ePublishing

Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας

Τόμ. 49, Αρ. 1 (1998)

Επιβίωση της Listeria monocytogenes στα τυριά Γαλοτύρι και Τουλουμοτύρι κατά την παραμονή τους στους 5°C και 12°C

D. K. PAPAGEORGIOU (Δ. Κ. ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ), M. BORI (Μ. ΜΠΟΡΗ), A. MANTIS (Α. ΜΑΝΤΗΣ)

doi: 10.12681/jhvms.15745

Copyright © 2018, DK PAPAGEORGIOU, M BORI, A MANTIS

Άδεια χρήσης Creative Commons Αναφορά-Μη Εμπορική Χρήση 4.0.

Βιβλιογραφική αναφορά:

PAPAGEORGIOU (Δ. Κ. ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ) D. K., BORI (Μ. ΜΠΟΡΗ) M., & MANTIS (Α. ΜΑΝΤΗΣ) A. (2018). Επιβίωση της Listeria monocytogenes στα τυριά Γαλοτύρι και Τουλουμοτύρι κατά την παραμονή τους στους 5°C και 12°C. *Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας*, *49*(1), 48–53. https://doi.org/10.12681/jhvms.15745

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 1998, 49(1): 48-53

Επιβίωση της *Listeria monocytogenes* στα τυριά Γαλοτύρι και Τουλουμοτύρι κατά την παραμονή τους στους 5°C και 12°C

Δημήτριος Κ. Παπαγεωργίου, Μήνα Μπόρη, Αντώνιος Μάντης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Γαλοτύρι και Τουλουμοτύρι ενοφθαλμίζονταν με *L.monocytogenes* [στέλεχος Scott A ή California (CA)], έτσι ώστε να περιέχουν 3,6-7,5 x 10^5CFU/g τυριού. Στη συνέχεια τα τυριά παρέμειναν στους 5 και 12°C και το μεν Γαλοτύρι εξεταζόταν ανά 1 ή 2 ημέρες για 30 ημέρες, το δε Τουλουμοτύρι εξεταζόταν ανά 5 ημέρες για 40 ημέρες. Ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* αριθμούνταν στο υπόστρωμα Lithium chloride phenylethanol moxalactam agar(L.P.M.). Το pH κατά την έναρξη των πειραματισμών ήταν για το Γαλοτύρι 4,35 (S.D.±0,08) και για το Τουλουμοτύρι 4.53 (S.D.±0,06). Κατά τη διάρκεια των πειραματισμών το pH των τυριών δεν μετεβλήθη ουσιαστικά. Ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* και στα δυο στελέχη μειωνόταν σημαντικά (P≤0,01), στο Γαλοτύρι που παρέμεινε στους 5 και 12°C σε επίπεδα <10 κυττάρων/g εντός 7 έως 16 ημερών σε 7 απο τους 8 πειραματισμούς. Η μείωση στους πληθυσμούς της *L. monocytogenes* στο Γαλοτύρι στο χρόνο αυτό ήταν της τάξεως του 2,9-4,55 Log_{10} CFU/g. Η τιμή D για τους πειραματισμούς αυτούς υπολογίστηκε σε 2,17 (S.D. ± 1,02) ημέρες. Η εξέταση δειγμάτων με πληθυσμό <10 κυττάρων/g (όριο αρίθμησης) με ψυχρό εμπλουτισμό σε Tryptose broth για 8 εβδομάδες απέδειξε οτι η *Listeria* ήταν παρούσα μέχρι και την 16 έως και την 27 ημέρα συντήρησης του προϊόντος. Σε έναν πειραματισμό στους 5°C, παρά τη στατιστικώς σημαντική (P≤0,01) μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes*, η αρίθμησή της ήταν δυνατή μέχρι και 24 ημέρες, δεν επιβίωνε όμως πέραν των 26 ημερών. Η *L. monocytogenes* και για τα δυο στελέχη στο Τουλουμοτύρι, που παρέμεινε στους 5 και 12°C επιβίωσε για 40 ημέρες. Η μείωση στους πληθυσμούς της *L. monocytogenes* ήταν στατιστικώς σημαντική (P≤0,05), της τάξεως του 0,98 -1,96 Log_{10} CFU/g και σαφώς μικρότερη απ' ό,τι στο Γαλοτύρι. Μετά από 40 ημέρες συντήρησης του τυριού, αριθμούνταν πληθυσμοί της τάξεως του 5,3-51x10^3CFU/g. Οι πληθυσμοί αυτοί αντιπροσώπευαν το 1,1% έως και 10,6% του αρχικού ενοφθαλμίσματος.

Εργαστήριο Γαλακτομίας, Τμήμα Κτηνιατρικής
Τομέας Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Laboratory of Milk Hygiene and Technology
Department of Food Hygiene and Technology,
School of Veterinary Medicine,
Aristotle University of Thessaloniki

Ημερ. υποβολής: 13.06.97
Ημερ. εγκρίσεως: 19.09.97

ABSTRACT. Papageorgiou D K, Bori M, Mantis A. Survival of *Listeria monocytogenes* during storage of soft cheeses Galotyri and Touloumotyri at 5°C and 12°C. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society 49(1):48-53.* **Soft spreadable cheeses Galotyri and Touloumotyri were inoculated with Listeria monocytogenes strains Scott A or California (CA), to contain 3.6-7.5 x 10^5 CFU/g of cheese and stored at 5°C and 12°C f or 30d and 40d respectively. The initial pH of the cheeses Galotyri and Touloumotyri were 4.35 (S.D.±0.08) and 4.53 (S.D.±0.06) respectively, and remained relatively constant during the entire experiment. Fat in dry mater was 50.06% (S.D.±1.16) in Calotyri and 37.43% (S.D.±0.62) in Touloumotyri cheese. Values of moisture content of cheeses were 68.04% (S.D. ±0.36) and 73.01% (S.D.±0.14) respectively. The NaCl content for Galotyri and Touloumotyri cheeses was 1.54% (S.D.±0.12) and 1.03% (S.D.±0.10) respectively. Duplicate samples of cheeses were used for enumeration of *L. monocytogenes* and pH. *Listeria* counts were obtained by surface plating on lithium chloride phenylethanol moxalactam agar (LPM). Selected *Listeria* colonies were confirmed biochemically. Viability loss of *L. monocytogenes* in Galotyri cheese was rapid, but the pathogen survived for more than 40 d in Touloumotyri cheese. During storage of Galotyri cheese at 5°C and 12°C, population of both strains of *L. monocytogenes* decreased significantly (P≤0.01) to less than 10 viable cells/g of cheese, within 7 to 16 d for 7 trials. At that time population of *L. monocytogenes* decreased by 2.9-4.55 Log_{10} CFU/g. Estimated D-value was 2.17 d (S.D.±1.02) for the 7 trials. Only for one trial *L. monocytogenes* was counted up to 24 d, but was not survived more than 26 d. The reduction of population was statistically significant (P≤0.01) for this trial also. Cold enrichment up to 8 weeks of samples in which *L. monocytogenes* was not counted, indicated that the pathogen survived for 16 d up to 27 d in a11 trials. Both strains of L. monocytogenes survived for more than 40 d during storage of Touloumotyri cheese at 5°C and 12°C. Population of *L. monocytogenes* decreased significantly (P≤0.05) by 0.98 to 1.96 Log_{10} CFU/g during storage of Touloumotyri cheese at 5 °C and 12 °C. After 40d of storage of cheese, populations of the pathogen ranged from**

5.3 to 51 x 10^3 CFU/g. Calculation indicated that survivors of the pathogen represent the 1.1% up to 10.6% of the initial population of *L. monocytogenes* inoculated to the cheese.

Λέξεις ευρετηρίασης: Γαλοτύρι, Τουλουμοτύρι, *Listeria monocytogenes.*

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *L. monocytogenes* είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση Gram θετικό, μη σπορογόνο ψυχρότροφο βακτήριο, παθογόνο στον άνθρωπο και στα ζώα. Η λοίμωξη των ζώων με *L. monocytogenes* προκαλεί συνήθως εγκεφαλίτιδα, αποβολές στα έγκυα ζώα και μαστίτιδα στα γαλακτοπαραγωγά ζώα.[1] Το παθογόνο σπάνια μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο από μολυσμένα ζώα.[2,3] Η κατανάλωση τροφίμων (κυρίως γαλακτομικών) μολυσμένων με *L. monocytogenes* είναι η κύρια οδός μετάδοσης της *L. monocytogenes* στον άνθρωπο.[1,4]

Τα στοιχεία που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τα κρούσματα Λιστερίωσης στον άνθρωπο δείχνουν, ότι μερικά τρόφιμα ενέχονται πιο συχνά και χαρακτηρίζονται πιο επικίνδυνα απ' ό,τι άλλα τρόφιμα. Υψηλού κινδύνου τρόφιμα είναι συνήθως τα έτοιμα προς κατανάλωση και συντηρημένα σε ψύξη για αρκετό χρόνο, ώστε η *Listeria* να έχει την ευκαιρία να πολλαπλασιαστεί. Ενοχοποιούνται συχνά στελέχη του βακτηρίου που ανήκουν στον ορότυπο 4b.[4,5] Τρόφιμα που δεν περιέχουν οξυγαλακτικές καλλιέργειες με τιμές pH>5,5 ευνοούν τον πολλαπλασιασμό της *L.monocytogenes* ακόμη και σε θερμοκρασία ψύξεως.[6,7,8,9,10] Από προηγούμενες ερευνητικές εργασίες φαίνεται, ότι η *L. monocytogenes* μπορεί να πολλαπλασιάζεται μέτρια στα πρώτα στάδια παραγωγής των τυριών Cheddar, Φέτα και Blue cheese. Η ανάπτυξη αυτή σταματά όταν το pH των τυριών μειωθεί σε τιμές κάτω του 5,0, οπότε ο πληθυσμός της *Listeria* μειώνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της ωρίμασης και συντήρησης των τυριών αυτών.[11,12,13] Ανάπτυξη της *L. monocytogenes* που παρατηρήθηκε σε ρυζόγαλο, τυριά τυρογάλακτος και άλλων τυριών της αγοράς έχει σημαντική συσχέτιση με τις υψηλές τιμές του pH (>5,5) των προϊόντων αυτών, στην παρασκευή των οποίων δεν χρησιμοποιούνταν οξυγαλακτικές καλλιέργειες.[8,9,10] Σημαντική ανάπτυξη πληθυσμού της *L. monocytogenes* παρατηρήθηκε στα τυριά Brick και Camembert κατά την ωρίμασή τους, όταν το pH των τυριών ήταν άνω του 5,75.[14,15] Αντίθετα, σε έρευνες με ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος με χαμηλό pH (4,0-4,7) που συντηρούνταν στους 4 °C, παρατηρήθηκε ότι ακόμη και υψηλοί πληθυσμοί *L. monocytogenes* της τάξεως του 10^3-10^4CFU/ml ή g, μειώνονταν μεν σημαντικά, αλλά μπορούσαν να επιβιώνουν 12-27 ημέρες σε γιαούρτη με τελικό pH 4,0-4,15[16,17], 14 ημέρες σε ξυνόγαλα με τελικό pH 4,20 και ζύμωση με *Streptococcus lactis*, αλλά και μέχρι 91 ημέρες στο ίδιο ξυνόγαλο με τελικό pH 4,70.[17] Σε ανάλογο προϊόν με ζύμωση με *Lactobacillus bulgaricus,* η *L. monocytogenes* επιβίωνε μόνο 3-7 ημέρες, ενώ επιβίωνε 28 ημέρες όταν η ζύμωση γινόταν με 5% ενοφθάλμισμα *S. thermophilus* και τελικό pH 4,62. Μακρά επιβίωση μέχρι 259 ημέρες καταγράφονταν όταν η ζύμωση γινόταν με 1% ενοφθάλμισμα *S. thermophilus* και τελικό pH 4,52. Σε ξυνόγαλα που ζυμώθηκε με *L. bulgaricus* και *S. thermophilus* η επιβίωση ήταν από 7 ημέρες σε προϊόν με 5% ενοφθάλμισμα και τελικό pH 3,93 μέχρι 84 ημέρες σε προϊόν με 0,1% ενοφθάλμισμα και τελικό pH 4,41.[17] Σε τυρί Φέτα με pH 4,3 κατά τη διάρκεια της ωρίμασης και συντήρησης του τυριού στους 4°C η *L. monocytogenes* μειωνόταν σημαντικά αλλά επιβίωνε πέραν των 90 ημερών.[11] Από τα παραπάνω στοιχεία φαίνεται ότι η επιβίωση της *L. monocytogenes* στα ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος εξαρτάται όχι μόνο από το τελικό pH του προϊόντος αλλά και από τον τύπο της ζύμωσης και το είδος των οξυγαλακτικών βακτηρίων που συμμετέχουν σ' αυτήν. Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η επιβίωση της *L. monocytogenes* κατά τη συντήρηση στους 5°C και 12°C των παραδοσιακών μαλακών τυριών αλοιφώδους συστάσεως Γαλοτύρι (pH 4,35 SD±0,08) και Τουλουμοτύρι (pH 4,53 SD±0,06).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Καλλιέργειες *L. monocytogenes*

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη της *L. monocytogenes* Scott A και California (CA), αμφότερα ορότυπου 4b. Τα στελέχη παρέμεναν σε κεκλιμένο Tryptose Agar (TA) (Difco). Οι ενδιάμεσες καλλιέργειες αναζωογόνησης σε αποστειρωμένο Tryptose broth (TB) (Difco) και οι τελικές καλλιέργειες σε αποστειρωμένο αποβουτυρωμένο γάλα, που χρησιμοποιούνταν για ενοφθαλμισμό των τυριών, γίνονταν όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία.[7,13] Η καλλιέργεια χρήσεως της *L. monocytogenes* μετά από αραίωσή της με 2% αποστειρωμένο κιτρικό νάτριο (1:5 για το στέλεχος Scott A και 1:1 για το στέλεχος CA) ενοφθαλμιζόταν σε 200 g τυριού, έτσι ώστε ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* στο ενοφθαλμισμένο προϊόν να είναι της τάξεως των 3,6-7,5 x 10^5CFU/g τυριού.

2.2. Ενοφθαλισμός και συντήρηση των τυριών

Έγιναν συνολικά 12 πειραματισμοί. Οκτώ πειραματισμοί αφορούσαν Γαλοτύρι που συντηρήθηκε στους 5°C ή στους 12°C. Τέσσερις πειραματισμοί αφορούσαν το Τουλομοτύρι που συντηρήθηκε στους 5°C ή στους 12°C. Τα τυριά λαμβάνονται από την αγορά της Θεσσαλονίκης και μεταφέρονταν στο εργαστήριο σε ισοθερμικό ψυγείο εντός 30 min σε θερμοκρασία 4-6°C.

Αρχικά ενοφθαλμίζονταν 50 g τυριού, σε περιέκτη γιαούρτης, με καλή ομοιογενοποίηση δια χειρός με αποστειρωμένη σπάτουλα. Προσθέτονταν 50 g τυριού και ακολουθούσε νέα ομοιογενοποίηση. Η ίδια διαδικασία ενοφθαλμισμού γινόταν για άλλα 100 g τυριού σε άλλο περιέκτη και το σύνολο των 200 g τυριού, ενοφθαλμισμένο με *L. monocytogenes* σφραγιζόταν με πλαστικό πώμα που ε-

φάρμοζε πολύ καλά,. σε πλαστικό κύπελλο γιαούρτης για την αποτροπή απώλειας υγρασίας. Η διαδικασία αυτή για τον ενοφθαλμισμό ακολουθήθηκε για την καλύτερη κατανομή της *L. monocytogenes* στο τυρί.[8]

Για την εξασφάλιση αρκετής ποσότητας τυριού για όλες τις δειγματοληψίες κάθε πειραματισμού, υπό τις ίδιες σχεδόν συνθήκες, ενοφθαλμιζόταν με *L. monocytogenes* τυρί σε 6 περιέκτες γιαούρτης με 200 g τυρί ο κάθε περιέκτης. Κάθε περιέκτης με το ενοφθαλμισμένο τυρί παρέμενε στο ψυγείο μέχρι την προετοιμασία του συνόλου των 6 περιεκτών για την έναρξη του πειραματισμού. Για την ελαχιστοποίηση των επιμολύνσεων οι κενοί περιέκτες γιαούρτης που χρησιμοποιούνταν, αποσφραγίζονταν μόλις πριν από τη χρήση τους και οι δειγματοληψίες γίνονταν με αποστειρωμένες μεταλλικές σπάτουλες.

2.3. Χρονοδιάγραμμα δειγματοληψίας και αρίθμησης της *L. monocytogenes* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Δείγμα 10 g από κάθε μια από τις τρεις παρτίδες τυριού (δυο για το Γαλοτύρι και μια για το Τουλουμοτύρι) που χρησιμοποιήθηκαν στους τελικούς πειραματισμούς, εξεταζόταν για την πιθανή παρουσία *L. monocytogenes* πριν από τον ενοφθαλμισμό τους με το βακτήριο, όπως περιγράφεται στη βιλβιογραφία.[8,13] Για την παρατήρηση της επιβίωσης της *L. monocytogenes* στα τυριά που παρέμειναν στους 5°C ή στους 12°C, το μεν Γαλοτύρι εξεταζόταν ανά 1 ή 2 ημέρες για 30 ημέρες, το δε Τουλουμοτύρι εξεταζόταν ανά 5 ημέρες για 40 ημέρες. Το χρονοδιάγραμμα δειγματοληψίας καθορίστηκε μετά από προκαταρτικά πειράματα που δεν περιγράφονται στην εργασία αυτή.

Η πρώτη (1:10) αραίωση γινόταν σε στείρο Tryptose broth (Difco) θερμοκρασίας 42±2°C που περιείχε 2% κιτρικό νάτριο σε στείρες σακούλες stomacher. Τα δείγματα, 10 g το καθένα, ομοιογενοποιούνταν σε stomacher 400, για 3 min. Οι επόμενες δεκαδικές αραιώσεις γίνονταν σε στείρο διάλυμα κιτρικού νατρίου 2% θερμοκρασίας 42±2°C. Ακολουθούσε επιφανειακή εξάπλωση 0.2 ml από τις κατάλληλες κάθε φορά αραιώσεις, σε Lithium chloride phenylethabnol moxalactam agar (LPM).[18] Τα τρυβλία επωάζονταν ανεστραμμένα, αεροβίως για 48 h σε θερμοκρασία 35°C. Αριθμούνταν τυπικές γαλαζοπράσινες αποικίες που προέκυπταν από τη *L. monocytogenes*. Επιλεγμένες αποικίες από τα τρυβλία της μεγαλύτερης αραίωσης, ταυτοποιούνταν ως *L. monocytogenes* σύμφωνα με τη μέθοδο των Ryser και Marth[13], που βασίζεται στη θετική αντίδραση καταλάσης, στη χαρακτηριστική κινητικότητα του μικροβίου (σε μικροσκοπική παρατήρηση ζωντανής καλλιέργειας), στη γαλαζοπράσινη εμφάνιση αποικιών σε Tryptose agar (Difco), και βιοχημικά αποτελέσματα σε Microbact 12 L Listeria kits (Microgen Bioproducts Limited I, Admiralty Way, Camberley, Survey GUIS 3DT, England). Σε δείγματα που δεν αριθμούνταν η *L. monocytogenes* γινόταν επανεξέταση της 1:10 αραίωσης (10 g δείγμα διαλυμένο σε 90 ml Tryptose broth, στη σακούλα Stomacher) μετά από 2, 4, 6 και 8 εβδομάδες ψυχρού εμπλουτισμού του δείγματος στους 4°C. Η εξέταση δειγμάτων μετά από ψυχρό εμπλουτισμό γινόταν με επιφανειακή εξάπλωση 0,2 ml της 1:10 αραίωσης σε τρία διαδοχικά τρυβλία πετρί με LPM agar. Στο δεύτερο και τρίτο κατά σειρά τρυβλίο πετρί εξαπλώνονταν, ό,τι απέμενε στην αποστειρωμένη κεκλιμένη ράβδο, από την προηγούμενη εξάπλωση των 0,2 ml στο πρώτο τρυβλίο πετρί. Επιλεγμένες αποικίες, τυπικές της *L. monocytogenes* από δείγματα θετικά μετά από ψυχρό εμπλουτισμό, ταυτοποιούνταν ως *L. monocytogenes*, όπως περιγράφεται ανωτέρω.

Η αρίθμηση των οξυγαλακτικών στρεπτοκόκκων και λακτοβακίλλων γινόταν με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης 1 ml από τις κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις σε αποστειρωμένα υποστρώματα MRS και M_{17} άγαρ (Oxoid). Μετά την ενσωμάτωση και στερεοποίηση του υποστρώματος γίνονταν επιστοιβάδευση 5 ml περίπου ρευστού αποστειρωμένου υποστρώματος για την αποφυγή επιφανειακής εξάπλωσης των αποικιών. Τα τρυβλία επωάζονταν για 72 h σε θερμοκρασία 32°C.

2.4. Χημική ανάλυση των τυριών

Η υγρασία των τυριών προσδιοριζόταν όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία[19] σε δύο δείγματα από κάθε παρτίδα τυριού. Ο προσδιορισμός του NaCl γινόταν σε δύο δείγματα των 10 g, από κάθε παρτίδα τυριού, με χρήση των ειδικών ταινιών-δεικτών χλωριούχων Quantab (Miles Laboratory, Inc. Elkhart, IN). Η λιποπεριεκτικότητα των τυριών προσδιοριζόταν σε διπλά δείγματα από κάθε παρτίδα τυριού, με τη μέθοδο Gerber-Van Gulic. Το pH των τυριών προσδιοριζόταν πριν από την έναρξη του πειραματισμού και σε κάθε δειγματοληψία, με χρήση ειδικού pHμέτρου (type 522, Wisseschaflich-Technische Werk, Statten, Germany).

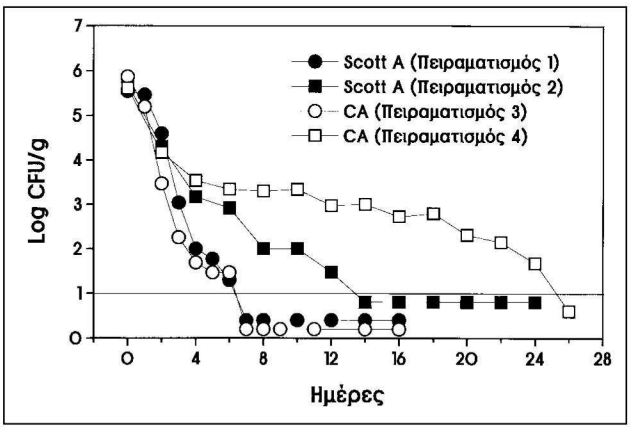
2.5. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τους πειραματισμούς για την επιβίωση της *L. monocytogenes* στα τυριά Γαλοτύρι και Τουλουμοτύρι έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου MINITAB (Rel.11/96).

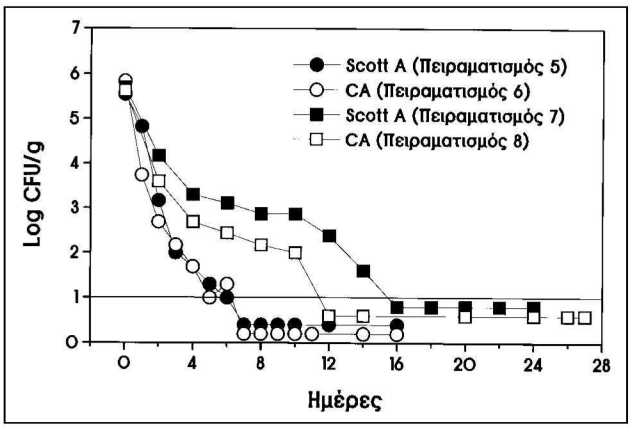
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Φυσικοχημικές παράμετροι των τυριών

Οι φυσικοχημικές εξετάσεις των τυριών που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα αυτή έδωσαν τα παρακάτω αποτελέσματα. Η υγρασία των τυριών Γαλοτύρι και Τουλουμοτύρι ήταν 68,04% (SD±0,36) και 73,01% (SD±0,14) αντίστοιχα. Η λιποπεριεκτικότητα επί ξηράς ουσίας ήταν για το Γαλοτύρι 50,06% (SD±1,16) και 37,43% (SD±0,62) για το Τουλουμοτύρι. Η περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο ήταν για το Γαλοτύρι 1,54% (SD±0,12) και 1,03% (SD±0,10) για το Τουλουμοτύρι. Το pH των τυριών κατά την έναρξη των πειραματισμών ήταν 4,35 (SD±0,08) για



Εικόνα 1. Επιβίωση της *Listeria monocytogenes* στο Γαλοτύρι που συντηρήθηκε στους 5°C.



Εικόνα 2. Επιβίωση της *Listeria monocytogenes* στο Γαλοτύρι που συντηρήθηκε στους 12°C.

το Γαλοτύρι και 4,53 (SD±0,06) για το Τουλουμοτύρι. Οι τιμές αυτές παρέμειναν σχεδόν σταθερές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Τα αποτελέσματα των φυσικοχημικών παραμέτρων εκφράζουν το μέσο όρο 8 μετρήσεων για το Γαλοτύρι (n=8) και 4 μετρήσεων για το Τουλουμοτύρι (n=4).

3.2. Επιβίωση της *L. monocytogenes* στο Γαλοτύρι που συντηρήθηκε στους 5°C.

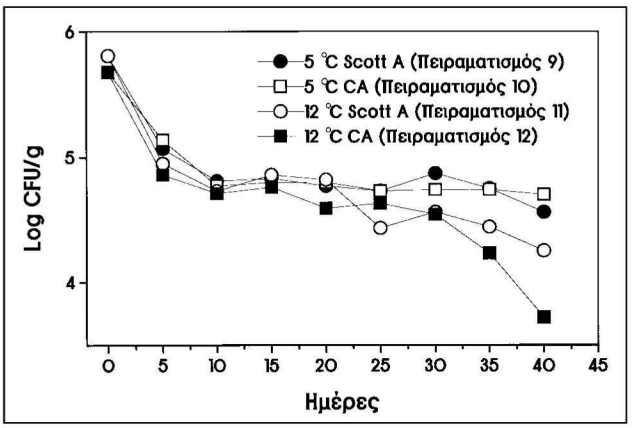
Η εξέταση των τυριών Γαλοτύρι και Τουλουμοτύρι για την πιθανή παρουσία *L.monocytogenes* πριν από τον ενοφθαλμισμό τους με το παθογόνο, ήταν αρνητική.

Τα αποτελέσματα της επιβίωσης της *L.monocytogenes* στο Γαλοτύρι κατά τη συντήρησή του στους 5°C φαίνονται στην εικόνα 1. Από την εικόνα 1 φαίνεται ότι οι πληθυσμοί της *L.monocytogenes* και των δύο στελεχών (Scott A και CA) μειώθηκαν σημαντικά ($P \leq 0.001$) κατά τη συντήρηση του Γαλοτυριού στους 5°C. Οι πληθυσμοί και των δύο στελεχών μειώθηκαν ταχύτερα, τις πρώτες 6-12 ημέρες, κατά 4,2-4,4 Log_{10} CFU/g τυριού στους πειραματισμούς 1-3. Με βάση τις μετρήσεις αυτές η μέση ημερήσια μείωση των πληθυσμών στους πειραματισμούς αυτούς κυμάνθηκε από 0,30-0,73 Log_{10} CFUg τυριού, η δε τιμή D κυμάνθηκε από 1,24-2,97 ημέρες. Αρχικοί πληθυσμοί 3,6-7,5X10^5 CFU/g τυριού μειώνονταν σε <10 CFU/g σε 7-14 ημέρες. Με εξέταση των δειγμάτων μετά από ψυχρό εμπλουτισμό της πρώτης αραίωσης η *L.monocytogenes* βρισκόταν ζωντανή μέχρι και 16-24 ημέρες συντήρησης του τυριού στους 5 °C. Στον πειραματισμό 4 (Εικόνα 1) η *L. monocytogenes* παρουσίασε σχετικά μεγαλύτερη επιβίωση τις πρώτες ημέρες. Η μείωση αυτή του πληθυσμού ήταν στατιστικώς σημαντική ($P \leq 0,001$) αλλά μόνο κατά 2,9 Log_{10} CFU/g τυριού στις πρώτες 16 ημέρες και κατά 3,95 Log_{10} CFU/g τυριού μετά από 24 ημέρες συντήρησής του στους 5°C. Η σχετικά μεγαλύτερη επιβίωση του βακτηρίου τις πρώτες ημέρες του πειραματισμού αυτού πρέπει να σχετίζεται με το υψηλότερο σχετικά pH του τυριού (4,51) και του χαμηλότερου πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων του. Στο τυρί αυτό αριθμούνταν οξυγαλακτικοί στρεπτόκοκκοι και λακτοβάκιλλοι της τάξεως των 10^5 και 10^6 CFU/g τυριού αντίστοιχα, σε όλες τις δειγματοληψίες. Αντίθετα, σε όλους τους άλλους πειραματισμούς στο Γαλοτύρι αριθμούνταν οξυγαλακτικοί στρεπτόκοκκοι και λακτοβάκιλλοι της τάξεως του 10^7 και 10^8 CFU/g τυριού αντίστοιχα.

3.3. Επιβίωση της *L. monocytogenes* στο Γαλοτύρι που συντηρήθηκε στους 12°C.

Οι πληθυσμοί της *L.monocytogenes* μειώθηκαν σημαντικά ($P \leq 0.01$) και κατά τη συντήρηση του Γαλοτυριού στους 12°C. Οι πληθυσμοί και των δύο στελεχών μειώθηκαν ταχύτερα τις πρώτες 6-14 ημέρες κατά 3,6-4,5 Log_{10} CFU/g τυριού στους πειραματισμούς 5-8 (Εικόνα 2). Με βάση τις μετρήσεις αυτές η μέση ημερήσια μείωση των πληθυσμών κυμάνθηκε από 0,29-0,80 Log_{10} CFU/g τυριού, η δε τιμή D κυμάνθηκε από 1,35-4,05 ημέρες. Αρχικοί πληθυσμοί 3,6-7,0X10^5 CFU/g τυριού μειώνονταν σε <10 CFU/g τυριού σε 7-16 ημέρες. Με εξέταση των δειγμάτων μετά από ψυχρό εμπλουτισμό της πρώτης αραίωσης η *L. monocytogenes* απομονωνόταν μέχρι και 16-27 ημέρες συντήρησης του τυριού στους 12°C (Εικόνα 2).

Σε ανάλογες εργασίες παρατηρήθηκε ότι η *L. monocytogenes* επιβίωνε σε γιαούρτη μέχρι και 12-27 ημέρες κατά τη συντήρηση του προϊόντος στους 4°C.[16,17] Το δυσμενές pH της γιαούρτης (4,0) και του ξυνογάλατος (4,20-4,62) και ιδιαίτερα η συμμετοχή του Lactobacillus bulgaricus[17] επέφεραν τη δραστική μείωση των πληθυσμών της *L.monocytogenes* κυρίως τις πρώτες 8-12 ημέρες της συντήρησης της γιαούρτης στους 4°C, ενώ μικρός πληθυσμός *L.monocytogenes* επιβίωνε για άλλες 8-19 ημέρες. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της έρευνάς μας όπου ο πληθυσμός της *L.monocytogenes* μειωνόταν σε όλους τους πειραματισμούς σημαντικά ($P \leq 0.01$)



Εικόνα 3. Επιβίωση της *Listeria monocytogenes* στο Τουλουμοτύρι που συντηρήθηκε στους 5°C και 12°C.

εντός 6-14 ημερών στο Γαλοτύρι που παρέμεινε στους 5°C και 12°C. Πληθυσμός *L. monocytogenes* < 10 CFU/g επιβίωνε μέχρι και 16-27 ημέρες συντήρησης του προϊόντος.

3.4. Επιβίωση της *L. monocytogenes* στο Τουλουμοτύρι που συντηρήθηκε στους 5°C και 12°C

Τα αποτελέσματα της επιβίωσης της *L. monocytogenes* στο Τουλουμοτύρι κατά τη συντήρησή του στους 5°C και 12°C φαίνονται στην Εικόνα 3.

Ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά ($P \leq 0,05$) κατά τη συντήρηση του τυριού στους 5°C επί 40 ημέρες κατά 1,25 Log_{10} CFU/g και κατά 0,98 Log_{10} CFU/g στα στελέχη Scott A και CA αντίστοιχα. Από αρχικούς πληθυσμούς 6,6 X 10^5 CFU/g (στέλεχος Scott A) και 4,8 X 10^5CFU/g (στέλεχος CA) επιβίωναν μετά από 40 ημέρες συντήρησης του τυριού στους 5 °C, πληθυσμοί της τάξεως των 3,7 X 10^4 CFU/g και 5,1 X 10^4CFU/g για τα στελέχη Scott A και CA αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί που επιβίωναν μετά από 40 ημέρες αντιπροσώπευαν το 5,6% και 10,6% των αρχικών πληθυσμών για τα δύο στελέχη Scott A και CA αντίστοιχα.

Όταν το Τουλουμοτύρι συντηρούνταν στους 12°C για 40 ημέρες, η μείωση των πληθυσμών της *L. monocytogenes* ήταν στατιστικώς σημαντική ($P \leq 0,01$). Η μείωση των πληθυσμών ήταν της τάξεως των 1,37 Log_{10} CFU/g και 1,96 Log_{10} CFU/g στα στελέχη Scott A και CA αντίστοιχα. Έτσι από αρχικούς πληθυσμούς 6,6 X 10^5 CFU/g (στέλεχος Scott A) και 4,8 X 10^5 CFU/g (στέλεχος CA) επιβίωναν μετά από 40 ημέρες συντήρησης του τυριού στους 12°C πληθυσμοί της τάξεως των 2,8 X 10^4 CFU/g και 5,3 X 10^3 CFU/g για τα στελέχη Scott A και CA αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί αυτοί αντιπροσώπευαν μόνο το 4,2% και 1,1% των αρχικών πληθυσμών των στελεχών Scott A και CA αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι, ανεξαρτήτως στελέχους, η επιβίωση της *L. monocytogenes* στο Τουλουμοτύρι που συντηρούνταν στους 5°C για 40 ημέρες ήταν μεγαλύτερη από την επιβίωση που μετρήθηκε στο Τουλουμοτύρι που συντηρούνταν στους 12 °C κυρίως μετά την 25 ημέρα (Εικόνα 3). Η χαμηλή θερμοκρασία (4°C) περιόρισε τη βλαπτική δράση που ασκούσε το δυσμενές περιβάλλον του τυριού στη *L. monocytogenes*. Αυτό συμφωνεί και με άλλες έρευνες, [7,20] στις οποίες η χαμηλή θερμοκρασία (4°C) μείωνε τη βλαπτική επίδραση του NaCl στην *L. monocytogenes*.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής δείχνουν ότι η επιβίωση της *L. monocytogenes* στο Τουλουμοτύρι με pH 4,53 (SD±0,06) είναι μακρά, παρά τη στατιστικώς σημαντική μείωση των πληθυσμών στις 40 ημέρες συντήρησης του τυριού και παρομοιάζει περισσότερο με τη μακρά επιβίωση της *L. monocytogenes* σε τυρί Φέτα με τελικό pH 4,3[11] και σε ξυνόγαλα που ζυμώθηκε με 1% *S. thermophilus* και τελικό pH 4,52-4,67[17]. Αντίθετα, η *L. monocytogenes* δεν επιβίωνε στο Γαλοτύρι με pH 4,35 (SD±0,08) κατά τη συντήρησή του πέραν των 16-27 ημερών, ακόμη και όταν το τυρί ήταν επιμολυσμένο με υψηλούς πληθυσμούς. Η δραστική μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* στο Γαλοτύρι καταγραφόταν στις πρώτες 6-12 ημέρες της συντήρησης, ενώ μικρός πληθυσμός του παθογόνου (<10 CFU/g) επιβίωνε για άλλες 10-15 ημέρες. Η επιβίωση της *L. monocytogenes* στο Γαλοτύρι προσομοιάζει περισσότερο με την επιβίωσή της στη γιαούρτη[16,17] και σε ξυνόγαλα που ζυμώθηκε με 5% *S. thermophilus* και τελικό pH 4,62 ή ξυνόγαλα με 1-5% *S. lactis* και τελικό pH 4,17-4,38 [16,17].

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή χρηματοδοτήθηκε από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας του Υπουργείου Βιομηχανίας, Ενέργειας και τεχνολογίας, προς την οποία οι συγγραφείς εκφράζουν θερμές ευχαριστίες. Οι συγγραφείς ευχαριστούν επίσης τον καθηγητή της Ζωικής Παραγωγής κ. Αθανάσιο Γιαννακόπουλο για τη βοήθειά του στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Seeliger HPR. Diagnosis and treatment of listeriosis. In Listeriosis. Joint WHO/ROI.1987. Consultation on Prevention and Control. Berlin (West),10-12. December 1986.
2. Gray ML. Epidemiological aspects of listeriosis. Am. J. Public Health 1963 35:554-563.
3. Odegaard B, Grelland R, Henriksen SD. A case of Listeria-infection in man, transmitted from sheep. Acta Med. Scand.1952 142:231-238.
4. Ryser ET, Marth EH. Listeria Listeriosis, and Food Safety. Marcel Dekker Inc. New York.1991.
5. Rocourt J. Listeria monocytogenes. the state of the Science. Dairy, Food and Envir. Sanit.1994 14:72-82.
6. Donnelly CW, Briggs EH. Psychrotrophic growth and thermal inactivation of Listeria monocytogenes as a function of milk composition. J. Food Prot. 1986 49:994-998,1002.

7. 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.

8. 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.

9. Papageorgiou, DK, Bori M, Mantis A. Growth of Listeria monocytogenes in rice pudding (milk rice) during its storage at 5, 12 and 22°C. Milk Milchwissenschaft 1997, 52:330-333.

10. Genigeorgis C, Carniciu M, Dufulescu D, Farver TB. Growth and survival of Listeria monocytogenes in market cheeses stored at 4 to 30°C. J. Food Prot.1991 54:662-668.

11. Papageorgiou DK, Marth EH. Fate of Listeria monocytogenes during the manufacture, ripening and storage of Feta cheese. J. Food Prot.1989 52:82-87.

12. Papageorgiou DK, Marth EH. Fate of Listeria monocytogenes during the manufacture and ripening of Blue cheese.J. Food Prot.1989 52:459-465.

13. Ryse ET, Marth EH. Behavior of Listeria monocytogenes during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. J. Food Prot.1987 50:7-13.

14. Ryser ET, Marth EH. Behavior of Listeria monocytogenes during manufacture and ripening of brick cheese. J. Dairy Sci.1989 72:838-853.

15. Ryser ET, Marth EH. Fate of Listeria monocytogenes during the manufacture and ripening of Camembert cheese. J. Food Prot.1987 50:372-378.

16. Choi KH, Shaack MM, Marth EH. Survival of Listeria monocytogenes in cultured buttermilk and yogurt. Milchwissenschaft 1988 43:790-792.

17. Shaack MM, Marth EH. Survival of Listeria monocytogenes in refrigerated cultured milks and yogurt. J. Food Prot.1988 51:848-852.

18. Lee WH, Mclain D. Improved Listeria monocytogenes selective agar. Appl Environ. Microbiol.1986 52:1215-1217.

19. Richardson GH (ed). Standard methods for the examination of dairy products, l5th ed.1985. American Public Health Assoc., Washington, DC.

20. Ralovich B. Listeriosis research-present situation and perspective. 1984 Akademia Kiado, Budapest.