davidson and Hoover 1993, Kang and Fung 1999) που παράγεται στο βούτυρο βιολογικής ωρίμασης από το *Lactococcus lactis* susp. *diacetylactis* (όπως αυτό που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα) (Mantis 2000).

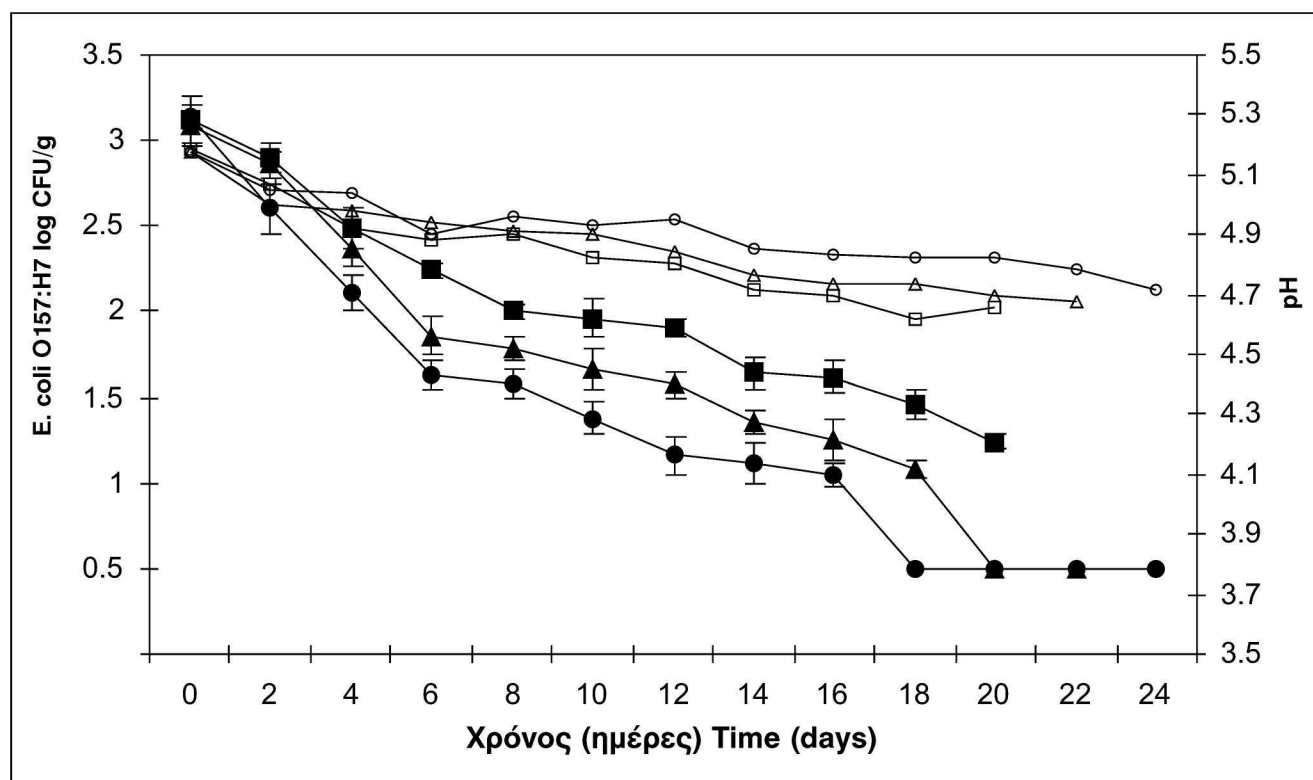
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η *E. coli* O157:H7 επιβίωσε σ' όλη τη διάρκεια της δέμηνης συντήρησης στους 4°C, στο βούτυρο, χωρίς αλάτι και με 0,46% ή 0,93% ποσοστό αλατιού, σε όλους τους πειραματισμούς και με μικρό ή μεγάλο ενοφθάλμισμα του παθογόνου.

#### Συντήρηση του βουτύρου στους 12°C

Η συμπεριφορά της *E. coli* O157:H7 σε δείγματα βουτύρου με μεγάλο πληθυσμό ( $4,67 \pm 0,10 \log \text{CFU/g}$ ) κατά τη διάρκεια της παραμονής τους στους 12°C, φαίνεται στο Σχήμα 3. Οι πειραματισμοί διήρκεσαν μέχρι την εμφάνιση σημείων αλλοίωσης (αλλαγή χρώματος συνήθως προς το σκούρο κίτρινο, οσμή τάγγισης κλπ) και έφθασαν τις 20, 22 και 26 ημέρες για τους τύπους του βουτύρου χωρίς αλάτι, με ποσοστό αλατιού 0,46% και 0,93%, αντίστοιχα. Στα ανωτέρω αντίστοιχα χρονικά διαστήματα των πειραματισμών, η μείωση των πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 ήταν κατά μέσον όρο 2,71 και 3,17 log CFU/g για τους τύπους του βουτύρου χωρίς αλάτι και με ποσοστό αλατιού

were significantly lower ( $P < 0.01$ ) than those counted in the 0.46% salted type of butter. Also the populations of the pathogen in the 0.46% salted type of butter were significantly lower ( $P < 0.01$ ) than those counted in the unsalted butter, except for the 2nd day, where there was no significant difference ( $P > 0.01$ ) between them. The pH of all examined butter types decreased throughout the storage at 12°C, from an initial value of 5.16 to final values of 4.55, 4.64, and 4.60 in the unsalted butter, the butter with 0.46% and 0.93% salt, respectively.

The behavior of *E. coli* O157:H7 in tests with the low inoculum ( $3,11 \pm 0,11 \log \text{CFU/g}$ ) of the pathogen in butter, during storage at 12°C, is shown in Figure 4. As in tests with the high inoculum of *E. coli* O157:H7, the tests lasted up to the appearance of signs of spoilage and reached the 20th, 22nd and 24th days for butter types of unsalted and with 0.46% and 0.93% salt, respectively. The populations of *E. coli* O157:H7 were decreased by an average of 1.88 log CFU/g for the unsalted butter type up to the end of storage at 12°C (20th day). For the 0.46% salted type of butter, the populations of *E. coli* O157:H7 were counted by direct plating on SMAC up to the 18th day. After that day and up to the 22nd day, identification was done after



**Σχήμα 4.** Μεταβολές του πληθυσμού της *E. coli* O157:H7 ■▲● και του pH □△○ κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 12°C του βουτύρου: α) ■□ χωρίς αλάτι, β) ▲△ με αλάτι 0,42% και γ) ●○ με αλάτι 0,93%. Πειραματισμοί με μικρό αρχικό πληθυσμό του παθογόνου ( $3,11 \pm 0,11$  log CFU/g). Τιμές μικρότερες των 1 log CFU/g καταγράφηκαν με την μέθοδο του εμπλουτισμού και σημειώνονται ως θετικές.

**Figure 4.** Changes in populations of *E. coli* O157:H7 ■▲● and pH □△○ during storage of butter at 12°C: a) ■□ unsalted, b) ▲△ with 0,42% salt and c) ●○ with 0.93% salt. Tests with low inoculum of the pathogen ( $3,11 \pm 0,11$  log CFU/g). Values lower than 1 log CFU/g were recorded by using the enrichment method and marked as positive.

0,46%, αντίστοιχα. Για τον τύπο του βουτύρου με ποσοστό αλατιού 0,93%, οι πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 αριθμούνταν με απευθείας ενοφθαλμισμό μέχρι την 24η ημέρα και ήταν ανιχνεύσιμοι μόνο μετά από εμπλουτισμό σε τροποποιημένο ζωμό *E. coli* (CM 990 Oxoid) και ακόλουθο ενοφθαλμισμό σε υπόστρωμα SMAC μέχρι την 26η ημέρα. Στο Σχήμα 3 φαίνεται ότι η πτώση των πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 ήταν μεγαλύτερη στην αρχική διάρκεια της συντήρησης στους 12°C μέχρι τις 12-14 ημέρες για όλους τους τύπους του βουτύρου, ενώ μετέπειτα και μέχρι το τέλος της συντήρησης ο ρυθμός της πτώσης ήταν μικρότερος σε σχέση με εκείνη της αρχικής συντήρησης. Σ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 12°C, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 στο βούτυρο με ποσοστό αλατιού 0,93% ήταν σημαντικά μικρότεροι ( $P < 0,01$ ) των αντίστοιχων πληθυσμών που μετρήθηκαν στους τύπους βουτύρου χωρίς αλάτι και με αλάτι 0,46%. Οι πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 στο βούτυρο με ποσοστό αλατιού 0,46% σε σχέση με τους πληθυσμούς που μετρήθηκαν στο βούτυρο χωρίς αλάτι ήταν σημαντικά μικρότεροι ( $P < 0,01$ ), εκτός από τη 2η ημέρα που δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ( $P > 0,01$ ) μεταξύ τους. Το pH των τύπων βουτύρου που εξετάστηκαν πα-

enrichment in *E. coli* modified broth (CM 990, Oxoid) and plating on SMAC. For the 0.93% salted type of butter, counting of *E. coli* O157:H7 was possible by direct plating on SMAC up to the 16th day. After that day detection was possible only after enrichment and following plating on SMAC up to the 24th day. The data of figure 4 show that the rate of decrease of the populations of *E. coli* O157:H7 was higher at the beginning of storage at 12°C and up to the 6-8 day for all types of butter, while later on and up to the end of storage period the rate of decrease was lower than that of the beginning of storage. Throughout the storage at 12°C, all *E. coli* O157:H7 populations in the 0.93% salted type of butter were significantly lower ( $P < 0,01$ ) than those counted in the 0.46% salted type of butter. Also the populations of *E. coli* O157:H7 in the 0.46% salted type of butter were significantly lower ( $P < 0,01$ ) than those counted in the unsalted butter, except for the 2nd and 4th days where there was no significant difference ( $P > 0,01$ ) between them. The pH of all examined butter types decreased throughout the storage at 12°C, from an initial value of 5.18 to final values of 4.66, 4.68, and 4.72 in the unsalted butter, the butter with 0.46% and 0.93% salt, respectively.



ρουσίαζε πτώση σ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 12°C και στο τέλος των χρονικών διαστημάτων που προαναφέρθηκαν ότι διήρκεσαν οι πειραματισμοί μειώθηκε από μία αρχική τιμή 5,16, στις τιμές 4,55, 4,64 και 4,60 στο βούτυρο χωρίς αλάτι, και στο βούτυρο με αλάτι σε ποσοστό 0,46% και 0,93%, αντίστοιχα.

Η συμπεριφορά της *E. coli* O157:H7 στα δείγματα βουτύρου με μικρό πληθυσμό ( $3,11 \pm 0,11$  log CFU/g) κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους στους 12°C, φαίνεται στο Σχήμα 4. Όπως και στους πειραματισμούς με μεγάλο πληθυσμό της *E. coli* O157:H7, οι πειραματισμοί με μικρό πληθυσμό του παθογόνου διήρκεσαν μέχρι την εμφάνιση σημείων αλλοίωσης και έφθασαν τις 20, 22 και 24 ημέρες για τους τύπους του βουτύρου χωρίς αλάτι, με ποσοστό αλατιού 0,46% και 0,93%, αντίστοιχα. Η μείωση των πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 ήταν κατά μέσον όρο 1,88 log CFU/g για τον τύπο του βουτύρου χωρίς αλάτι στο τέλος της συντήρησης στους 12°C, την 20η ημέρα. Για τον τύπο του βουτύρου με ποσοστό αλατιού 0,46%, οι πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 αριθμούνταν με απευθείας ενοφθαλμισμό μέχρι τη 18η ημέρα και ήταν ανιχνεύσιμοι μόνο μετά από εμπλουτισμό και ακόλουθο ενοφθαλμισμό σε υπόστρωμα SMAC την 20η και 22η ημέρα. Για τον τύπο του βουτύρου με ποσοστό αλατιού 0,93%, οι πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 αριθμούνταν με απευθείας ενοφθαλμισμό μέχρι τη 16η ημέρα και ήταν ανιχνεύσιμοι μόνο μετά από εμπλουτισμό σε τροποποιημένο ζωμό *E. coli* (CM 990 Oxoid) και ακόλουθο ενοφθαλμισμό σε υπόστρωμα SMAC από τη 18η μέχρι και την 24η ημέρα. Στο Σχήμα 4 φαίνεται ότι η μείωση των πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 ήταν μεγαλύτερη στην αρχική διάρκεια της συντήρησης στους 12°C μέχρι τις 6-8 ημέρες για όλους τους τύπους του βουτύρου, ενώ μετέπειτα και μέχρι το τέλος της συντήρησης ο ρυθμός της πτώσης ήταν μικρότερος σε σχέση με εκείνη της αρχικής συντήρησης. Σ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 12°C, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 στο βούτυρο με ποσοστό αλατιού 0,93% ήταν σημαντικά μικρότεροι ( $P < 0,01$ ) των αντίστοιχων πληθυσμών που μετρήθηκαν στο βούτυρο χωρίς αλάτι και με αλάτι 0,46%. Οι πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 στο βούτυρο με ποσοστό αλατιού 0,46% σε σχέση με τους πληθυσμούς που μετρήθηκαν στο βούτυρο χωρίς αλάτι ήταν σημαντικά μικρότεροι ( $P < 0,01$ ), εκτός από την 2η και την 4η ημέρα που δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ( $P > 0,01$ ) μεταξύ τους. Το pH των τύπων βουτύρου που εξετάστηκαν παρουσίαζε πτώση σ' όλη την διάρκεια της συντήρησης στους 12°C και στο τέλος των χρονικών διαστημάτων που προαναφέρθηκε ότι διήρκεσαν οι πειραματισμοί, μειώθηκε από μία αρχική τιμή 5,18, στις τιμές 4,66, 4,68 και 4,72 στο βούτυρο χωρίς αλάτι, και στο βούτυρο με αλάτι σε ποσοστό 0,46% και 0,93%, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μείωση των πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 στους τύπους του βουτύρου που εξετάστηκαν, είτε με μεγάλο ( $4,67 \pm 0,10$  -  $4,88 \pm 0,15$  log CFU/g) είτε με μικρό ( $3,11 \pm 0,11$  -  $3,13 \pm 0,14$  log CFU/g) αρχικό πληθυσμό του παθογόνου, ήταν μεγαλύτερη κατά

The results showed that the decrease in the populations of *E. coli* O157:H7 in all examined butter types, either with high ( $4,67 \pm 0,10$  -  $4,88 \pm 0,15$  log CFU/g) or with low ( $3,11 \pm 0,11$  -  $3,13 \pm 0,14$  log CFU/g) initial inoculum, was higher during storage at 12°C than that during storage at 4°C. This may be due to the lower pH value in all butter types as a result of the higher storage temperature. As it was mentioned the pH of all examined butter types by the end of storage at 12°C ranged between 4.55 and 4.72, while by the end of storage at 4°C the pH values in all butter types ranged between 5.06 and 5.14. Mantis (1967) also found that the acidity of butter increased, when the butter was not stored at refrigeration temperatures. Higher than refrigeration temperatures combined with low pH, have an inhibitory effect on survival of *E. coli* O157:H7, as was observed by other investigators in various products, such as mayonnaise (Weagant *et al.* 1994, Erickson *et al.* 1995), apple cider (Miller and Kaspar 1994), soya sauce (Masuda *et al.* 1998), cheese brines (Ingham *et al.* 2000), and Feta cheese (Govaris *et al.* 2002). The same effect was recorded for *Listeria monocytogenes* in salted whey and salted skim milk (Papageorgiou and Marth 1989).

The results showed that the decrease in all *E. coli* O157:H7 populations was higher in butter with 0.93% salt than in the 0.46% salted type of butter, independently of either low or high populations were inoculated. Also the decrease in all *E. coli* O157:H7 populations was higher in butter with 0.46% salt than in the unsalted butter. The salt content in the water phase, as was previously mentioned, was 3.02% and 6.32% for the 0.46% and 0.93% salted types of butter, respectively. The effect of salt content in water phase was important for the survival of the pathogen during storage at 4°C and 12°C. However, the differences in decrease in populations of *E. coli* O157:H7 were higher at 12°C than this at 4°C and proportional with the salt content. These differences in decrease in populations of *E. coli* O157:H7 may be due to the fact that ionization of sodium chloride increases with increase of temperature and thus the salt harmful action to the pathogen is increased (Glass *et al.* 1992, Ryu *et al.* 1999). Ο' Toole (1978) reported that the decrease in total mesophilic count, in 1.6-1.8% salted butter was greater at 10°C than at 4°C. A higher decrease in populations of *L. monocytogenes* was also observed in salted whey and salted skim milk with 12% NaCl at 22°C than that at 4°C (Papageorgiou and Marth 1989). In the present study the inhibitory effect of salt in the growth of bacteria is also revealed from the fact that the spoilage was appeared later in butter types with the higher salt content than those with the lower salt content and the unsalted butter.

The decrease in populations of *E. coli* O157:H7 in the examined butter types during storage at 4°C for 2 months or at 12°C, was similar in both contamination tests with high or low population of the pathogen. These findings are consistent with reports of other investigators who found that the behavior of *E. coli* O157:H7 was the same with



τη συντήρηση στους 12°C από τη μείωση των πληθυσμών στους αντίστοιχους τύπους του βουτύρου κατά τη συντήρηση στους 4°C. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την υψηλότερη θερμοκρασία συντήρησης (12°C) και τις χαμηλότερες τιμές pH όλων των τύπων του βουτύρου σε σχέση με τις τιμές του pH που καταγράφηκαν κατά τη συντήρηση στους 4°C. Το pH όλων των δειγμάτων των εξετασθέντων τύπων βουτύρου στο τέλος των πειραματισμών στους 12°C κυμάνθηκε μεταξύ 4,55 και 4,72, ενώ στο τέλος των πειραματισμών στους 4°C το pH κυμάνθηκε μεταξύ 5,06 και 5,14. Ο Μάντης (1967) επίσης βρήκε ότι η οξύτητα του βουτύρου αυξήθηκε, όταν το βούτυρο δεν συντηρούνταν σε θερμοκρασίες ψύξης. Είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι οι υψηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με τις θερμοκρασίες ψύξης σε συνδυασμό με χαμηλές τιμές pH, έχουν βλαπτική επίδραση στην επιβίωση της *E. coli* O157:H7 όπως έχει παρατηρηθεί από άλλους ερευνητές σε διάφορα προϊόντα, όπως στη μαγιονέζα (Weagant *et al.* 1994, Erickson *et al.* 1995), το χυμό μήλου (Miller and Kaspar 1994), τη σάλτσα σόγιας (Masuda *et al.* 1998) τις άλμες σκληρών τυριών (Ingham *et al.* 2000) και τη φέτα (Govaris *et al.* 2002), γεγονός που παρατηρήθηκε και στην επιβίωση της *L. monocytogenes* σε αλατισμένο τυρόγαλα και αλατισμένο αποβουτυρωμένο γάλα (Papageorgiou and Marth 1989).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μείωση των πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 στους εξετασθέντες τύπους βουτύρου, είτε με μεγάλο είτε με μικρό αρχικό πληθυσμό του παθογόνου, ήταν μεγαλύτερη στον τύπο του βουτύρου με ποσοστό αλατιού 0,93%, έπειτα στον τύπο με ποσοστό αλατιού 0,46% και τελευταία στον τύπο του βουτύρου χωρίς αλάτι. Οι συγκεντρώσεις του αλατιού στην υδάτινη φάση, όπως ήδη αναφέρθηκε, ήταν 3,02% και 6,32% για τους τύπους του βουτύρου με ποσοστό αλατιού 0,46% και 0,93%, αντίστοιχα. Η επίδραση της συγκέντρωσης του αλατιού στην υδάτινη φάση ήταν σημαντική στην επιβίωση του παθογόνου κατά τη συντήρηση του βουτύρου στους 4°C και στους 12°C. Οι διαφορές όμως στη μείωση των πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 ήταν μεγαλύτερες στη συντήρηση στους 12°C σε σχέση με τη συντήρηση στους 4°C και ανάλογες με τη συγκέντρωση του αλατιού. Οι διαφορές αυτές στη μείωση των πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 θα μπορούσαν να εξηγηθούν με το γεγονός ότι η διάσπαση των ιόντων του χλωριούχου νατρίου αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας και επομένως αυξάνεται και η βλαπτική δράση στο παθογόνο βακτήριο (Glass *et al.* 1992, Ryu *et al.* 1999). Ο O'Toole (1978) ανέφερε ότι η ολική μεσόφιλη χλωρίδα σε αλατισμένο βούτυρο με αλάτι 1,6–1,8%, μειωνόταν περισσότερο σε θερμοκρασία 10°C και λιγότερο σε θερμοκρασία 4°C. Επίσης σημαντικά μεγαλύτερη μείωση των πληθυσμών της *L. monocytogenes* σε αλατισμένο τυρόγαλα και αλατισμένο αποβουτυρωμένο γάλα με 12% NaCl, παρατηρήθηκε στους 22°C σε σχέση με την επιβίωση του παθογόνου στα ίδια αλατισμένα προϊόντα στους 4°C (Papageorgiou and Marth 1989). Στην παρούσα μελέτη η ανασταλτική επίδραση του αλατιού

either low or high initial population of the pathogen for foods such as mayonnaise with inoculum of 10<sup>6</sup> or 10<sup>4</sup> CFU/ml (Raghubeer *et al.* 1995) and Cheddar cheese stored at 4°C with inoculum of 10<sup>3</sup> or 1 CFU/ml of milk, and for milk (Reitsma and Henning 1996) with inoculum of 10<sup>5</sup> or 10<sup>3</sup> CFU/ml during storage at 5, 8, 15 και 22°C (Wang *et al.* 1997).

Visible signs of spoilage were not observed in both storage temperatures, whether high or low inoculum of *E. coli* O157:H7 were used. By the end of storage period at 12°C, the populations of *E. coli* O157:H7 were low, (less than 10 CFU/g) particularly for the salted types of butter. Detection of the pathogen was possible only after enrichment, but this does not reduce the health risk for the consumers. It has been reported that the infection dose of *E. coli* O157:H7 is very low ranging between 5-50 CFU/g (Kuntz and Kuntz 1999). This means that the salted butter types by the end of the storage period at 12°C even when low numbers of *E. coli* O157:H7 were detected were a possible health hazard.

In order to avoid contamination of butter with *E. coli* O157:H7 the dairy industry should apply Good Manufacturing Practices (GMP) and Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) programs.

#### Acknowledgments

We thank Professor Konstantinos Genigeorgis for his kind offer of *E. coli* O157:H7 strains used in the present study. □

#### BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

1. Betts CD. Controlling *E. coli* O157:H7. *Nutrit. & Food Sci.* 2000, 30:183-186.
2. Bradley RL, Arnold J E, Barbano JDM, Semerad RG, Smith DE, Vines BK. Chemical and physical methods, Ch15. In: Standard methods for the examination of dairy products. (ed. Marshal, RT), 16th ed. American Public Health Association, Washington, DC., USA., 1992: 433-531.
3. Buchanan RL, Klawitter LA. The effect of incubation temperature, initial pH and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 1992,9:185-196.
4. Calicioglou M, Faith NG, Buege DR, Luchansky JB. Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented semidry low-temperature cooked beef summer sausage. *J. Food Prot.* 1997, 60:1158-1162.
5. Centers for disease control (CDC). Presumed staphylococcal food poisoning associated with whipped butter. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 1977, 26:155-156.
6. Centers for disease control (CDC). Staphylococcal food poisoning traced to butter – Alabama. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 1970, 19:271.
7. Chang J, Chou C, Li C. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation and storage of diluted cultured milk drink. *Food Microbiol.* 2000,17:579-587.
8. Clavero MRS, Beuchat LR. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity, and temperature and suitability of media for its recovery. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62: 2735-2740.



στην ανάπτυξη των μικροβίων φαίνεται και από το γεγονός ότι η αλλοίωση εμφανίσθηκε αργότερα στους τύπους του βουτύρου με περισσότερο αλάτι από εκείνους με το λιγότερο αλάτι και χωρίς αλάτι.

Η μείωση των πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 στους εξετασθέντες τύπους βουτύρου τόσο στη θερμοκρασία ψύξης στους 4 °C για 2 μήνες, όσο και στην παραμονή στους 12 °C ήταν παρόμοια στους πειραματισμούς με μικρό και μεγάλο ενοφθάλμισμα. Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν με εκείνες άλλων ερευνητών που παρατήρησαν την ίδια συμπεριφορά της *E. coli* O157:H7 με μεγάλο και μικρό ενοφθάλμισμα σε άλλα τρόφιμα που συντηρούνταν σε θερμοκρασία 4 °C όπως μαγιονέζα με ενοφθάλμισμα 10<sup>6</sup> ή 10<sup>4</sup> CFU/ml (Raghubeer *et al.* 1995), τυρί Cheddar με ενοφθάλμισμα 10<sup>3</sup> ή 1 CFU/ml γάλακτος (Reitsma and Henning 1996) και γάλα σε θερμοκρασίες 5, 8, 15 και 22 °C και ενοφθάλμισμα 10<sup>5</sup> ή 10<sup>3</sup> CFU/ml (Wang *et al.* 1997).

Όπως και στη συντήρηση στους 4 °C, κανένα από τα εξετασθέντα δείγματα όλων των τύπων του βουτύρου δεν έδειξε εμφανή σημεία αλλοίωσης κατά τη διάρκεια της παραμονής τους στους 12 °C, είτε είχαν ενοφθαλμιστεί μεγάλοι είτε μικροί πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7. Προς το τέλος της συντήρησης στους 12 °C οι πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 μπορεί να ήταν μικροί (10 CFU/g), ιδιαίτερα για τους αλατισμένους τύπους του βουτύρου εφ' όσον ανιχνεύονταν η ύπαρξη του παθογόνου μετά από εμπλουτισμό, αλλά αυτό δεν σημαίνει μείωση του κινδύνου για τον καταναλωτή. Έχει αναφερθεί ότι η μολύνουσα δόση της *E. coli* O157:H7 είναι πολύ μικρή και κυμαίνεται μεταξύ 5–50 CFU/g (Kuntz and Kuntz 1999), γεγονός που σημαίνει ότι και οι αλατισμένοι τύποι του βουτύρου προς το τέλος της παραμονής τους στους 12 °C και παρά τους μικρούς πληθυσμούς της *E. coli* O157:H7 που ανιχνεύονταν, μπορεί να ήταν επικίνδυνοι για την υγεία του καταναλωτή.

Για να αποφευχθεί η επιμόλυνση του βουτύρου με την *E. coli* O157:H7 πρέπει να εφαρμόζονται στις γαλακτοβιομηχανίες μέτρα ορθής παραγωγικής διαδικασίας (Good Manufacturing Practice) και προγράμματα ανάλυσης κινδύνων στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (HACCP).

### Ευχαριστίες

Τις θερμές μας ευχαριστίες στον καθηγητή Κωνσταντίνo Γενηγεώργη για τα στελέχη της *Escherichia coli* O157:H7 που μας έδωσε για την έρευνα αυτή. □

9. Conner DE, Kotrola JS. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Appl. Env. Microbiol.* 1995, 61:382-385.
10. Davidson PM, Hoover DG. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In lactic acid bacteria pp 127-159 (Eds S. Salminen and A. von Wright). Marcel Dekker, Inc. (1993).
11. Dinneen SS, Takeuchi K, Soudah JE, Boor K J. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy fermentation systems. *J. Food Prot.* 1998, 61: 1602-1608.
12. Doyle MP, Schoeni JL. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987,53:2394-2396.
13. Duffy G, Whiting RC, Sheridan JJ. The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 1999, 16: 299-307.
14. Erickson JP, Stamer JW, Hayes M, McKenna DN, Van Alstine LA. An assessment of *Escherichia coli* O157:H7 contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs in environmental sources, and behavior in low-pH dressings. *J. Food Prot.* 1995,58:1059-1064.
15. Farrag SA, El-Gazzar FE, Marth EH. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 or *Yersinia enterocolitica* at 4 or 7 °C in raw milk inoculated with a commercial culture of lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* 1992,47:149-151.
16. Glass KA, Loeffelholz JM, Ford PJ, Doyle MP. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or Sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 58: 2513-2516.
17. Govaris, A, Koidis P, Papatheodorou K. The fate of *Escherichia coli* O157:H7 in Myzithra, Anthotyros, and Manouri whey cheeses during storage at 2 °C and 12 °C. *Food Microbiol.* 2001, 18:565-570.
18. Govaris, A, Koidis P, Papatheodorou K. The survival of *Escherichia coli* in Feta cheese during storage. *Bul. Hellenic Vet. Med. Society* 2002, 53:24-32.
19. Guraya R, Frank JF, Hassan AN. Effectiveness of salt, pH, and diacetyl as inhibitors for *Escherichia coli* O157:H7 in dairy foods stored at refrigeration temperatures. *J. Food Prot.* 1998, 61:1098-1102.
20. Hudson LM, Chen J, Hill AR, Griffiths MW. Bioluminescence: A rapid indicator of *Escherichia coli* O157:H7 in selected yogurt and cheese varieties. *J. Food Prot.* 1997, 60:891-897.
21. Ingham SC, Su Y, Spangenberg DS. Survival of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese brines. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 63:73-79.
22. International Dairy Federation (FIL-IDF). Milk and milk products, guidance on sampling. IDF Standard 50C: 1995.
23. Kang DH, Fung DYC. Effect of diacetyl on controlling *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation. *J. Food Prot.* 1999, 62: 975-979.
24. Karmali MA. Infection by verocytotoxin – producing *Escherichia coli*. *Clinical and Microbiological Review* 1989,2: 15-38.
25. Kasrazadeh M, Genigeorgis C. Potential growth and control of *Escherichia coli* O157:H7 in soft hispanic type cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 1995, 25:289-300.
26. Kuntz TB, Kuntz ST. Enterohemorrhagic *E. coli* infection. *Prim Care Update Ob/Gyns* 1999, 6: 192-196.
27. Lytikainen O, Autio T, Majjala R, Ruutu P, Honkanen – Buzalski T, Miettinen M, Hatakka M, Mikkola J, Anttila V, Johansson T, Rantala L, Aalto T, Korkeala H, Siitonen A. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *J. Infect. Diseases* 2000, 181: 1838-1841.
28. Mantis A. Hygiene and Technology of milk and milk products. (Eds Kirakidis Bros). Thessaloniki. (2000).
29. Mantis A. Research on the hygienic conditions of fresh butter in



- Greece, PhD thesis, Laboratory of Foods Hygiene of Animal Origin, School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki. (1967).
30. Massa S, Altieri C, Quaranta V, DePace R. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yogurt during preparation and storage at 4 °C. *L. Applied Microbiol.* 1997, 24:347-350.
  31. Masuda S, Hara-Kudo Y, Kumagai S. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in soy sauce a fermented seasoning. *J. Food Prot.* 1998, 61: 657-661.
  32. Miller LG, Kaspar CW. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *J. Food Prot.* 1994, 57: 460-464.
  33. Morgan D, Newman CP, Hutchinson DN, Walker AM, Rowe B, Majid F. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with the consumption of yogurt. *Epidemiol. Infect* 1993, 111:181-187.
  34. O' Toole DK. Effect of storage temperature on microbial growth in continuously made butter. *Australian J. Dairy Technol.* 1978, 33:85-88.
  35. Olsen JA, Yousef AE, Marth EH. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* during making and storage of butter. *Milchwissenschaft* 1988, 43:487-489.
  36. Papageorgiou DK, Bori M, Mantis A. Growth of *Listeria monocytogenes* in the whey cheeses Myzithra, Anthotyros, and Manouri during storage at 5, 12 and 22 °C. *J. Food Prot.* 1996, 59: 1193-1199.
  37. Papageorgiou DK, Marth EH. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 4 and 22 °C in whey and skim milk containing 6 or 12% Sodium chloride. *J. Food Prot.* 1989, 52:625-630.
  38. Raghubeer ER, Ke JS, Campbell ML, Meyer RS. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and other coliforms in commercial mayonnaise and refrigerated salad dressing. *J. Food Prot.* 1995, 58: 13-18.
  39. Reitsma CJ, Henning DR. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of cheddar cheese. *J. Food Prot.* 1996, 59: 460-464.
  40. Rosenow EM, Marth EH. Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole, and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21 and 35 °C. *J. Food Prot.* 1987, 52:452-459.
  41. Ryser, ET, Marth, EH, Doyle, MP. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and storage of cottage cheese. *J. Food Prot.* 1985, 48: 746-750, 753.
  42. Ryu JH, Deng Y, Beuchat LR. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dried beef powder as affected by water activity, sodium chloride content and temperature. *Food Microbiol.* 1999, 16:309-316.
  43. Taylor M. The hemolytic uraemic syndrome: a clinical perspective. *PHLS Microbiol. Digest* 1990, 7: 133-140.
  44. The Food and Beverage Code. 1994. Greek State Official Journal. Athens. 11 January 1994.
  45. Tortorello ML, Reineke KF, Stewart DS, Raybourne RB. Comparison of methods for determining the presence of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J. Food Prot.* 1998, 61:1425-1430.
  46. Upton P, Coia, JE. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with pasteurized milk supply. *Lancet* 1994, 344: 1015.
  47. Wang G, Zhao T, Doyle MP. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Unpasteurized and pasteurized milk. *J. Food Prot.* 1997, 57:610-613.
  48. Weagant SD, Bryant JL, Bark DH. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *J. Food Prot.* 1994, 57:629-131.