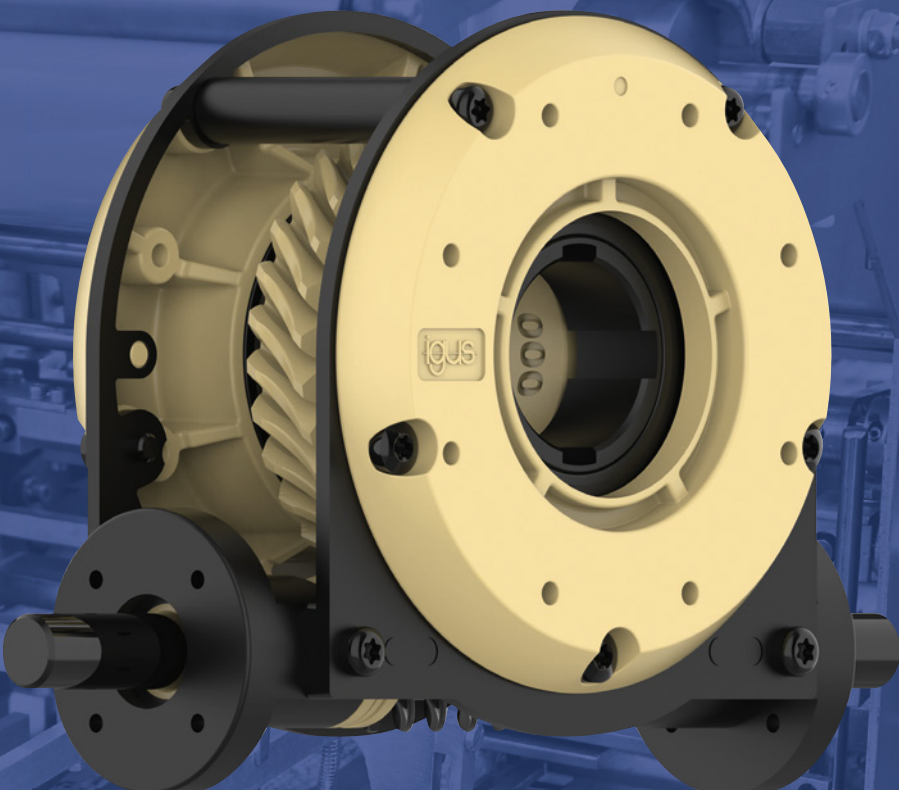


INDUSTRIE ALIMENTARI

Poste Italiane spa - Sped. in A.P. - D.L. 353/2003 (Conv. in L. 27/02/2004 n° 46) art. 1 comma 1 MBPA NORD OVEST - n. 5/2021 - IP - ISSN 0019-901X



igus®.it drygear® Apiro "hygienic design"
Nuovo riduttore per cambi formato,
spintori, tavole e assi rotanti ...



Influenza di *Lactobacillus sakei* (LAK-23) sulla crescita di *Listeria monocytogenes* intenzionalmente inoculata in filetti di branzino affumicati a freddo, confezionati in sottovuoto e conservati a 6°C

Effect of a Lactobacillus sakei (LAK-23) culture on growth of Listeria monocytogenes intentionally inoculated into fillets of cold smoked sea bass vacuum packed and stored at 6°C



■ PAROLE CHIAVE

Filetti di branzini affumicati a freddo; Starter Sacco; *Listeria monocytogenes*; bioprotezione

RIASSUNTO

Lo scopo del lavoro è stato quello di monitorare la presenza di *Listeria monocytogenes* in prodotti ittici affumicati a freddo (trote, salmoni e branzini) commercializzati in Italia. I branzini affumicati a freddo rappresentano un nuovo prodotto, non ancora commercializzato. Inoltre considerando la capacità di *L. monocytogenes* di crescere in questi prodotti, a causa delle loro caratteristiche chimico-fisiche ($pH > 6.0$, $A_w > 0.97$) e della loro lunga shelf-life a 4°C, si è voluto verificare l'attività di uno starter bioprotettivo, LAK-23 (Sacco srl, Via Alessandro Manzoni 29/A, 22071 Cadorago, CO, Italia). A tal proposito branzini affumicati a freddo sono stati inoculati intenzionalmente con una miscela di diversi ceppi di *L. monocytogenes* e di LAK-23, costituito da *Lactobacillus sakei*. Dopo inoculo i branzini affumicati a freddo sono stati confezionati in sottovuoto e conservati a 6-7 °C per 60 giorni. A 0,15,30,45 e 60 giorni, i branzini sono stati analizzati per valutare l'efficacia dello starter nei confronti di *L. monocytogenes*. Il monitoraggio dei prodotti affumicati a freddo del commercio ha evidenziato la presenza di tale microrganismo prevalentemente attraverso cultura di arricchimento (Presenza in 25 g). Le listerie isolate sono state sierotipizzate e appartengono prevalentemente a sierotipi (1/2c) poco virulenti, e in tono minore ad altri sierotipi (1/2a, 1/2b e 4b).

L'aggiunta dello starter, costituito da batteri lattici, ha impedito la crescita di *L. monocytogenes* ed a fine shelf-life la sua concentrazione era simile a quella dell'inoculo. L'impiego dello starter considerato può permettere di inserire i branzini affumicati a freddo o, in genere, i prodotti ittici affumicati a freddo nella categoria 1.3 (Reg. CE 2073/05) tra i prodotti che non supportano la crescita di tale microrganismo. La presenza e l'attività dello starter non modificava l'odore o il sapore dei branzini affumicati.

■ KEYWORDS

Sea Bass cold smoked fillets; Starter Sacco; *Listeria monocytogenes*; bioprotection

SUMMARY

The aim of the work was to monitor the presence of *Listeria monocytogenes* in cold smoked fish products (trout, salmon and sea bass) marketed in Italy. Cold smoked sea bass represent a new product, not yet commercialized and was collected in a production facility. Furthermore, considering the ability of *L. monocytogenes* to grow in these products, due to their physico-chemical characteristics ($pH > 6.0$, $A_w > 0.97$) and their long shelf-life at 4°C, it was verified the activity of a bioprotective starter, LAK-23 (Sacco srl, Via Alessandro Manzoni 29/A, 22071 Cadorago, CO, Italy). In this regard, smoked sea bass were intentionally inoculated with a mixture of different strains of *L. monocytogenes* and LAK-23, consisting of *Lactobacillus sakei*. After inoculation, the smoked sea bass were vacuum-packed and stored at 6/7 °C for 60 days. At 0.15,30,45 and 60 days the samples of sea bass were analyzed to evaluate the effectiveness of the starter against *L. monocytogenes*. The data of the monitoring showed that the cold smoked products sold in the supermarkets can be contaminated by this microorganism, the presence of which has been highlighted mainly through enrichment culture (presence in 25 g). The isolated listeria have been serotyped and belong mainly to low virulent serotypes (1/2c), following serotypes 1/2a, 1/2b and 4b. The addition of the starter, consisting of lactic bacteria, prevented its growth and at the end of the shelf-life, the amount of *L. monocytogenes* observed was similar to that of the inoculum. The use of the tested starter can allow to include cold smoked sea bass or smoked fish products in category 1.3 (Reg. EC 2073/05) among the products that do not support the growth of this microorganism. Finally the activity of the starter did not produce off-flavor or odor of the smoked sea bass.

Introduzione

La carne dei prodotti ittici rappresenta un'importante fonte di proteine per l'uomo (97). Tuttavia è altamente suscettibile al deterioramento sia microbiologico che chimico a causa della sua elevata attività dell'acqua (Aw), pH >6.0 unità, quantità relativamente elevate di amminoacidi liberi e presenza di enzimi autolitici (32,55). Lo stesso raffreddamento rapido e la conservazione in ghiaccio prolungano per soli 9-12 giorni la durata della *shelf-life* del pesce e dei prodotti della pesca, nonostante l'impiego di imballaggi e metodi tecnologici innovativi (18). Per prolungare la conservazione del pesce fresco sempre più spesso si ricorre a processi tecnologici che rallentano o bloccano l'attività degradativa. L'affumicatura è una di queste tecniche. Prodotti ittici quali salmoni e trote vengono salati e affumicati proprio per incrementarne le caratteristiche organolettiche e la durata della conservazione. Recentemente, allo scopo di fornire nuovi prodotti con alto valore nutrizionale, si ricorre all'affumicatura a freddo di specie ittiche non convenzionali. In Friuli, un'azienda esperta nell'affumicatura di prodotti ittici ha studiato la potenzialità di affumicare a freddo filetti di branzino. In Italia i branzini vengono solitamente commercializzati in box con ghiaccio in scaglie o a 4°C confezionati in aria o in sottovuoto, sia eviscerati che interi o in filetti. Conseguentemente la loro *shelf-life* è limitata a 9-12 giorni. Infatti, nel breve tempo gli enzimi tissutali e la popolazione mi-

crobica contaminante si adattano alle temperature di refrigerazione, producendo i metaboliti tipici dell'alterazione, che consistono in azoto basico volatile (composti ammoniacali), trimetilammina, ammine e composti derivanti dalla degradazione dei grassi (5,21,50,96,102). Pertanto, come succede per trote, salmoni ed altri pesci, viene sempre più spesso utilizzata l'affumicatura, allo scopo di prolungare tramite refrigerazione la loro *shelf-life* fino a 45-60 giorni.

In particolare, i branzini, essendo pesci di taglia media, confrontabili a trote e salmoni, vengono affumicati a freddo: temperatura massima 29°C. Anche la tecnologia applicata è simile a quella utilizzata per trote e salmoni e comprende: Approvvigionamento delle materie prime; Filettatura e produzione della bafra; Salatura a secco; Affumicatura tradizionale a freddo, senza l'utilizzo di additivi; Finitura dei fili; Taglio, Confezionamento in sottovuoto; Conservazione a 4 °C; Trasporto e vendita del prodotto finito a 4°C. Pertanto i filetti di branzino affumicati a freddo appartengono alla categoria degli alimenti poco lavorati, ovvero che subiscono lavorazioni che non intaccano la natura del prodotto, e pertanto mantengono solo per brevi periodi di tempo (102). Il branzino affumicato a freddo appena confezionato non è sterile e alla fine si deteriora principalmente a causa dell'attività microbiologica. È stato suggerito che l'Aw, la concentrazione del sale nella fase acquosa (WPS), il pH e la carica microbica iniziale determineranno lo sviluppo di microrganismi alteranti specifici e caratteristici del prodotto (48).

L'ecologia microbica dei prodotti della pesca affumicati a freddo è stata studiata intensamente (7,40,50,56,66,70,71,73,102).

La popolazione batterica iniziale è strettamente dipendente dalle condizioni igieniche di lavorazione e produzione (71,102) e consiste in *Enterobacteriaceae*, *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Photobacterium phosphoreum*, batteri lattici (LAB) e *Brochothrix* spp. (14,17,54,71,74,102,103). Durante la conservazione si osserva una predominanza dei LAB e *B. thermosphacta* in pesce affumicato confezionato sia in sottovuoto che in MAP (65,66).

Tuttavia la crescita e lo sviluppo di un'abbondante popolazione microbica non comporta il deterioramento del prodotto. Infatti non sono state identificate correlazioni tra il numero totale di microrganismi, la qualità sensoriale e la *shelf-life* (40,57). Il fumo abbassa la carica microbica della materia prima, ma non è in grado di eliminarla completamente. Da qui l'importanza del rigoroso rispetto delle norme igieniche e dell'utilizzo di materie prime di alta qualità. Nei prodotti conservati sottovuoto la maggior parte dei batteri Gram-negativi (64), come *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. e *S. putrefaciens* (41) viene inibita; la presenza di NaCl (WPS = 4,6%) contribuisce a mantenere *S. putrefaciens* a un livello basso (59) e concentrazioni di NaCl intorno al 5,5-6,5% WPS (Aw 0,96) inibiscono la crescita di batteri Gram-negativi, come *Pseudomonas* spp., mentre consentono la crescita di batteri più resistenti come i LAB (66). Il WPS, in particolare, deve essere sempre superiore a 3.5%

per impedire lo sviluppo di *Clostridium botulinum* psicrotrofo (es. tipo E). In queste condizioni solo i LAB crescono nel tempo (6,14,17,54,71,74,102,103).

La causa della loro predominanza non è stato ancora completamente spiegato, ma sembra chiaro che i LAB si adattino bene alle particolari condizioni che si creano nel prodotto affumicato (65,67,92). Purtroppo, però, durante la conservazione del prodotto ittico affumicato, *Listeria monocytogenes*, se presente come contaminante anche a bassissime concentrazioni (< 1 UFC/g), può crescere essendo psicrotrofo durante i 2 mesi di shelf-life. Diversi lavori dimostrano che la trota iridea affumicata a freddo confezionata sottovuoto può contenere un gran numero di *L. monocytogenes* e che, pertanto, deve essere considerata come una potenziale fonte di infezione (31,43).

Il processo di affumicatura a freddo non uccide *L. monocytogenes* (4) e, nonostante la conservazione a freddo del prodotto, può verificarsi una sua crescita (78). *L. monocytogenes* sopravvive comunemente nei prodotti ittici affumicati a freddo e a caldo confezionati sottovuoto e negli ambienti di lavorazione degli alimenti a temperature di refrigerazione (30,37,39,60).

La lunga durata di conservazione (60 giorni) consente a *L. monocytogenes* di avere abbastanza tempo per moltiplicarsi a livelli pericolosi se la temperatura di conservazione non viene mantenuta al di sotto di 4°C (28,58). Atmosfere di ossigeno ridotte possono controllare la crescita di batteri deterioranti aerobici; tuttavia, lo stesso ambiente può essere benefi-

co per la proliferazione di patogeni psicrotrofi, anaerobi facoltativi o strettamente anaerobici, come *Clostridium botulinum* non proteolitico e *L. monocytogenes* in prodotti ittici (47,90,101).

È stato spesso riconosciuto che i prodotti ittici affumicati sono contaminati da diversi sierotipi di *L. monocytogenes* e sono stati considerati un importante veicolo della listeriosi umana (46,83). Anzi, diversi pesci affumicati (salmone, trota) confezionati sottovuoto sono stati precedentemente associati a casi di listeriosi, caratterizzate da gastroenterite non invasiva (78).

Segnaliamo gastroenterite febbrile in cinque persone precedentemente sane associata al consumo di trota iridea affumicata a freddo (*Onchorhynchus mykiss*) confezionata sottovuoto e contenente alti livelli di *L. monocytogenes* (78). Questa è un patogeno di origine alimentare che causa la listeriosi principalmente nei pazienti immunocompromessi (36,72,93). Le forme cliniche predominanti consistono in infezioni del sistema nervoso centrale, sepsi, aborto e natalità.

È stata anche segnalata una forma diarroica, dovuta all'ingestione di alimenti contaminati da *L. monocytogenes* in persone precedentemente sane (25,44,85,91). Considerando che *L. monocytogenes* presenta diversi livelli di virulenza e patogenicità, sono stati descritti discriminatori per questo organismo (8,10,11,86,94,106,107). La tipizzazione con elettroforesi su gel a campo pulsato (PFGE), che finora ha fornito la discriminazione dei ceppi, è diventata rapidamente il metodo di tipizzazione standard per rilevare i focolai di listeriosi (10,42). Tuttavia, questo metodo è laborioso e richiede tempo e quindi per scopi pratici è spesso preceduto dalla sierotipizzazione (78).

Poiché tutti i principali focolai della forma invasiva di listeriosi sono dovuti a ceppi di sierotipo 4b, raro negli alimenti rispetto ai ceppi 1/2a (12,35), la procedura adottata per le indagini sui focolai si basa sulla caratterizzazione di serovar per fornire informazioni preziose per lo screening rapido di gruppi di ceppi.

Ora, considerando che *L. monocytogenes* rappresenta un reale pericolo per i prodotti ittici affumicati, lo scopo del lavoro è stato quello di monitorare la presenza di tale microorganismo in trote, salmoni e branzini affumicati e dimostrare che sia possibile evitare la crescita attraverso l'impiego di uno starter del commercio costituito da *L. sakei*.

Materiali e metodi

Monitoraggio di *L. monocytogenes* in prodotti ittici affumicati

Sono stati analizzati circa 420 campioni di prodotti ittici affumicati e in particolare 100 campioni di salmone, 120 di trote e 200 di branzini. I campioni di salmone e trote erano reperiti in supermercati dell'Italia Settentrionale, mentre i branzini affumicati erano di origine sperimentale. Di ogni campione era eseguita la ricerca di *L. monocytogenes* utilizzando la metodica secondo il metodo ISO (51). In particolare 25 g di prodotto erano diluiti in brodo Fra-

ser (1/2 – Oxoid, Italia). Dopo omogenizzazione si procedeva secondo le metodiche per la ricerca qualitativa o quantitativa (51). Da ogni piastra di Agar Listeria acc. Ottaviani Agosti (Biolife, Italia) erano prelevate 5 colonie *L. monocytogenes* presuntive, che sono state identificate tramite le stesse metodiche riportate in ISO (51). In questa maniera sono state identificate circa 50 colonie, che sono state sierotipizzate attraverso i sieri prodotti da DENKA SEIKEN (Co. Ltd, Tokio, Giappone) distribuiti in Italia da Biogenetics Diagnostics srl. (Padova, Italia).

Inibizione di *L. monocytogenes* intenzionalmente inoculata in branzini affumicati tramite starter LAK-23 (Sacco srl, VA).

Preparazione del substrato e suddivisione dei gruppi

I branzini utilizzati erano allevati in gabbie in mare da Orada Adriatic d.o.o. a Cres, Croazia. Erano raccolti, eviscerati, posti in box di polistirolo contenenti ghiaccio e inviati entro 5 ore allo stabilimento di trasformazione, rappresentato dalla Ditta Friul-trota di Pighin s.r.l. (San Daniele del Friuli, Udine).

Tale azienda ha una esperienza pluriennale nell'affumicatura a freddo di prodotti ittici, quali salmoni, sia allevati che selvaggi, e soprattutto trote, tra cui la famosa Trota Regina di San Daniele. I filetti di branzino erano trasformati in baffe, che erano poste sottosale (**Foto 1**), fino al raggiungimento di un valore di WPS > o uguale a 3,5%, quindi erano desalate e affumicate, a bassa temperatura (<30°C). Dopo l'affumicatura i fi-

letti erano confezionati in sottovuoto in Ecoterm VP 300 film and Multofog GA 170 (Sudpack, Italy), stoccati a 4°C e portati presso il Di4a (Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali dell'Università degli Studi di Udine).

Qui i campioni sono stati suddivisi in 4 gruppi di 15 campioni cadauno ed analizzati ai tempi 0, 15, 30, 45 e 60 giorni (tempo indicato dalla *shelf-life* del prodotto considerato).

- a) Campioni controllo tal quale (non inoculato);
- b) Campioni contenenti starter Sacco LAK-23 (*Lactobacillus sakei* produttore di batteriocine) e mix di *L. monocytogenes*;
- c) Campioni contenenti solo starter Sacco LAK-23;
- d) Campioni contenenti solo mix *L. monocytogenes*.

Preparazione della sospensione

L'inoculo era costituito da 3 ceppi di *Listeria monocytogenes*, derivanti da Collezioni Internazionali e da Collezione del Di4a. In particolare sono stati utilizzati i seguenti ceppi: *L. monocytogenes* NCTC 10887 (sierotipo 1/2b), *L. monocytogenes* 9Di4a (serotipo 4b) di matrice ittica e *L. monocytogenes* 11Di4a di origine umana e responsabile di listeriosi invasive. Le singole sospensioni erano preparate utilizzando colture di 18 h di *L. monocytogenes* cresciute in Plate Count Agar (Oxoid, Italia) addizionate ad acqua peptonata (Peptone 1 g; NaCl 35 g; H₂O distillata 1000 mL; %; Aw 0,96) aventi DO di 0.1 a 600 nm. Ai fini di valutare la carica di ogni sospensione, erano eseguite diluizioni delle stesse in acqua peptonata sterile e 0,1 mL di ogni diluizione era

spatolata in piastre contenenti Palcam Agar Base (Oxoid, Italia). Le piastre erano incubate a 37°C per 48 ore e le colonie cresciute erano contate. Ogni sospensione conteneva mediamente circa 7-8 log UFC/mL.

Preparazione dei campioni per il saggio

Per la preparazione dei campioni è stato preparato un mix (sospensione madre) con le sospensioni contenenti i diversi tipi di *L. monocytogenes* in acqua peptonata (NaCl 3,5 %; Aw 0,97; 7 log UFC/mL), che rappresenta-



Esempio di salatura a secco di filetti di prodotti ittici.

va la sospensione madre, poi diluita e inoculata tramite nebulizzazione in ragione di 1 mL sui filetti di branzino affumicati a freddo (valori finali – circa 2 log UFC/cm²).

Coltura starter utilizzata

È stata utilizzata una tipologia di coltura starter costituita da batteri lattici: LAK-23 (Sacco srl, Via Alessandro Manzoni 29/A, 22071 Cadorago, CO, Italy). Lo

starter era liofilizzato, contenuto in sacchetto di stagnola e conservato congelato.

Al momento dell'uso era scongelato, omogenizzato e diluito in acqua peptonata sterile (NaCl 3,5%; Aw 0,97). Ai fini di valutare la sua carica, erano eseguite diluizioni delle stesse in acqua peptonata sterile e 0,1 mL di ogni diluizione era inoculata in piastre di Petri, cui successivamente era aggiunto il terreno deMan Rogosa Sharpe (MRS, Oxoid, Italia), tramite metodica a doppio strato. Le piastre erano incubate a 37°C per 48-72 ore e le colonie cresciute erano contate. Ogni sospensione conteneva mediamente circa 11 log UFC/g. Venivano successivamente prodotte delle diluizioni decimali, che erano inoculate tramite nebulizzazione in ragione di 1 mL sui filetti di branzino affumicati a freddo (valori finali – circa 5 log UFC/cm²).

Campioni inoculati

Per ogni test erano inoculati 15 campioni di branzino affumicati, che venivano analizzati in triplicato in ogni tempo: 0, 15, 30, 45 e 60 giorni (tempo indicato dalla *shelf-life* del prodotto considerato). Quindici campioni erano conservati confezionati all'origine e rappresentavano il controllo, gli altri erano sconfezionati e inoculati con sola *L. monocytogenes*, col solo starter LAK-23 e col mix *L. monocytogenes*/LAK-23 e quindi riconfezionati secondo la tecnica e la confezione usata da Friultrota. Tutti i campioni controllo (non inoculati) o inoculati erano i conservati a 6-7°C, che rappresenta la temperatura standard di un frigorifero da supermercato.

Analisi microbiologica

Alle date stabilite, tre campioni di ogni Gruppo erano soggetti ad analisi microbiologiche, che comprendevano: la valutazione della Conta batterica totale (CBT) in Plate Count Agar (Oxoid, Italia) incubato a 30°C per 48-72 h; i batteri lattici (LAB) in De Man Rogosa Sharpe agar (MRS, Oxoid, Italia) incubato a 37 °C per 48 h (metodo doppio strato); i lieviti e le muffe in Malt Extract Agar (MA, Oxoid, Italia) incubato a 25 °C per 72-96 h; i coliformi totali e i coliformi fecali in Violet Red Bile Lactose Agar (VRBLA, Oxoid, Italia) incubato rispettivamente a 37°C e 44°C per 24 h; Staphylococchi coagulasi positivi in Baird-Parker Agar medium (BP, Oxoid, Italia) addizionato di egg yolk tellurite emulsion (Oxoid, Italia) incubato a 35°C per 24-48 h, e poi confermati con il test di coagulase; i Clostridi solfito-riduttori in Differential Reinforced Clostridial Medium (DRCM, VWR, USA) incubato a 37°C per 24-48 h in giara per anaerobiosi ottenuta con gas pack anaerobic system (BBL, Becton Dickinson, USA); *L. monocytogenes* era ricercata o quantificata secondo il metodo ISO (51) e *Salmonella* spp. secondo ISO (53).

Analisi chimico-fisiche

I campioni controllo [a] e inoculati col solo starter [c] erano soggetti anche ad analisi chimico-fisiche e in particolare: Il pH è stato determinato in 3 punti differenti usando un pHmetro (Basic 20, Crison Instruments, Spain), immettendo la sonda direttamente nel prodotto. L'attività dell'acqua (Aw) era misurata con

Aqua Lab 4 TE, (Decagon Devices, USA), l'umidità secondo il metodo A.O.A.C. (2), il NaCl, il TVB-N (total volatile basic nitrogen) secondo Pearson (82). Il valore di WPS (water phase salt) era determinato secondo la formula $WPS = \% NaCl (\% NaCl + \% umidità)^{-1} 100$ secondo Huss *et al.*, (48). Thio-barbituric acid-reactive substances (TBARS) era determinato secondo Ke et al., (62). In ogni tempo le analisi erano eseguite su tre campioni.

Analisi statistica

I valori dei diversi parametri erano confrontati attraverso l'Analisi della Varianza a una Via. Le medie erano poi confrontate utilizzando il Tukey's honest significant test tramite lo Statistical Graphics software package.

Analisi sensoriale

L'analisi era eseguita da 20 assaggiatori non professionisti. Dieci campioni addizionali [a] e [c] erano valutati da assaggiatori a cui era chiesto di valutare l'influenza dello starter LAB sulle caratteristiche organolettiche e sensoriali dei prodotti. L'analisi sensoriale era basata sul triangle test (UNI EN ISO 10399, triangle test, 52). In breve: a 20 assaggiatori non-professionisti erano presentati 3 prodotti, due dei quali erano identici. La scelta di assaggiatori non professionisti è risultata obbligatoria perché essi rappresentano i tipici consumatori, a cui viene chiesto se capiscono le differenze e chi le trova deve spiegare quali: ad esempio il colore, la consistenza, il *bouquet*, il sapore, l'odore.

Risultati e discussione

Monitoraggio di *L. monocytogenes* in prodotti ittici affumicati

Listeria monocytogenes è un microrganismo ubiquitario, che può essere trovato in molti alimenti, come vegetali, prodotti carnei, ittici e lattiero-caseari (1,18,75,76,87), dove può crescere indipendentemente dalla tipologia di confezionamento (9,19,33-36,100,104). In questo lavoro abbiamo focalizzato la sua ricerca in prodotti ittici affumicati quali salmoni, trote e branzini. La **Tab. 1** riporta i dati ottenuti. Come si osserva l'indagine ha evidenziato la sua presenza nel 2,4 % di tutti i 420 campioni analizzati. Tuttavia, considerando i singoli prodotti, *L. monocytogenes* è stata isolata nel 6 % dei campioni di salmone affumicato e nel 2% dei filetti di branzini affumicati (nuovo prodotto). Viceversa non è stata mai isolata da trote affumicate.

L. monocytogenes è stata quasi sempre determinata a livello di presenza in 25 g. Solo in un caso, rappresentato da una confezione di salmone affumicato, la sua presenza era a livello di 40 UFC/g (**Tab. 2**). Tali percentuali e concentrazioni sono nettamente inferiori a quelle determinate da altri au-

Tabella 2: Concentrazione di *L. monocytogenes* in prodotti ittici affumicati.

Range	Salmone	Trota	Branzini
Presenza /25 g	5	0	4
1-100 UFC/g	1*	0	0
100-1000 UFC/g	0	0	0
N. positivi	6	0	5

Legenda: * 40 UFC/g

Tabella 3: Sierotipi di *L. monocytogenes* in prodotti ittici affumicati.

Sierotipi	Salmone	Trota	Branzini
1/2a	0	0	2
1/2b	3	0	3
1/2c	20	0	10
4b	7	0	5
Totale	30	0	20

tori (26,27,38,63,77,98). In particolare, Miettinen et al. (78) hanno evidenziato la presenza di *L. monocytogenes* a livello di 1.9×10^5 UFC/g in pesci affumicati responsabili di gastroenteriti. Tuttavia, sembra che in salmone affumicato siano sufficienti concentrazioni di 45 UFC/g per scatenare listeriosi in individui a rischio (76). La presenza di una bassa carica nei campioni esaminati potrebbe essere dovuta al breve tempo intercorso tra la produzione e l'analisi. Infatti, tutti i campioni sono stati analizzati entro 15-20 giorni dalla produzione e a 40-45 giorni dalla scadenza. Johansson et al. (58), infatti, hanno segnalato risultati completamente diversi, avendo osservato che *L. monocytogenes* fosse presente fino al 20% di pro-

dotti ittici affumicati RTE reperiti in Finlandia, e che la sua concentrazione fosse quasi sempre > 100 UFC/g.

Le cinquanta *L. monocytogenes* isolate sono state sierotipizzate usando sieri del commercio. Come si osserva in **Tab. 3**, trenta ceppi appartenevano al sierotipo 1/2c, 12 al sierotipo 4 b, 6 al sierotipo 1/2b e 2 al sierotipo 1/2a. I sierotipi osservati rientrano nel 95% dei ceppi isolati da alimenti e pazienti affetti da listeriosi. Infatti negli anni, in diversi alimenti è stata osservata una netta prevalenza dei sierotipi 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b (22,29). Tuttavia, a differenza di quanto osservato dai suddetti autori, si nota una dominanza del sierotipo 1/2c; sierotipo che viene considerato poco virulento. Infatti, dalla letteratura emerge che i ceppi maggiormente diffusi e implicati nel 90% delle listeriosi da prodotti ittici affumicati appartengono ai sierotipi 1/2a, 1/2b e 4b (22,29). Del resto, la suddivisione dei sierotipi di *L. monocytogenes* in base al suo livello di virulenza ha determinato l'identificazione di 4 linee (lignaggi) evolu-

Tabella 1: Presenza di *L. monocytogenes* in prodotti ittici affumicati.

Prodotto	N. campioni	N. positivi/%	N. <i>L. monocytogenes</i> isolate
Salmone	100	6/6	30
Trota	120	0/0	0
Branzini*	200	4/2	20
Totale	420	10/2,4	50

Legenda: *reperiti in azienda

tive (I, II, III e IV) con nicchie ecologiche differenti ma sovrapposte (29,81).

La maggior parte degli isolati di *L. monocytogenes* sembra appartenere alle linee I e II, che ospitano i sierotipi più comunemente associati a casi clinici umani, inclusi il sierotipo 1/2a (linea II) e i sierotipi 1/2b e 4b (linea I). I ceppi della linea II sono comuni negli alimenti, sembrano essere diffusi negli ambienti naturali e di allevamento e sono anche comunemente isolati da casi di listeriosi animali e casi clinici umani sporadici (22,29,78,81). Tuttavia, sembra che la maggior parte dei focolai di listeriosi umana sia associata a isolati appartenenti alla linea I (78,81). Inoltre, numerosi studi indicano che, in molti Paesi, i ceppi della linea I sono più presenti tra gli isolati umani, rispetto ai ceppi della linea II. I ceppi della linea III e IV, d'altra parte, sono rari e prevalentemente isolati da fonti animali.

In base a quanto riportato e all'appartenenza dei sierotipi alle diverse linee/gruppi, si può concludere che la maggioranza dei ceppi isolati appartiene al sierotipo 1/2c considerato poco virulento rispetto ai sierotipi 1/2a, 1/2b

e 4b, ritenuti più diffusi e virulenti (22,29,81).

Infine, dall'analisi microbiologica emerge che i coliformi totali e fecali, *Staphylococci* coagulasi positivi e clostridi solfito riduttori non sono mai stati quantificati (< 5 UFC/g) e *Salmonella* spp. è risultata sempre assente in 25 g.

Evoluzione di *L. monocytogenes* intenzionalmente inoculata in branzini affumicati

L'analisi microbiologica ha permesso di constatare che lo starter LAK-23 addizionato intenzionalmente ai campioni di branzino affumicato è cresciuto in modo consistente nel tempo, influenzando in negativo la crescita di *L. monocytogenes* inoculata.

I grafici 1-4 evidenziano gli andamenti della Conta Batterica Totale (CBT), dei batteri lattici (LAB) naturalmente presenti o intenzionalmente inoculati (LAK-23, Sacco) e di *L. monocytogenes*. Vengono sempre riportate le medie con le relative deviazioni standard.

Il **Grafico 1** evidenzia l'andamento delle popolazioni microbiche naturali di filetti di branzini

no affumicato conservato a 6°-7°C fino a fine *shelf-life* a 60 giorni. Come si osserva, sia la CBT che i LAB "autoctoni" dei branzini affumicati crescono nel tempo e raggiungono rispettivamente valori finali di circa 5 log UFC/g e di 6 log UFC/g. È probabile che lo sviluppo sia dovuto all'uso continuo di temperature di abuso termico (6°-7°C), considerando che la temperatura appropriata e obbligatoria deve essere di 4°C, come riportato in etichetta. Dai dati emerge che i campioni non erano contaminati naturalmente da *Listeria* spp. o *L. monocytogenes*; infatti, nonostante l'impiego della tecnica basata sulla coltura di arricchimento, non è stato possibile individuare la loro presenza in 25 g.

Il **Grafico 2** evidenzia l'evoluzione della popolazione microbica di filetti di branzino affumicati a freddo e intenzionalmente inoculati con lo starter LAK-23 e *L. monocytogenes* e conservati a temperatura di 6-7°C fino a fine *shelf-life*. Come si osserva, il coinoculo Starter/*L. monocytogenes* ha evidenziato lo sviluppo dello starter e la netta inibizione delle listerie inoculate. Infatti la concentrazione del mix di *L. monocytogenes* è rimasta pressoché costante nel tempo, anche se a 30 e 45 giorni si nota un leggero calo, che tuttavia non appare significativo considerando l'ampia deviazione standard ($p>0,05$). Viceversa nei campioni in cui non è stato inoculato lo starter (**Grafico 3**), il mix di *L. monocytogenes* è cresciuto ed ha raggiunto valori finali leggermente inferiori a 6 log UFC/g; valori pericolosi per il consumatore, considerando che i filetti di branzino affumicato a freddo così come tutti i prodotti ittici affumicati sono dei Re-

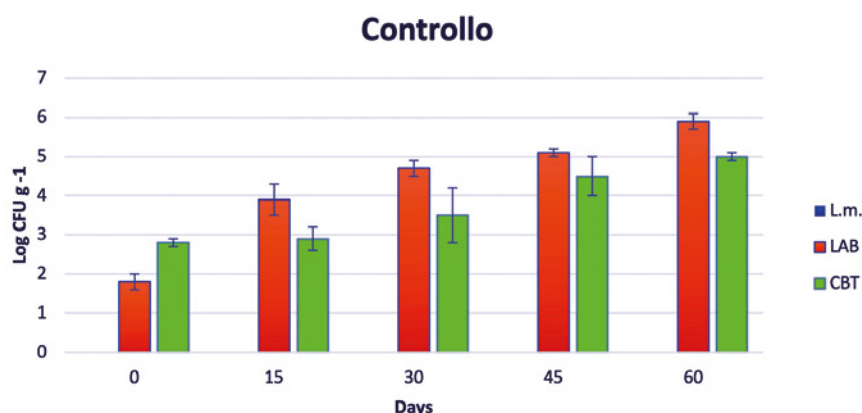


Grafico 1 - Evoluzione Batteri lattici (LAB), Conta batterica totale (CBT) e *L. monocytogenes* (L.m.) in branzini affumicati a freddo.

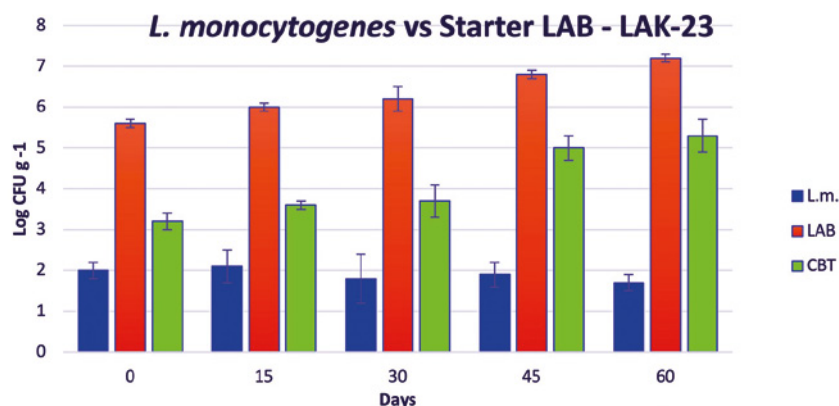


Grafico 2 - Evoluzione Batteri lattici (LAB), Conta batterica totale (CBT) e *L. monocytogenes* (L.m.) in branzini affumicati a freddo intenzionalmente inoculati con starter LAK-23 e *L. monocytogenes*.

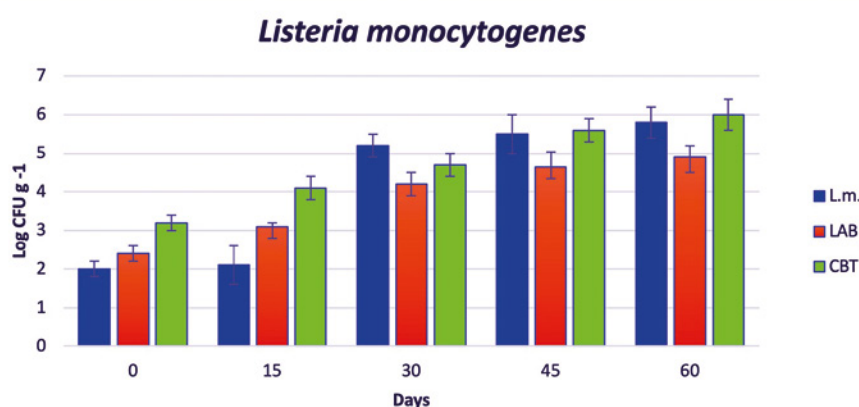


Grafico 3 - Evoluzione Batteri lattici (LAB), Conta batterica totale (CBT) e *L. monocytogenes* (L.m.) in branzini affumicati a freddo inoculati con *L. monocytogenes*.

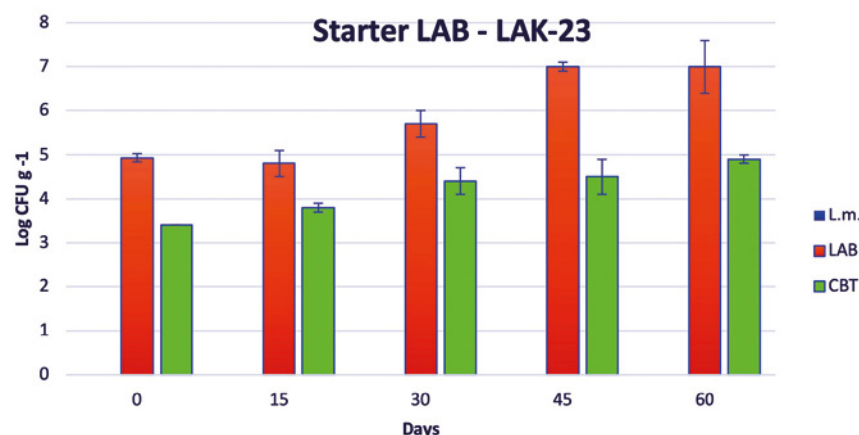


Grafico 4 - Evoluzione Batteri lattici (LAB), Conta batterica totale (CBT) e *L. monocytogenes* (L.m.) in branzini affumicati a freddo intenzionalmente inoculati con Starter LAK-23.

ady to Eat, e quindi non subiscono alcun trattamento termico prima del consumo.

Pertanto lo starter utilizzato è risultato efficace e sebbene non abbia ridotto o eliminato completamente i ceppi di *L. monocytogenes* inoculati, ne ha comunque impedito la crescita.

I campioni inoculati con il solo starter hanno supportato un'abbondante crescita dello stesso, che ha raggiunto valori medi di poco inferiori a 7 log UFC/g (Grafico 4). Tali valori corrispondono a quelli osservati nei campioni coinoculati starter/listeria (Grafico 2). In questo caso a differenza di quanto osservato in un precedente lavoro in cui il substrato era costituito da cubetti di pro-

Tabella 4: Evoluzione del pH in branzini affumicati a freddo addizionati* e non di starter.

Giorni	pH	pH*
0	6,0 ± 0,10a	6,0 ± 0,10a
15	5,8 ± 0,10a	5,8 ± 0,02a
30	5,9 ± 0,10a	5,9 ± 0,01a
45	5,8 ± 0,10a	5,7 ± 0,07a
60	5,9 ± 0,10a	5,8 ± 0,08a

I dati rappresentano le medie ± le deviazioni standard dei campioni totali; Le medie con le stesse lettere, considerando ogni singolo parametro, non sono significativamente diversi ($p < 0,05$).

sciutto cotto, la presenza della *Listeria* non ha stimolato l'attività dello starter (49). Lo sviluppo dello starter sia aggiunto come coltura singola che in mix con *Listeria* è confermato dall'andamento del pH. Infatti, nel tempo si è osservato che da un valore iniziale di circa 6,0 unità, il pH è diminuito e ha raggiunto valori pari a 5,8-5,9 unità (Tab. 4).

La CBT è cresciuta in tutti i campioni sia inoculati che non inoculati con i microrganismi test.

Infatti, nei campioni privi di ogni inoculo ha raggiunto valori finali pari a 5 log UFC/g (Grafico1). In questo caso si è osservata anche una crescita di LAB naturali, che hanno raggiunto a fine *shelf-life* valori di 6 log UFC/g. Nei campioni addizionati di coinoculi *Listeria*/LAK-23 e con il solo starter LAK-23, la CBT è cresciuta e ha raggiunto valori di poco superiori ai 5 log UFC/g (Grafico 2 e 4). Viceversa, nei campioni inoculati con solo *L. monocytogenes*, la CBT ha raggiunto valori attorno ai 6,0 log/UFC g; valori simili a quelli raggiunti dai LAB naturalmente presenti.

Dalle piastre di MRS utilizzate per determinare i LAB nei campioni inoculati con il solo starter LAK-23 o il mix starter/*Listeria monocytogenes*, sono state prelevate circa 3 colonie, che sono state identificate attraverso metodi tradizionali (dati non mostrati). I risultati hanno evidenziato che tali colonie appartenevano allo starter inoculato.

Diversi studi hanno dimostrato il ruolo dei LAB e delle batteriocine da loro sintetizzate per inibire *L. monocytogenes* in prodotti ittici affumicati (*Lactobacillus*, *Carnobacterium* e *Enterococcus*) in salmone affumicato a freddo (23,69,70,79,84,89,99,105). Tuttavia l'uso delle batteriocine come nisina e sakacina P è risultato efficace solo a breve termine contro *L. monocytogenes*, e conseguentemente è stato suggerito l'impiego diretto di starter produttori di batteriocine o l'aggiunta di altri antimicrobici quali acidi organici o oli essenziali (98,99,104). Infatti, l'applicazione della nisina ha mostrato un effetto listeristatico nella trota iridea affumicata a freddo solo fino a 3 giorni (80). Tuttavia, combinando nisina e lat-

tato, la conta di *L. monocytogenes* è stata ridotta di 2 log dopo 17 giorni di conservazione (80). In un altro studio, l'uso di sakacin P e *L. sakei* Lb790 ha determinato una riduzione di 2 log nella conta di *L. monocytogenes* dopo 28 giorni (61). Questi studi indicano che i potenziali effetti sinergici della combinazione di batteriocine con altri ostacoli possono prolungare la durata dell'inibizione.

Tuttavia, migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando direttamente starter bioprotettivi come dimostrato da Aymerich *et al.* (3). Questi hanno valutato tre potenziali ceppi batterici contro *L. monocytogenes* in salmoni affumicati con diverse caratteristiche fisico-chimiche (concentrazione del grasso, umidità e acido acetico). Tra i ceppi utilizzati due erano produttori di batteriocine ed erano stati isolati direttamente da salmone affumicato e identificati come *Lactobacillus curvatus* e *Carnobacterium maltaromaticum*, mentre il terzo era di origine carnea identificato come *Lactobacillus sakei* CTC494, anch'esso produttore di batteriocine. I dati hanno dimostrato che *L. sakei* CTC494 ha inibito la crescita di *L. monocytogenes* dopo 21 giorni di conservazione a 8°C in tutti i prodotti testati, mentre *L. curvatus* CTC1742 ha limitato solo la crescita del patogeno (aumento < 2 log). L'efficacia di *C. maltaromaticum* CTC1741 è dipesa dal tipo di prodotto. Infatti, ha limitato la crescita dell'agente patogeno in un solo tipo di salmone affumicato. Tali risultati suggeriscono che *L. sakei* CTC494, pur essendo stato isolato dalla carne, può essere potenzialmente utilizzato come coltura bioprotettiva per migliorare la sicurezza alimentare del salmone affumicato a freddo.

Di conseguenza i dati ottenuti in questa ricerca, basata sull'utilizzo di *L. sakei* LAK23, hanno confermato quanto ottenuto da Aymeric *et al.* (3).

Caratteristiche chimico-fisiche dei filetti di branzino affumicati a freddo

Nelle Tab. 4 vengono riportati gli andamenti del pH dei campioni conservati a 6°-7°C fino a fine *shelf-life* (60 giorni). Come si osserva, il pH nel tempo non subisce grandi variazioni, indipendentemente dall'aggiunta o meno dello starter. Infatti, da valori di pH 6,0 si osserva un leggero decremento che in un caso scende sino a 5,9 unità, mentre nei campioni addizionati dello starter lattico (LAK-23) il valore scende a 5,8 unità. Tuttavia, considerata la deviazione standard, la differenza non risulta significativa ($p>0,05$). Pertanto, nonostante lo sviluppo dello starter aggiunto, il decremento del pH è stato solo di 0,1 unità.

La Tab. 5 riporta alcuni parametri valutati ai fini di determinare l'influenza dello starter aggiunto nei campioni di branzino affumicato a freddo. L'Aw durante tutto questo periodo di analisi si è mantenuta all'interno del range 0,970 e 0,971. Infatti, in tutti i campioni conservati a 6°-7°C non si osserva alcuna differenza significativa nel tempo ($p>0,05$).

Si pensa comunque che le piccole differenze di Aw osservate nei vari punti di campionamento dipendano probabilmente dalla variabilità dei campioni e non siano correlate a una reale perdita d'acqua. L'umidità è rimasta abbastanza costante nel tem-

Tabella 5: Caratteristiche chimico-fisiche di branzini affumicati a freddo addizionati* e non di starter

Parametro	Giorni			
	0	0*	60	60*
% Umidità	59,21 ± 0,15 ^a	60,51 ± 0,44 ^b	61,88 ± 0,51 ^b	61,31 ± 0,25 ^b
% NaCl	3,3 ± 0,11 ^a	3,2 ± 0,60 ^a	3,0 ± 0,21 ^a	3,1 ± 0,11 ^a
Aw	0,970 ± 0,002 ^a	0,970 ± 0,001 ^a	0,971 ± 0,009 ^a	0,971 ± 0,002 ^a
% WPS	5,2 ± 0,03 ^b	5,0 ± 0,11 ^a	4,1 ± 0,5 ^c	4,8 ± 0,18 ^d
TVB-N mg N/100 g	30,2 ± 0,11 ^a	33,05 ± 1,00 ^b	35,50 ± 0,28 ^c	35,00 ± 0,28 ^c
TBARS nmol/g	5,5 ± 0,2 ^a	6,1 ± 0,2 ^b	6,6 ± 0,3 ^c	6,4 ± 0,5 ^c

Legenda: WPS: Water Salt Phase; TVB-N: Azoto basico volatile totale; TBARS: Sostanze che reagiscono con l'acido tiobarbiturico. I dati rappresentano le medie ± le deviazioni standard dei campioni totali; Le medie con le stesse lettere, considerando ogni singolo parametro, non sono significativamente diversi ($p < 0,05$).

po. Infatti si attesta a valori compresi tra 59,21% e 61,88% e tali differenze dipendono dal diverso campione analizzato, più che a un effetto dovuto all'assorbimento o a perdita di umidità.

Per quanto riguarda il contenuto di sale e la WPS, la letteratura sottolinea l'importanza di considerare un valore di WPS del 3,5% come valore minimo in grado di impedire la crescita di *Clostridium botulinum* tipo E, psicrotrofo, a temperature di conservazione inferiori a 4,4°C [15]. In questo studio, i valori di sale e WPS variavano durante il periodo di conservazione senza mostrare una tendenza specifica, indicando che le differenze osservate dipendono solo dalla variabilità dei campioni. Il contenuto di sale è stato influenzato dalla variabilità dei campioni e dalla procedura di salatura; per questi motivi la diminuzione osservata non può essere considerata un trend ma un'eterogeneità casuale dei campioni. I valori di WPS osservati, strettamente correlati alla percentuale di sale presente, variavano da 4,1 al 5,2% (Tab. 5). Tali valori soddisfano ampiamente i limiti posti dal CFSAN [15] che indi-

ca come debbano devono essere superiori o uguali a 3,5%.

Del resto dalla letteratura emerge che un prodotto ittico affumicato deve assicurare la sua salubrità durante tutto il tempo di conservazione e fino al momento del consumo. In questo frangente un valore di WPS superiore a 3,5% assicura l'inibizione della germinazione delle spore di *Clostridium botulinum* psicrotrofo. Bernardi et al., [6,7] hanno riportato valori WPS in salmone affumicato in Italia pari al 4,93%, mentre nei prodotti francesi le medie erano inferiori ma ancora intorno al 4% [24,45]. È probabile che l'alto valore di WPS possa aver influito sulla crescita di CBT e LAB nei campioni di branzino affumicato testati. Infatti, tali valori sono nettamente inferiori a quelli osservati da Bernardi et al. [6] in salmoni affumicati con WPS inferiori o uguali al 3,5%.

I valori di TBARS (rancidità) non sono aumentati (Tab. 5) e sono rimasti a livello massimo di 6,6 nmol/g alla fine della conservazione (60 giorni). Tuttavia nel tempo si è osservato un incremento di tale parametro. Infatti, a 0 giorni i valori di TBARS erano

a livello di 5,5 e 6,1 nmol/g, poi sono cresciuti sensibilmente raggiungendo livelli di 6,4-6,6 nmol/g ($p > 0,05$). Secondo diversi autori [16,62], i prodotti alimentari non risultano rancidi quando i valori di TBARS sono < 8 nmol/g di campione, leggermente rancidi quando il TBARS è compreso tra 9-20 nmol/g, e rancidi e inaccettabili quando il TBARS è > 21 nmol/g.

Di conseguenza tutti i campioni di branzino affumicato a freddo devono essere considerati accettabili, considerato il basso valore del TBARS. Del resto anche gli assaggiatori del panel non hanno percepito sentori di rancidità.

I valori medi di TVB-N (Tab. 5) sono ampiamente accettabili in quanto rientrano nei parametri standard dei prodotti ittici affumicati, anche se le autorità cileni [95] hanno stabilito un limite di 30 mg N/100 g per il salmone affumicato a freddo. Considerati i dati della letteratura, un valore così basso sembrerebbe irraggiungibile [12].

Infatti, i branzini affumicati presentavano valori medi di TVB-N a livello di 30,2 e 33,05 mg N/100 g subito dopo il confezionamento. A fine conservazione il TVB-N incrementava fino a livelli di 35,50 e 35,00 mg N/100 g. Effettivamente nel tempo si è osservato un loro incremento significativo, che però è risultato limitato a 3-5 mg N/100 g.

Le concentrazioni finali del TVB-N, essendo prossimi a 35 mg N/100g, sono nettamente inferiori ai valori massimi (40 mg N/100 g) proposti da Cantoni et al. [13] per il salmone affumicato. In ogni caso i dati riguardanti il TVB-N sono diversi da quelli osservati da Bernardi et al., [6],

che in salmoni affumicati italiani hanno osservato a fine *shelf-life* concentrazioni medie di TVB-N pari a 49,8 mg N/100 g. A onor del vero occorre ammettere che gli stessi autori hanno evidenziato valori di TVB-N iniziali di circa 38,2 mg N/100 g; concentrazioni nettamente superiori a quelli osservati a tempo 0 nei filetti di branzino affumicato. Anche Leroi *et al.* (68,70) osservarono valori di TVB-N pari a 52,8 mg N/100 g; valori nettamente superiori a quelli osservati in questa sede.

Analisi sensoriale dei filetti di branzino affumicati a freddo

L'accettabilità sensoriale dei campioni addizionati o meno di starter è stata determinata dal test triangolare. La giuria era composta da 20 valutatori non professionisti. Tutti non hanno percepito alcuna differenza sensoriale tra i campioni addizionati e non di starter LAK-23. Infatti, i 2 campioni valutati non sono stati riconosciuti diversi. Dal confronto dei campioni oggetto dell'analisi è emerso che appartenevano ad unico campione. Pertanto lo starter non ha modificato profondamente le caratteristiche sensoriali del prodotto a cui è stato addizionato. Infatti, i filetti di branzino affumicato a freddo inoculati con la coltura bioprotettiva non hanno presentato odori e sapori tipici del deterioramento, patine bianche o viscosi, *slime*, decolorazioni o imbrunimenti. Lo stesso dicasi per i campioni non trattati (controllo). Il panel non ha individuato alcuna differenza del colore in tutti i campioni indipendentemente dalla presenza o meno dello starter.

Conclusioni

Dai risultati ottenuti si conferma che *L. monocytogenes* può essere isolata da prodotti ittici affumicati a freddo. Tali prodotti sono caratterizzati da una composizione chimico-fisica in grado di supportarne la crescita. Infatti, presentano un valore di pH superiore a 5,8 unità, un valore di Aw superiore o uguale a 0,97 e un valore di umidità pari al 59-60%. Solitamente la contaminazione iniziale, derivante dalla materia prima, dall'uomo e dall'ambiente di trasformazione, è limitata a poche cellule per g di prodotto.

La tecnologia di trasformazione basata sulla salatura, sull'affumicamento a freddo, sul confezionamento in sottovuoto e sulla refrigerazione non è in grado di eliminare il pericolo rappresentato da *L. monocytogenes*.

Dai risultati ottenuti si evince che i valori di Aw dei branzini affumicati a freddo non sono mai inferiori a 0,98 e il pH non scende al di sotto delle 5,0 unità. Di conseguenza può supportare la crescita di *L. monocytogenes*. Per ovviare a ciò suggeriamo l'impiego di starter bioprotettivi.

I LAB, contenuti nello starter aggiunto, sono cresciuti per tutto il periodo di conservazione ed hanno prodotto una lieve diminuzione della concentrazione del patogeno. Infatti, in tutte le prove eseguite in cui la coltura bioprotettiva LAK-23 è stata aggiunta, non c'è stato alcun incremento del numero di colonie di *L. monocytogenes*; al limite la sua concentrazione si è mantenuta costante. Si conclude che l'uso di colture starter e/o bioprotettive per la preparazione di branzini

affumicati a freddo possa contribuire a impedirne la crescita.

Pertanto, alla luce dei dati ottenuti e nonostante il prodotto considerato non abbia un $pH \leq 4,4$ o $Aw \leq 0,92$ o $pH \leq 5,0$ e $Aw \leq 0,94$, come cita il Regolamento CE 2073/2005 (51) al quale facciamo riferimento, possiamo scientificamente affermare che i branzini affumicati a freddo addizionati di starter bioprotettivi non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*. Conseguentemente tali prodotti potrebbero agevolmente rientrare nella categoria 1.3 (Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes* diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali), dove è ammessa una concentrazione massima di *L. monocytogenes* di 100 UFC/g.

Infine l'uso degli starter non ha modificato la qualità sensoriale dei branzini affumicati a freddo a cui sono stati aggiunti.

Bibliografia

1. A.A.V.V. (1996) ICMSF, Microorganisms in foods 5, Microbial specifications of food pathogens. pp. 141-182, Blackie & Academic & Professional, Chapman and Hall, London.
2. A.O.A.C. (1990) Official Methods of analysis of the A.O.A.C., 15th edn. A.O.A.C., Arlington, USA.
3. Aymerich T., Rodríguez M., Garriga M., Bover-Cid S. (2019) Assessment of the bioprotective potential of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 8°C. Food Microbiol. 83, 64-70.
4. Autio T., S. Hielm S., Miettinen M., Sjöberg A.M., Aarnisalo K., Björkroth J., Mattila-Sandholm T., Korkeala H. (1999) Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a

- cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 150-155.
5. Baross J., Liston J. (1970) Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and related haemolytic vibrios in marine environments of Washington State. *Appl. Microbiol.* 20, 179-186.
 6. Bernardi C., Ripamonti B., Campagnoli A., Stella S., Cattaneo P. (2009) *Shelf-life* of vacuum packed Alaskan, Scottish and Norwegian cold-smoked salmon available on the Italian market. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 2538-2546.
 7. Bernardi C., Ripamonti B., Marzano M.A., Cattaneo P. (2011) Aspetti critici nella produzione di ritagli di salmone affumicato. *A.I.V.I online Giugno*, 1 (0). 145-148.
 8. Boerlin, P., Piffaretti, J.C. (1991) Typing of human, animal, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1624-1629.
 9. Brett M.S.Y., Short P., McLauchlin J. (1998) A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 223-229.
 10. Brosch R., Brett M., Catimel B., Luchansky J.B., Ojienyi B., Rocourt J. (1996) Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Int. J. Food Microbiol.* 32, 343-355.
 11. Bruce J.L., Hubner R.J., Cole E.M., McDowell C.I., Webster J.A. (1995) Sets of EcoRI fragments containing ribosomal RNA sequences are conserved among different strains of *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5229-5233.
 12. Buchrieser C., Brosch R., Catimel B., Rocourt J. (1993) Pulsed-field gel electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. *Can. J. Microbiol.* 39, 395-401.
 13. Cantoni C., Moret S., Comi G. (1993) Bacteriological and chemical indices to evaluate smoked salmon quality. *Ind. Alim.* XXXII (September), 842-845.
 14. Cardinal M., Gunnlaugsdottir H., Bjoernevik M., Ouisse A., Vallet J. L., Leroi F. (2004) Sensory characteristics of cold-smoked Atlantic Salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical, and microbiological measurements. *Food Res. Int.* 37, 181-193.
 15. Centre for Food Safety and Applied Nutrition 2001. Processing parameters needed to control pathogens in cold smoked fish. U.S. Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/resaarchArea/SafePracticesforFoodProcesses/uc m092182.htm>.
 16. Che Man Y.B., Ramadas J. (1998) Effect of packaging environment on quality changes of smoked Spanish mackerel under refrigeration. *J. Food Quality* 21, 167-174.
 17. Civera B., Parisi E., Amerio G.P., Giaccone V. (1995) *Shelf-life* of vacuum packed smoked salmon: microbiological and chemical changes during storage. *Archives fur Lebensmittelhygiene*, 46, 1-24.
 18. Çoban O.E., Patir B., Özpolat E., Kuzgun N.K. (2016) Improving the quality of fresh rainbow trout by sage essential oil and packaging treatments. *J. Food Safety* 36, 299-307.
 19. Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Cantoni C., Comi G. (2003) Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Appl Environ Microbiol.* 68 (12), 6273-6282.
 20. Codex Alimentarius Commission (2002) "Proposed Draft Guidelines for the Control of *Listeria monocytogenes* in food" CX/FH03/8 October.
 - Comi, G. (2016) Meat and Fish spoilage. In Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., The microbial quality of food. Woodhead publishing, Elsevier.
 21. Comi G. (2016) Meat and Fish spoilage. In Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., The microbial quality of food. Woodhead publishing, Elsevier.
 22. Comi G., Frigerio R., Cantoni C. (1992) *Listeria monocytogenes* serotypes in Italian meat products. *Lett. Appl. Microbiol.* 15, 168-171.
 23. Concha-Meyer A., Schöbitz R., Brito C., Fuentes R. (2011) Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Contr.* 22, 485-489.
 24. Cornu M., Beaufort A., Rudelle S., Laloux L., Bergis H., Miconnet N., Serot T., Delignette Muller M.L. (2006) Effect of temperature, water-phase salt and phenolic contents on *Listeria monocytogenes* growth rates on cold-smoked salmon and evaluation of secondary models. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 159-168.
 25. Dalton C.B., Austin C.C., Sobel J., Hayes P.S., Bibb W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Proctor, M.E., Griffin, P.M. (1997) An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.* 336, 100-105.
 26. Dass S.C., Abu-Ghannam N., Antony-Babu S., Cummins E.J. (2010) Ecology and molecular typing of *L. monocytogenes* in a processing plant for cold-smoked salmon in the Republic of Ireland. *Food Res Int.* 43, 1529-36.
 27. Dass S.C., Cummins E.J., Abu-Ghannam N. (2011) Prevalence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed cold-smoked salmon in the Republic of Ireland. *J. Food Safety* 31, 21-7.
 28. Dondero M., Cisternas F., Carvajal L., Simpson R. (2004) Change in quality of vacuum-packed cold-smoked salmon (*Salmo salar*) as a function of storage temperature. *Food Chem.* 87, 543-550.
 29. Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P. (2004) Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42 (8), 3819-3822.
 30. Duffes F. (1999) Improving the control of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 211-216.
 31. Ericsson H., Eklöw A., Danielsson-Tham M.L., Loncarevic S., Mentzing L.O., Persson I., Unnerstad H., Tham. W. (1997) An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2904-2907.
 32. Etemadi H., Rezaei M., Abedian Kenari A.M., Hosseini S.F. (2013) Combined effect of vacuum packaging and sodium acetate dip treatment on shelf life extension of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during refrigerated storage. *J. Agric. Sci. Technol.* 15, 929-939.

33. Fang W.N.G., Langlois B.E., Moody W.G. (1997) Fate of pathogens in Vacuum-packaged dry-cured (Country style) ham slices stored at 2 and 25°C. *J. Food Protect.* 60 (12), 1541-1547.
34. Farber J.M., Peterkin P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55, 476-511.
35. Farber J.M., Harwing J. (1996) The Canadian position on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Food Control* 7 (4/5), 253-258.
36. Fleming D.W., Cochi S.L., MacDonald K.L., Brondum J., Hayes P.S., Plikaytis B.D., Holmes M.D., Audurier A., Broome C.V., Reingold A.L. (1985) Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* 312, 404-407.
37. Fletcher G.C., Bremer P.J., Summers G., Osborne C. (2003) Guidelines for the safe preparation of hot-smoked seafood in New Zealand [online]. New Zealand Institute for Crop and Food research Limited. <http://www.crop.cri.nz/home/research/marine/pathogens/hot-smoked.pdf> [Ziyaret Tarihi Ekim 6, 2009].
38. Garrido V., Vitas A.I., Garçia Jalon I. (2009) Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. *Food Control* 20, 986-91.
39. Giménez B., Dalgaard P. (2004) Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organism in cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 96, 96-109. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02137.x
40. González-Rodríguez M.N., Sanz J.J., Santos J.Á., Otero A., & García-López M.L. 2002. Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *Int. J. Food Microbiol.* 77, 161-168.
41. Gram L. 1991. Inhibition of mesophilic spoilage *Aeromonas* spp. On fish by salt, potassium sorbate, liquid smoke, and chilling. *Journal of Food Protection*, 54: 436-442.
42. Graves L.M., Swaminathan M.B. (2001) PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 65, 55-62.
43. Guyer S., Jemmi T. (1991) Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1523-1527.
44. Heitmann M., Gerner-Smidt P., Heltberg O. (1997) Gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in a private day-care facility. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16, 827-828.
45. Hespe M., Kiessling A., Lunestad B.T., Torrissen O.J., Bencze Røra A.M. (2004) Quality of cold-smoked collected in one French Hypermarket during a periode of 1 year. *L.W.T.* 37, 617-638.
46. Hoffman A.D., Gall K.L., Wiedmann M. (2003) Microbial safety of minimally processed seafood with respect to *Listeria monocytogenes*. In *Microbial Safety of Minimally Processed Foods* (J.S. Novak, G.M. Sapers and V.K. Juneja, eds.) p. 59, CRC Press, Boca Raton, FL. 1-58716-041-2.
47. Huss H.H. (1980) Distribution of *Clostridium botulinum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 764-769.
48. Huss H.H., Dalgaard P., Gram L. (1997) Microbiology of fish and fish products. In *Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality*. Edited by J. B. Luten, T. Borresen & J. Oehlenschläger. Amsterdam, (NL): Elsevier Science B.V. pp. 413-430.
49. Iacumin L., Bortolussi N., Gasparetto M., Dal Bello F., Pozzo A., Ottaviani S., Comi G. (2020) Bioprotective effects of Lactic acid bacteria versus *Listeria monocytogenes* intentionally inoculated in cooked ham cubes packaged in MAP and stored at different temperatures. *Ind. Alim.*, LIX, Febbraio, 5-19.
50. Iacumin L., Tirloni E., Manzano M., Comi G. (2017) Shelf-Life Evaluation of Sliced Cold-Smoked Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Under Vacuum (UV) and Modified Atmosphere Packaging (MAP). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 17:1279-1285(2017) DOI: 10.4194/1303-2712-v17_
51. ISO 11290-1:1996 Adm.1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Listeria monocytogenes*.
52. ISO 4120:2004. Triangle test methodology. Standard test method for sensory analysis — General guidance for the design of test rooms.
53. ISO 6579-1: 2002 Cor.1:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
54. Jaffrès E., Sohler D., Leroi F., Pilet M.F., Prévost H., Joffraud J.J., Dousset X. (2008) Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 20-29.
55. Jeyasekaran G., Ganesan P., Anandaraj R., Shakila R.J., Sukumat D. (2006) Quantitative and qualitative studies on the bacteriological quality of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) stored in dry ice. *Food Microbiol.* 23(6), 526-533.
56. Joffraud J.J., Cardinal M., Cornet J., Chasles J.S., Léon S., Gigout F., Leroi F. (2006) Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 112, 51- 61.
57. Joffraud J.J., Leroi F., Roy C., Berdagué J.L. (2001) Characterization of volatile compounds produced by bacteria isolated from spoilage flora of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 175-184.
58. Johansson T., Rantala L., Palmu L., Honkanen-Bulzalsk T. (1999) Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 111-119.
59. Jorgensen B.R., Huss H.H. (1989) Growth and activity of *Shevanelia putrefaciens* isolated from spoiling fish. *Int. J. Food Microbiol.* 9, 51-62.
60. Karim P., Embarek B. (1994) Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 17-34.
61. Katla T., Møretørst T., Aasen I.M., Holck A., Axelsson L., Naterstad K. (2001) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiol.* 18 (4), 431-439.
62. Ke P.Y., Cervantes E., Robles-Martinez C. (1984) Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in fish tissue by an

- improved distillation spectrophotometer method. *J. Sci. Food Agric.* 35, 1248-1254.
63. Kramarenko T., Roasto M., Meremäe K., Kuningas M., Pölsama P., Elias T. (2013) *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control* 30, 24-29.
 64. Lannelongue M., Hanna M.O., Finne G., Nickelson R., Vanderzant C. (1982) Storage characteristics of finfish fillets (*Archosagus probatocephalus*) packaged in modified gas atmosphere containing carbon dioxide. *J. Food Protect.* 45, 440-444.
 65. Laursen B.G., Bay L., Cleenwerck L., Vancanneyt M., Swings J., Dalgaard P., Leisner J.J. (2005) *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromicum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 151-164.
 66. Leroi F. (2010) Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiol.* 27, 698-709.
 67. Leroi F., Joffraud J.J. (2000) Salt and smoke simultaneously affect chemical and sensory quality of cold-smoked salmon during 5°C storage predicted using factorial design. *J. Food Protect.* 63, 1222-1227.
 68. Leroi F., Arbey N., Joffraud J.J., Chevalier F. (1996) Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf life of vacuum-packed cold-smoked salmon. *Int. J. Food Sci. Techn.* 31, 497-504.
 69. Leroi F., Cornet J., Chevalier F., Cardinal M., Coeuret G., Chaillou S., Joffraud J.J. (2015) Selection of bio-protective cultures for preventing cold-smoked salmon spoilage. *Int. J. Food Microbiol.* 213, 79-87.
 70. Leroi F., Joffraud J.J., Chevalier F., Cardinal M. (1998) Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 111-121.
 71. Leroi F., Joffraud J.J., Chevalier F., Cardinal M. (2001) Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological count and physico-chemical parameters. *J. Appl. Microbiol.* 90, 578-587.
 72. Linnan M.J., Mascola L., Lou X.D., Goulet V., May S., Salminen C., Hird D.H., Yonekura M.L., Hayes P., Weaver R., Audurier A., Plikaytis B.D., Fannin S.L., Kleks A., Broome C.V. (1988) Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N. Engl. J. Med.* 319, 823-828.
 73. Lyhs U., Björkroth J., Hyytiä E., Korkeala H. (1998) The spoilage flora of vacuum-packaged, sodium nitrite or potassium nitrate treated, cold-smoked rainbow trout stored at 4°C or 8°C. *Int. J. Food Microbiol.* 45, 135-142.
 74. Lyhs U., Lahtinen J., Schelvis Smith R. (2007) Microbiological quality of maatjes herring stored in air and under modified atmosphere at 4 and 10°C. *Food Microbiol.* 24, 508-516.
 75. Manzano M., Cocolin L., Cantoni C., Comi G. (1998) A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 207-212.
 76. Marozzi S., Tolli R., Bilei S., Ricci D., Rossi C., Bossù T. (2015) Two episodes of listeriosis in pregnancy and newborna: investigation, problems and considerations. *Int. J. Food Safety*, 4, 4567, 98-100.
 77. Medrala D., Dabrowski W., Czekajo-Koodziej U., Dackowska-Kozona E., Koronkiewicz A., Augustynowicz E., Manzano M. (2003) Persistence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from products in a Polish fish-processing plant over a 1-year period. *Food Microbiol* 20:715-24.
 78. Miettinen M.K., Siitonen A., Heiskanen P., Haajanen H. (1999) Molecular Epidemiology of an Outbreak of Febrile Gastroenteritis Caused by *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Rainbow Trout. *J. Clin. Microbiol.* 37 (7), 2358-2360.
 79. Nilsson L., Huss H.H., Gram L. (1997) Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 217-227.
 80. Nykänen A., Weckman K., Lapveteläinen A. (2000) Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *Int. J. Food Microbiol.* 61(1), 63-72.
 81. Orsi R.H., den Bakker H.C., Wiedmann M. (2011) *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Medical Microbiol.* 301, 79-96.
 82. Pearson D. (1973) *Laboratory Techniques in Food Analysis*. Butterworths & Co. Publishers Ltd., London, UK.
 83. Peiris W.I.P. (2005) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Master Thesis, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU).
 84. Richard C., Leroi F., Brillet A., Rachman C., Connil N., Drider D., Pilet M.F., Onno B., Dousset X., Prevost H. (2004) Control development of *Listeria monocytogenes* in smoked salmon: interest of the biopreservation by lactic bacteria. *Lait* 84, 135-144.
 85. Riedo F.X., Pinner R.W., Tosca M.L., Cartter M.L., Graves L.M., Reeves M.W., Weaver R.E., Plikaytis B.D., Broome C.V. (1994) A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. *J. Infect. Dis.* 170, 693-696.
 86. Rocourt J., Audurier A., Courtieu A.L., Durst J., Ortel S., Schretten-brunner A., Taylor A.G. (1985) A multi-centre study on the phage typing of *Listeria monocytogenes*. *Zentbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A* 259, 489-497.
 87. Ross T., Todd E., Smith M. (2000) Exposure assessment of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat-foods: Preliminary Report for Joint FAO/WHO Expert Consultation Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods, Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nation Report nr. MRA 00/02, 242.
 88. Rotariu O., Thomas D.J.I., Goodburn K.E., Hutchison M.L., Strachan N.J.C. (2014) Optimization of combinations of bactericidal and bacteriostatic treatments to control *Listeria monocytogenes* on cold smoked salmon. *Food Control* 35, 284-292.
 89. Rotariu O., Thomas D.J.I., Goodburn K.E., Hutchison M.L., Strachan N.J.C. (2014) Smoked salmon industry practices and their association with *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 35, 284-292.
 90. Rutherford T.J., Marshall D.L., Andrews L.S., Coggins P.C., Schilling M.W., Gerard P. (2007) Combined

- effect of packaging atmosphere and storage temperature on growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat shrimp. Food Microbiol. 24, 703-710.
91. Salamina G., Dalle Donne E., Niccolini A., Poda G., Cesaroni D., Bucci M., Fini R., Maldini M., Schuchat A., Swaminathan B., Bibb W., Rocourt J., Binkin N., Salmaso S. (1996) A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. Epidemiol. Infect. 117, 429-436.
 92. Samelis J., Maurogenakis F., Metaxopoulos J. (1994) Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. Int. J. Food Microbiol. 23, 179-196.
 93. Schlech W.F., Lavigne P.M., Bortolussi R.A., Allen A.C., Haldane E.V., Wort A.J., Hightower A.W., Johnson S.E., King S.H., Nicholls E.S., Broome C.V. (1983) Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. N. Engl. J. Med. 308, 203-206.
 94. Schonberg A., Bannerman E., Courtieu A.L., Kiss R., McLauchlin J., Shah S., Wilhelms D. (1996) Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 32, 279-287.
 95. Sernapesca 1996. Programa de certificación de producto final, Norma técnica. CER/NT/95.
 96. Shewan J.M. (1977) The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In Proceeding of the Conference on Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish. London: Tropical Products Institute, pp. 51-66.
 97. Tidwell J.H., Allan G.L. (2001) Fish as food: Aquaculture's contribution. EMBO Rep. 2 (11), 958-963.
 98. Tocmo R., Krizman K., Khoo W.L., Phua L.K., Kim M., Hyun-Gyun Yuk (2014) *Listeria monocytogenes* in Vacuum-Packed Smoked Fish Products: Occurrence, Routes of Contamination. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13, 172-189.
 99. Tomé E., Gibbs P.A., Teixeira P.C. (2008) Growth control of *Listeria innocua* 2030C on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 121, 285-294.
 100. Tompkin R.B. (2002) Control of *Listeria monocytogenes* in the food processing environment. J Food Protect. 65 (4), 709-725.
 101. Tosun Y., Ozden S.O. (2014) Survey of inhibition of *L. monocytogenes* in hot-smoked rainbow fillets for food safety. J. Food Proc. Pres. 38, 338-346
 102. Truelstrup Hansen L., Huss H.H. (1998) Comparison of the microflora isolated from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses. Food Res. Int. 31, 703-711.
 103. Truelstrup Hansen L., Gill T., Drewes Røntved S., Huss H.H. (1996) Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. Food Res. Int. 29, 181-188.
 104. Vaz-Velho M., Todorov S, Ribeiro J, Gibbs P. (2005) Growth control of *Listeria innocua* 2030c during processing and storage of cold-smoked salmon-trout by *Carnobacterium divergens* V41 culture and supernatant. Food Control 16(6), 540-548.
 105. Weiss A., Hammes W.P. (2006) Lactic acid bacteria as protective cultures against *Listeria* spp. on cold smoked salmon. Eur. Food Res. Technol. 222, 343-346.
 106. Wernars K., Boerlin P., Audurier A., Russell E.G., Curtis G.D., Herman L., van der Mee-Marquet N. (1996) The WHO multicenter study on *Listeria monocytogenes* subtyping: random amplification of polymorphic DNA (RAPD). Int. J. Food Microbiol. 32, 325-341.
 107. Wesley I.V., Ashton F. (1991) Restriction enzyme analysis of *Listeria monocytogenes* strains associated with food-borne epidemics. Appl. Environ. Microbiol. 57, 969-975.

**LOTTI BLOCCATI?
NON TUTTO È DA BUTTARE!**

Servizio di ricontrollo conto terzi su lotti sospetti per contaminazione da corpi estranei effettuato con sistemi radioscopici industriali

a Raggi X

Re-Control Service

Ricontrollo su prodotti sospettati di contaminazione

L'UNICA AZIENDA IN ITALIA A FARE IL SERVIZIO PRESSO LE VOSTRE LINEE SECONDO IL DL 230/95 O PRESSO LA NOSTRA SEDE IN AMBIENTI A NORMA

**ATTENZIONE
MERCE SOSPESA
DA CONTROLLO
QUALITÀ**

parma controls
ADVANCED SOLUTIONS

ParmaControls S.r.l. - Via Mantova, 79/a - 43122 Parma - Italia
Tel. +39 0521 775064 - Fax +39 0521 775069 - e-mail:sales@parmacontrols.it