



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

«ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ ΙΙ: ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί και η επίδρασή τους στην ποιότητα και στην τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα»

Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη

Βόλος 2013

«Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί και η επίδρασή τους στην ποιότητα και στην τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα»

«Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου».

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- 1) Ιωάννης Σ. Μποζιάρης**, Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων
- 2) Σταύρος Λαλάς**, Καθηγητής, Τεχνολογία, Συντήρηση και Ποιοτικός Έλεγχος Λιπών και Ελαίων, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ Θεσσαλίας (Παράρτημα Καρδίτσας), Μέλος
- 3) Παναγιώτης Σκανδάμης**, Επίκουρος Καθηγητής, Υγιεινή Εγκαταστάσεων Βιομηχανιών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Μέλος.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

- 1) Ιωάννης Σ. Μποζιάρης**, Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2) Παναγιώτης Σκανδάμης**, Επίκουρος Καθηγητής, Υγιεινή Εγκαταστάσεων Βιομηχανιών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- 3) Σταύρος Λαλάς**, Καθηγητής, Τεχνολογία, Συντήρηση και Ποιοτικός Έλεγχος Λιπών και Ελαίων, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ Θεσσαλίας (Παράρτημα Καρδίτσας).
- 4) Κωνσταντίνος Αρ. Κορμάς**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5) Ελευθέριος Δροσινός**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Συστήματα Διασφάλισης Ποιότητας και Υγιεινής Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- 6) Ιωάννης Αρβανιτογιάννης**, Καθηγητής, Τεχνολογία Τροφίμων με έμφαση στα Υδάτινα οικοσυστήματα, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7) Αλέξανδρος Γκόβαρης**, Καθηγητής, Υγιεινή Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Κτηνιατρικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη

Ειδικοί Αλλοιωγόνι Μικροοργανισμοί και η επίδρασή τους στην ποιότητα και στην
τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα

Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη (2013) Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί και η επίδρασή τους στην ποιότητα και στην τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων : 30

Συνολικός αριθμός σελίδων της διατριβής : 304

Αριθμός Πινάκων : 33

Αριθμός Σχημάτων : 38

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών : 307

Imagine there's no heaven
It's easy if you try
No hell below us
Above us only sky
Imagine all the people
Living for today...

Imagine there's no countries
It isn't hard to do
Nothing to kill or die for
And no religion too
Imagine all the people
Living life in peace...

You may say I'm a dreamer
But I'm not the only one
I hope someday you'll join us
And the world will be as one

Imagine no possessions
I wonder if you can
No need for greed or hunger
A brotherhood of man
Imagine all the people
Sharing all the world...

You may say I'm a dreamer
But I'm not the only one
I hope someday you'll join us
And the world will live as one

John Lennon

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή πραγματοποιήθηκε με την υποστήριξη πολλών ανθρώπων, οι οποίοι συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της διατριβής μου Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Σ. Μποζιάρη για την πολύτιμη υποστήριξη του τόσο κατά τη διεξαγωγή της έρευνας όσο και κατά τη συγγραφή της διατριβής, καθώς και τα μέλη της Συμβουλευτικής μου Επιτροπής αποτελούμενη από τον Καθηγητή Σταύρο Λαλά και τον Επίκουρο Καθηγητή Παναγιώτη Σκανδάμη για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της έρευνας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τον εξαιρετικό Καθηγητή του Γ.Π.Α. Σέρκο Χαρουτουγιάν για την πολύτιμη βοήθειά του σε εξοπλισμό, υλικά και οτιδήποτε άλλο απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση των πειραμάτων με GC-MS. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή του οικείου Τμήματος Κωνσταντίνο Αρ. Κορμά για τις πολύτιμες συμβουλές του σχετικά με τις μοριακές τεχνικές. Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να πω στον Διδάκτωρ Χημείας Τροφίμων του Γ.Π.Α. Θανάση Μαλούχο για τη συνεισφορά των γνώσεών του στη διεξαγωγή πειραμάτων με GC-MS.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Διευθυντή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γ.Π.Α Καθηγητή Ι.-Γ. Νυχά για τη συνεισφορά του σε εξοπλισμό για την ολοκλήρωση πειραμάτων της έρευνάς μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις ερευνήτριες Δρ. Μαρία Παχιαδάκη και Δρ. Αλεξάνδρα Μεζίτη για τη βοήθειά τους στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια των μοριακών αναλύσεων.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινές μου ευχαριστίες στη Βιομηχανία ΔΙΑΣ ΑΕ για την παροχή των αλιευτικών προϊόντων καθώς και για την συσκευασία τους όπου απαιτήθηκε. Συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή Ποιότητας Ανδρέα Μαρουντά και τον Διευθυντή στον Ιχθυογεννητικό σταθμό Πελασγίας Δημήτρη Δημόπουλο.

Επιπλέον, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε ερευνητές, φοιτητές και φίλους που συνέβαλαν, ο καθένας με το δικό του τρόπο, στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συναδέλφους και φίλες κα Ελένη Νικούλη και κα Ελένη Παπαϊωάννου, καθώς και τους φοιτητές κα Αμαλία Σάββα και κ. Χρήστο Χριστοδούλου για τα χιλιόμετρα ή/και τη δουλειά που κάναμε μαζί. Επίσης, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στην καλή μου φίλη Δρ. Δότη Παπαδημητρίου, για την υποστήριξή της ως φίλη αλλά και ως επιστήμονας.

Ιδιαίτερα όμως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον πολύ καλό μου φίλο Γιάννη για όλα αυτά που έχει κάνει για μένα...τις άπειρες κουβέντες μας, τα ξενύχτια μας, τα ταξίδια μας, την υπομονή του στα ξεπάσματά μου, την ψυχολογική υποστήριξή του, τον δρόμο που μου έδειξε, τα φώτα που μου άναψε και τον τρόπο που μου δίδαξε ώστε να φτάσω να αγγίξω ένα όνειρο....και ποιος ξέρει....κάποια μέρα μπορεί να βρεθώ μέσα σε αυτό.... Τέλος, θα ήθελα να πω στους γονείς μου Φώτη και Αγγελική ότι τους ευχαριστώ για όλα όσα έχουν κάνει για μένα καθώς και για την ευχή που μου δώσανε «Καράβια να είναι οι σκέψεις σου, όμορφα στολίδια στον ωκεανό της γνώσης και της ζωής... Πολύτιμοι λίθοι να είναι οι πράξεις σου...να χτίζουν τη ζωή σου όπως εσύ επιθυμείς», θα είναι πάντα οδηγός στη ζωή μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπόλοιπη οικογένειά μου, την Θεοδώρα, τον Νίκο, την Μελίνα, τον Αρίστο, την Μιρέλλα και την

πανέμορφη μικρή μου Αγγελική για όλες τις στιγμές και τα συναισθήματα που μου έχουν προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια.

Εν κατακλείδι θα ήθελα να επισημάνω πως τίποτα από τα παραπάνω δεν θα ίσχυε εάν δεν είχα την τύχη να συναντήσω τον εκπληκτικό Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Σ. Μποζιάρη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μικροβιακή αλλοίωση αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό υποβάθμισης της ποιότητας στους νωπούς ιχθύες. Κατά τη συντήρηση των αλιευμάτων, ένα μικρό κλάσμα της αρχικής μικροβιακής σύνθεσης γνωστό ως Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (ΕΑΜ) φθάνουν σε υψηλά αριθμητικά επίπεδα των 7-9 log cfu/g και παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές στα τρόφιμα και επομένως την οργανοληπτική απόρριψη. Η επιλογή των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών εξαρτάται από τις επικρατούσες συνθήκες κατά τη συντήρηση όπως είναι η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα καθώς και από τις μικροβιακές αλληλεπιδράσεις. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των ΕΑΜ επιδρά στον ειδικό ρυθμό αύξησης και στο μέγεθος του τελικού πληθυσμού τους. Σε περίπτωση επιμόλυνσης με κάποιο παθογόνο, η τύχη του παθογόνου εξαρτάται και από τις αλληλεπιδράσεις αυτές.

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής ήταν μια ολοκληρωμένη προσέγγιση στο θέμα ποιότητα και ασφάλεια νωπών προϊόντων τσιπούρας (ολόκληροι ιχθύες και φιλέτα) με τη διερεύνηση/ταυτοποίηση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών με χρήση μοριακών τεχνικών, την παρακολούθηση των μεταβολών της μικροβιακής αλληλουχίας καθώς και την παραγωγή μεταβολιτών λόγω μικροβιακής δραστηριότητας, την τύχη του *Listeria monocytogenes* από πιθανή επιμόλυνση καθώς και την επίδραση πρόσθετων εμποδίων στην τύχη των μικροοργανισμών (αλλοιωγόνων και παθογόνων).

Ο προσδιορισμός της επικρατούσας μικροβιακής σύνθεσης των υπό εξέταση προϊόντων υπό διαφορετικές συνθήκες συντήρησης πραγματοποιήθηκε με χρήση κλασσικών και μοριακών (καλλιεργητικών και μη καλλιεργητικών) τεχνικών. Η ταυτοποίηση των βακτηρίων του ολικού μικροβιακού πληθυσμού έγινε με ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA και αλληλούχιση (sequencing) σε απομονωμένες αποικίες

μικροοργανισμών από τα τρυβλία (μοριακές-καλλιεργητικές τεχνικές) και η διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης με ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA, κλωνοποίηση και αλληλούχιση σε προκαρυωτικό DNA απευθείας από τη σάρκα των ιχθύων (μοριακές-μη καλλιεργητικές τεχνικές). Η μελέτη των παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων από τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (ολικό πτητικό άζωτο, τριμεθυλαμίνη, βιογενείς αμίνες και πτητικοί μεταβολίτες) πραγματοποιήθηκε με κλασσικές και ενόργανες κατά περίπτωση χημικές αναλύσεις (απόσταξη και τιτλοδότηση, φασματοφωτομετρία, HPLC, GC-MS SPME) με σκοπό να αξιολογηθούν ως πιθανοί χημικοί δείκτες αλλοίωσης. Οι πληθυσμιακές μεταβολές παρακολουθήθηκαν με τη χρήση κλασσικών μικροβιολογικών αναλύσεων.

Η ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης στα αλιεύματα, καλύπτοντας την πληροφορία που διαφεύγει των κλασσικών τεχνικών. Τα *Pseudomonas* spp. βρέθηκε να αποτελούν το σημαντικότερο μέρος των κυρίαρχων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, τόσο σε προϊόντα ιχθύος αποθηκευμένα σε ατμόσφαιρα αέρα (φιλέτο, ολόκληρο) όσο και σε MAP (φιλέτο μόνο) και με τις δύο προσεγγίσεις (κλασσική και μοριακή). Εξαίρεση αποτέλεσε η περίπτωση της συντήρησης των φιλέτων σε MAP στους 5°C, όπου το μεγαλύτερο ποσοστό της μικροβιακής σύνθεσης αποτελούνταν από είδη/στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων με κυρίαρχο το *Carnobacterium maltaromaticum* strain MMF-32. Νέοι μικροοργανισμοί οι οποίοι συγκυριαρχούν με τα *Pseudomonas* spp. αποκαλύφθηκαν μέσω της μοριακής προσέγγισης. Στην ολόκληρη τσιπούρα στον πάγο (0°C), τα *Pseudomonas* spp. βρέθηκε να συγκυριαρχούν με το *Aeromonas salmonicida* strain CIP 57.50, όπως αποκαλύφθηκε με τις μοριακές-μη καλλιεργητικές τεχνικές (απευθείας εκχύλιση DNA από τη σάρκα του ιχθύος). Επίσης, τα *Psychrobacter*

immobilis και τα *Psychrobacter cryohalolentis* βρέθηκε να αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό της μικροβιακής σύνθεσης στην ολόκληρη τσιπούρα στον πάγο, σύμφωνα με τις μοριακές-καλλιεργητικές τεχνικές. Επομένως, οι μοριακές τεχνικές, ιδιαίτερα όταν το γονίδιο στόχος είναι το 16S rRNA, αναμφισβήτητα αποτελούν το σημαντικότερο εργαλείο για μελλοντική χρήση στην τεκμηρίωση της διασφάλισης της ποιότητας και της ασφάλειας ενός τροφίμου.

Η μελέτη των πτητικών ουσιών που παράγονται από τους μικροοργανισμούς κατά τη διάρκεια της συντήρησης αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο προσδιορισμού της πορείας της μικροβιακής αλλοίωσης διότι αρκετές από τις ουσίες αυτές αυξάνονται μεταξύ της πρώτης ημέρας και της ημέρας απόρριψης. Η Ethyl-2-methylbutyrate, η Ethyl isovalerate και η Ethyl tiglate βρέθηκε να αυξάνονται εξαιτίας της δράσης των *Pseudomonas* spp., ενώ η 3-hydroxy-1-butanone, 3-methyl-1-butanal, 2-methyl-1-butanal, Isoamyl alcohol και η 2-ethyl-1-hexanol εξαιτίας της δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων, έπειτα από ανάλυση μοντέλων υποστρωμάτων ιχθύος ενοφθαλμισμένα σε μονοκαλλιέργεια με τους αντίστοιχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς. Οι ουσίες αυτές θα μπορούσε να χρησιμοποιηθούν ως χημικοί δείκτες μικροβιακής αλλοίωσης της τσιπούρας. Η 3-methyl-butanal αποτέλεσε την σημαντικότερη ουσία η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως χημικός δείκτης νωπότητας/αλλοίωσης μικροβιακής προέλευσης. Η χρήση του TVB-N καθώς και των άλλων αζωτούχων μεταβολιτών (TMA-N, βιογενείς αμίνες), ενώ αποτελούν έναν καλό δείκτη για την αποδοχή ή όχι, ωστόσο δεν επαρκούν για να χαρακτηρίσουν τη 'φρεσκότητα' του προϊόντος.

Η αποθήκευση σε MAP με το εμπορικό μίγμα αερίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, βρέθηκε να επηρεάζει την αύξηση των αλλοιωγόνων

μικροοργανισμών σε σχέση με την αποθήκευση σε αερόβιες συνθήκες διότι προκάλεσε i) μείωση του ρυθμού αύξησης των Gram αρνητικών βακτηρίων, ii) αύξηση του ρυθμού αύξησης των Gram θετικών βακτηρίων (*B. thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια) iii) αύξηση του τελικού πληθυσμού των Gram θετικών βακτηρίων και iv) μείωση του τελικού πληθυσμού των Gram αρνητικών βακτηρίων. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη, η εφαρμογή του MAP είχε ως αποτέλεσμα την τελική επικράτηση των Gram αρνητικών βακτηρίων, με ΕΑΜ τα *Pseudomonas* spp., και στις δύο ατμόσφαιρες (αέρας, MAP) στις χαμηλές θερμοκρασίες.

Η συγκαλλιέργεια μεταξύ των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών μεταξύ τους αλλά και με το *L. monocytogenes* σε στερεά μοντέλα υποστρώματα ιχθύος έδειξε ότι ο ένας μικροοργανισμός επηρεάζει την αύξηση του άλλου. Οι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί βρέθηκε να επιδρούν στην τύχη του *L. monocytogenes* τόσο σε συσκευασία αέρα όσο και σε MAP. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των ΕΑΜ βρέθηκε να επιδρά στον ειδικό ρυθμό αύξησης και στο μέγεθος του τελικού πληθυσμού τους. Η αύξηση του *L. monocytogenes* φάνηκε να ευνοείται στα φιλέτα σε συνθήκες αέρα όπου τα *Pseudomonas* spp. αποτελούν τον κυρίαρχο μικροοργανισμό. Επίσης, τα *Shewanella* spp. και οξυγαλακτικά βακτήρια, βρέθηκε να ευνοούν την αύξηση του παθογόνου στις συγκαλλιέργειες Sh-L, Lab-L στις συνθήκες αυτές. Η πτώση των πληθυσμών των *Pseudomonas* spp. και των *Shewanella* spp. εξαιτίας της επίδρασης του MAP στην αύξησή τους βρέθηκε να επιτρέπει την αύξηση του *L. monocytogenes* σε επίπεδα λίγο υψηλότερα από αυτά που παρατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρεμποδίζουν την αύξηση του παθογόνου στις συνθήκες αυτές.

Η προσθήκη κιτρικών αλάτων αποτελεί ένα επιπλέον εμπόδιο παρεμπόδισης της αύξησης των αλλοιωγόνων και των παθογόνων μικροοργανισμών. Η δράση του

κιτρικού έναντι της αύξησης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών είχε ως αποτέλεσμα την επέκταση του εμπορικού χρόνου ζωής των ιχθύων κατά 1 ημέρα στις δύο ατμόσφαιρες. Επιπλέον, η δράση του κιτρικού έναντι της αύξησης του *L. monocytogenes* κυρίως στη συσκευασία MAP είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του τελικού πληθυσμού του *Listeria monocytogenes* κατά 1 log σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το αντιμικροβιακό.

Λέξεις κλειδιά: Ειδικό Αλλοιωγόνο Μικροοργανισμοί, τσιπούρα, 16S rRNA, αλλοίωση, χημικοί δείκτες αλλοίωσης, μικροβιακές αλληλεπιδράσεις, *Listeria monocytogenes*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Μικροβιακή αλλοίωση ιχθύων.....	1
1.1.1. Ειδικοί Αλλοιωγόνι Μικροοργανισμοί (ΕΑΜ).....	3
1.2. Διερεύνηση του μικροβιακού πληθυσμού.....	6
1.3. Χημικοί δείκτες αλλοίωσης.....	9
1.4. Μικροβιακές αλληλεπιδράσεις.....	11
1.5. Παθογόνοι μικροοργανισμοί στα αλιευτικά προϊόντα.....	13
1.6. Συντήρηση νωπών ιχθύων.....	15
1.6.1. Συντήρηση σε συσκευασία αέρα.....	15
1.6.2. Συντήρηση σε συσκευασία MAP.....	17
1.6.3. Χρήση Αντιμικροβιακών συστημάτων ως πρόσθετα εμπόδια.....	19
1.7. Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής.....	21
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1 Μικροβιολογικά υλικά και χημικά αντιδραστήρια.....	27
2.2 Απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών.....	27
2.3 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων.....	28
2.4 Στατιστική επεξεργασία.....	28
2.5. Οργανοληπτική αξιολόγηση.....	28
3. Διερεύνηση μικροβιακής σύνθεσης ολόκληρων ιχθύων και φιλέτων τσιπούρας (<i>Sparus aurata</i>) με χρήση κλασσικών και μοριακών τεχνικών.....	33
3.1 Εισαγωγή.....	33
3.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	37
3.2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός.....	37

3.2.2 Προέλευση δειγμάτων.....	37
Ολόκληροι ιχθύες.....	37
Φιλέτα τσιπούρας.....	38
3.2.3 Απομόνωση Μικροβιακού Πληθυσμού.....	38
3.2.4 Προσδιορισμός χρόνου απόρριψης.....	39
3.2.5 Χαρακτηρισμός των απομονωμένων αποικιών με τη χρήση κλασσικών δοκιμών.....	40
3.2.6 Χαρακτηρισμός των απομονωμένων αποικιών με ενίσχυση γονιδίου 16S rRNA.....	40
3.2.7 Χαρακτηρισμός της μικροβιακής σύνθεσης από απευθείας εκχύλιση προκαρυωτικού DNA από ιστό ιχθύος.....	42
Απομόνωση DNA.....	42
Ενίσχυση γονιδίου 16SrRNA.....	43
Κλωνοποίηση και αλληλούχιση.....	43
3.2.8 Επεξεργασία αλληλουχιών.....	45
3.2.9 Φυλογενετική ανάλυση.....	46
3.3 Αποτελέσματα.....	47
3.3.1 Προσδιορισμός χρόνου οργανοληπτικής απόρριψης.....	47
3.3.2 Μικροβιακή σύνθεση στην αρχή και στο χρόνο απόρριψης ιχθύων τσιπούρας.....	48
3.3.2.1 Φαινοτυπική ανάλυση.....	48
3.3.2.2 Μοριακή ανάλυση.....	49
Μικροβιακός πληθυσμός στα φιλέτα.....	50
Μικροβιακός πληθυσμός στην ολόκληρη τσιπούρα.....	56

Ανάλυση γονιδίου 16S rRNA σε ιστό ιχθύος τσιπούρας στον πάγο, κλωνοποίηση και ταυτοποίηση με ανάλυση βιβλιοθήκης κλώνων.....	61
3.4 Συζήτηση.....	63
4. Μικροβιακή αύξηση και μεταβολική δραστηριότητα των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε διάφορες συνθήκες.....	83
4.1 Εισαγωγή.....	83
4.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	84
4.2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός.....	84
4.2.2. Προέλευση φιλέτων.....	85
4.3.2. Στερεά μοντέλα υποστρώματα από ζυμό ιχθύος τσιπούρας.....	85
4.3.2.1. Προετοιμασία μοντέλων υποστρωμάτων.....	85
4.3.2.2. Προετοιμασία εμβολίου, εμβολιασμός, συσκευασία και αποθήκευση μονοκαλλιεργειών σε μοντέλων ιχθύος.....	86
4.2.3. Μικροβιολογική ανάλυση φιλέτων.....	87
4.2.4. Μικροβιακή ανάλυση σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας.....	87
4.2.5. Προσδιορισμός χρόνου απόρριψης	87
4.2.6. Χημική ανάλυση.....	88
4.2.6.1. Προσδιορισμός Ολικού Πτητικού Βασικού Αζώτου (TVB-N).....	88
4.2.6.2.Προσδιορισμός Αζώτου Τριμεθυλαμίνης (TMA-N) φασματοφωτομετρικά.....	88
4.2.6.3. Προσδιορισμός Βιογενών αμίνων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης Προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων.....	89
Προετοιμασία δειγμάτων.....	89
Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης.....	90

4.2.6.4. Προσδιορισμός Πτητικών ουσιών με αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (GC/MS)	91
Προετοιμασία δειγμάτων.....	91
Συλλογή πτητικών ουσιών με SPME (Solid Phase MicroExtraction).....	91
Συνθήκες ανάλυσης πτητικών	92
Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πτητικών ουσιών.....	92
4.3. Αποτελέσματα.....	93
4.3.1. Προσδιορισμός χρόνου απόρριψης.....	93
4.3.2. Μικροβιακή αύξηση στα φιλέτα τσιπούρας.....	93
4.3.3.Μονοκαλλιέργεια μικροοργανισμών σε στερεά μοντέλα υποστρώματα.....	96
4.3.4. Χημική ανάλυση	98
4.3.4.1. Προσδιορισμός του Ολικού Πτητικού Βασικού Αζώτου (TVB-N).....	98
4.3.4.2. Προσδιορισμός της τριμεθυλαμίνης.....	99
4.3.4.3. Βιογενείς αμίνες.....	99
4.3.4.4. Παραγωγή πτητικών ουσιών.....	100
Πτητικές ουσίες που παράγονται στα φιλέτα ιχθύος τσιπούρας.....	100
Πτητικές ουσίες που παράγονται σε μοντέλα ιχθύος	102
Μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με τα επίπεδα πληθυσμών των μικροοργανισμών.....	105
4.4. Συζήτηση.....	108
5. Επίδραση Ειδικών Αλλοιωγόνων Μικροοργανισμών στην τύχη του <i>L. monocytogenes</i>.....	183

5.1. Εισαγωγή	183
5.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	185
5.2.1. Προέλευση και προετοιμασία δειγμάτων.....	185
5.2.2. Προετοιμασία εμβολίου, εμβολιασμός και αποθήκευση.....	186
5.3 Αποτελέσματα.....	187
5.3.1. Ανάπτυξη του <i>L. monocytogenes</i> σε φιλέτα τσιπούρας.....	187
Μονοκαλλιέργεια μικροοργανισμών σε στερεά μοντέλα υποστρώματα ιχθύος.....	191
Συγκαλλιέργεια αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του <i>L. monocytogenes</i> σε στερεά μοντέλα υποστρώματα ιχθύος.....	192
5.4 Συζήτηση.....	198
6. Επίδραση κιτρικού στις οργανοληπτικές και μικροβιολογικές μεταβολές και στην τύχη του <i>Listeria monocytogenes</i> σε φιλέτα τσιπούρας.....	225
6.1. Εισαγωγή.....	225
6.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	226
6.2.1 Προέλευση και προετοιμασία δειγμάτων.....	227
6.2.2 Προετοιμασία εμβολίου, εμβολιασμός και αποθήκευση.....	227
6.2.3. Προσδιορισμός χρόνου απόρριψης.....	228
6.3 Αποτελέσματα	229
6.3.1 Προσδιορισμός χρόνου οργανοληπτικής απόρριψης.....	229
6.3.2 Μικροβιολογικές μεταβολές.....	230
6.4. Συζήτηση.....	235
7. Γενική Συζήτηση, Συμπεράσματα και προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	253
7.1 Μικροβιολογική αλλοίωση και αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί.....	253

7.2 Χημικοί δείκτες αλλοίωσης.....	257
7.3 Μικροβιακές αλληλεπιδράσεις.....	259
7.4 Προσθήκη κιτρικών αλάτων.....	260
7.5 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	261
7.6 Συμπεράσματα	264
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	267
ABSTRACT.....	307

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Διάρκεια ζωής των ιχθυηρών κατά τη συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες σε διάφορες θερμοκρασίες συντήρησης.

Πίνακας 1.2 Διάρκεια ζωής των ιχθυηρών από τα ύδατα της ψυχρής και της εύκρατης ζώνης κατά τη συντήρησή τους υπό συνθήκες MAP σε διάφορες θερμοκρασίες συντήρησης.

Πίνακας 3.1. Χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης και επίπεδο μικροβιακού πληθυσμού ολόκληρων ιχθύων και φιλέτων τσιπούρας υπό διάφορες συνθήκες συντήρησης.

Πίνακας 3.2. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποικιών που απομονώθηκαν σε TSA από τη σάρκα νωπών ολόκληρων ιχθύων τσιπούρας. Σε παρένθεση παρουσιάζεται η δεκαδική αραίωση από την οποία προέκυψε ο αριθμός των αποικιών στα τρυβλία.

Πίνακας 3.3. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποικιών που απομονώθηκαν σε TSA από τη σάρκα νωπών φιλέτων ιχθύος τσιπούρας. Σε παρένθεση παρουσιάζεται η δεκαδική αραίωση από την οποία προέκυψε ο αριθμός των αποικιών στα τρυβλία.

Πίνακας 3.4 Επικρατείς φυλότυποι σε φιλέτα και σε ολόκληρη τσιπούρα.

Πίνακας 3.5 Ταυτοποίηση της αρχικής μικροβιακής σύνθεσης φιλέτων ιχθύων τσιπούρας με τον έλεγχο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών, τη μέθοδο του συστήματος API και με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA.

Πίνακας 3.6. Ταυτοποίηση της αλλοιωγόνου μικροβιακής σύνθεσης φιλέτων ιχθύων τσιπούρας στους 0°C με τον έλεγχο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών, τη μέθοδο του συστήματος API και με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA.

Πίνακας 3.7. Ταυτοποίηση της αλλοιωγόνου μικροβιακής σύνθεσης φιλέτων ιχθύων τσιπούρας στους 5°C με τον έλεγχο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών, τη μέθοδο του συστήματος API και με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA.

Πίνακας 3.8. Ταυτοποίηση της αλλοιωγόνου μικροβιακής σύνθεσης φιλέτων ιχθύων τσιπούρας στους 15°C με τον έλεγχο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών, τη μέθοδο του συστήματος API και με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA.

Πίνακας 3.9. Ταυτοποίηση της αρχικής και της αλλοιωγόνου μικροβιακής σύνθεσης ολόκληρων ιχθύων τσιπούρας με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, τη μέθοδο του συστήματος API και την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA.

Πίνακας 4.1. Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας κατά τη συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες στους 0, 5 και 15°C. Οι τιμές (μέσοι όροι \pm τυπ. απόκλιση, 3 4 επαναλήψεων) εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

Πίνακας 4.2. Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας κατά τη συντήρηση υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 0, 5 και 15°C. Οι τιμές εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

Πίνακας 4.3. Μεταβολές στο TVB-N (μ.ο. \pm τυπ.αποκλ., mg /100g σάρκας ιχθύος, n=2x2=4) κατά τη διάρκεια της συντήρησης των φιλέτων υπό συνθήκες αέρα και MAP στους 0, 5 και 15 °C. Οι τιμές με έντονο μαύρο χρώμα αντιστοιχούν στο χρόνο απόρριψης.

Πίνακας 4.4. Μεταβολές του TMA-N (μ.ο. \pm τυπ.απ., mg /100g σάρκας ιχθύος, n=2x2=4) κατά τη διάρκεια της συντήρησης των φιλέτων υπό συνθήκες αέρα και MAP στους 0, 5 και 15 °C. Οι τιμές με έντονο μαύρο χρώμα αντιστοιχούν στο χρόνο απόρριψης.

Πίνακας 4.5. Καμπύλες αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης (X) στα πρότυπα διαλύματα των 7 βιογενών αμινών.

Πίνακας 4.6. Μεταβολές στις συγκεντρώσεις των βιογενών αμινών κατά τη διάρκεια της συντήρησης των φιλέτων σε συνθήκες αέρα στους 0, 5 και 15 °C. Οι τιμές με έντονο μαύρο χρώμα αντιστοιχούν στο χρόνο απόρριψης.

Πίνακας 4.7. Μεταβολές στις συγκεντρώσεις των βιογενών αμινών κατά τη διάρκεια της συντήρησης των φιλέτων σε MAP στους 0, 5 και 15 °C. Οι τιμές με έντονο μαύρο χρώμα αντιστοιχούν στο χρόνο απόρριψης.

Πίνακας 4.8. Πτητικές ουσίες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν $\times 10^{-6}$ της κάθε κορυφής) σε φιλέτα τσιπούρας αποθηκευμένα υπό συνθήκες αέρα κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) στους 0, 5 και 15°C. R.T.: Retention Time (NIST library).

Πίνακας 4.9. Πτητικές ουσίες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν $\times 10^{-6}$ της κάθε κορυφής) σε φιλέτα τσιπούρας αποθηκευμένα υπό συνθήκες MAP κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) στους 0, 5 και 15°C. R.T.: Retention Time (NIST library).

Πίνακας 4.10. Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν $\times 10^{-6}$ της κάθε κορυφής) σε μάρτυρες - στείρα μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP στους 0, 5 και 15°C.

Πίνακας 4.11. Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν $\times 10^{-6}$ της κάθε κορυφής) από τη δράση των *Pseudomonas* spp. μετά από εμβολιασμό σε στείρα μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP στους 0, 5 και 15°C.

Πίνακας 4.12. Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν $\times 10^{-6}$ της κάθε κορυφής) από τη δράση των *Shewanella* spp. μετά από εμβολιασμό σε στείρα μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP στους 0, 5 και 15°C.

Πίνακας 4.13. Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν $\times 10^{-6}$ της κάθε κορυφής) από τη δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων μετά από εμβολιασμό σε στείρα μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP στους 0, 5 και 15°C.

Πίνακας 5.2. Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του *Listeria monocytogenes* σε φιλέτα τσιπούρας κατά τη συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες στους 5°C. Οι τιμές (μέσος όρος \pm τυπ. απόκλιση 3 επαναλήψεων) εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Barranyi & Roberts 1994).

Πίνακας 5.3. Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του *Listeria monocytogenes* σε φιλέτα τσιπούρας κατά τη συντήρηση υπό συνθήκες MAP στους 5°C. Οι τιμές (μέσος όρος \pm τυπ. απόκλιση 3 επαναλήψεων) εκτός της

παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

Πίνακας 5.4. Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του *Listeria monocytogenes* σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP στους 5°C. Οι τιμές (μέσος όρος \pm τυπ. απόκλιση 3 επαναλήψεων) εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

Πίνακας 5.5. Κινητικές παράμετροι των μικροοργανισμών σε συγκαλλιέργεια σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP στους 5°C. Οι τιμές (μέσος όρος \pm τυπ. απόκλιση 3 επαναλήψεων) εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

Πίνακας 6.1. Χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης, γενική εμφάνιση και επίπεδο μικροβιακού πληθυσμού (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα) φιλέτων τσιπούρας υπό διαφορετικές μεταχειρίσεις.

Πίνακας 6.2. Κινητικές παράμετροι μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας με ή χωρίς προσθήκη κιτρικών αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες στους 5°C για 10 ημέρες. Οι τιμές εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

Πίνακας 6.3. Κινητικές παράμετροι μικροοργανισμών σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας τα οποία εμβολιάστηκαν με *L. monocytogenes*, με ή χωρίς προσθήκη κιτρικών αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες στους 5°C για 10 ημέρες. Οι τιμές εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των

μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

Πίνακας 6.4. Κινητικές παράμετροι μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας με ή χωρίς προσθήκη κιτρικών αποθηκευμένα και αποθηκεύθηκαν σε συνθήκες MAP στους 5°C για 12 ημέρες. Οι τιμές εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

Πίνακας 6.5. Κινητικές παράμετροι μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας τα οποία εμβολιάστηκαν με *L. monocytogenes* με ή χωρίς προσθήκη κιτρικών αποθηκευμένα σε συνθήκες MAP στους 5°C για 12 ημέρες. Οι τιμές εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 3.1. Neighbor-joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις αλληλουχίες 16S rRNA που προέκυψαν από τους μικροοργανισμούς οι οποίοι απομονώθηκαν από φιλέτα υπό συνθήκες αέρα και MAP στους 0, 5 και 15°C και των αλληλουχιών των πλησιέστερων χαρακτηρισμένων συγγενών. Το *Persephonella marina* χρησιμοποιήθηκε ως ρίζα. Ο έλεγχος της στατιστικής εγκυρότητας της τοπολογίας του δένδρου έγινε 1000 φορές με τη μέθοδο bootstrap.

Σχήμα 3.2. Neighbor-joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις αλληλουχίες 16S rRNA που προέκυψαν απευθείας από τη σάρκα ολόκληρης τσιπούρας στην αρχή και στο χρόνο απόρριψης στον πάγο (0°C) και των αλληλουχιών των πλησιέστερων συγγενών. Το *Fucophilus fucoidanolyticus* έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα. Ο έλεγχος της στατιστικής εγκυρότητας της τοπολογίας του δένδρου έγινε 1000 φορές με τη μέθοδο bootstrap.

Σχήμα 4.1. Μεταβολές στη γενική εμφάνιση των φιλέτων κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό συνθήκες αέρα (α) και MAP (β) στους 0 °C.

Σχήμα 4.2. Μεταβολές στη γενική εμφάνιση των φιλέτων κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό συνθήκες αέρα (α) και MAP (β) στους 5°C.

Σχήμα 4.3. Μεταβολές στη γενική εμφάνιση των φιλέτων κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό συνθήκες αέρα (α) και MAP (β) στους 15°C.

Σχήμα 4.4. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (β) στους 0°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στους μέσους όρους 4 επαναλήψεων (2x2) που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι καμπύλες προσαρμογή με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Barranyi & Roberts 1994). Ολικός μικροβιακός πληθυσμός (○), *Pseudomonas* spp. (●), βακτήρια που παράγουν H₂S (▲), *Brochothrix thermosphacta* (□), οξυγαλακτικά βακτήρια(■) και Enterobacteriaceae (★).

Σχήμα 4.5. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (β) στους 5°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στα δεδομένα που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι καμπύλες στην προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Barranyi

and Roberts 1994). Ολικός μικροβιακός πληθυσμός (○), *Pseudomonas* spp. (●), βακτήρια που παράγουν H₂S (▲), *Brochothrix thermosphacta* (□), οξυγαλακτικά βακτήρια(■) και Enterobacteriaceae (★).

Σχήμα 4.6. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (β) στους 15°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στα δεδομένα που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι καμπύλες στην προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994). Ολικός μικροβιακός πληθυσμός (○), *Pseudomonas* spp. (●), βακτήρια που παράγουν H₂S (▲), *Brochothrix thermosphacta* (□), οξυγαλακτικά βακτήρια(■) και Enterobacteriaceae (★).

Σχήμα 4.7. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (β) στους 0°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στα δεδομένα που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι καμπύλες στην προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994). *Pseudomonas* spp. (●), *Shewanella* spp. (▲), οξυγαλακτικά βακτήρια (■).

Σχήμα 4.8. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (β) στους 5°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στα δεδομένα που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι καμπύλες στην προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994). *Pseudomonas* spp. (●), *Shewanella* spp. (▲), οξυγαλακτικά βακτήρια (■).

Σχήμα 4.9. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (β) στους 15°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στα δεδομένα που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι καμπύλες στην προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994). *Pseudomonas* spp. (●), *Shewanella* spp. (▲), οξυγαλακτικά βακτήρια (■).

Σχήμα 4.10. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε μάρτυρες μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 0°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (ο).

Σχήμα 4.11. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε μάρτυρες μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 5°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (ο).

Σχήμα 4.12. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε μάρτυρες μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 15°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (ο).

Σχήμα 4.13. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με τον χρόνο αποθήκευσης (α) και τις μεταβολές της OMX (β) στους 0°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (ο).

Σχήμα 4.14. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα OMX (β) σε φιλέτα τσιπούρας αποθηκευμένα στους 5°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (ο).

Σχήμα 4.15. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα OMX (β) σε φιλέτα τσιπούρας αποθηκευμένα στους 15°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (ο).

Σχήμα 4.16. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα *Pseudomonas* spp. (β) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 0°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (ο).

Σχήμα 4.17. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα *Pseudomonas* spp. (β) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 5°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (ο).

Σχήμα 4.18. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα *Pseudomonas* spp. (β) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 15°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (ο).

Σχήμα 4.19. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα *Shewanella* spp. (β) σε μονοκαλλιέργειες σε

μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 0°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (ο).

Σχήμα 4.20. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα *Shewanella* spp. (β) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 5°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (ο).

Σχήμα 4.21. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα *Shewanella* spp. (β) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 15°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (ο).

Σχήμα 4.22. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 0°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (ο).

Σχήμα 4.23. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 5°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (ο).

Σχήμα 4.24. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 15°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (ο).

Σχήμα 5.1. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας (με τη φυσική τους μικροβιακή σύνθεση) (α) και σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας μετά τον εμβολιασμό τους με *L. monocytogenes* (β) και μεταβολή του pH του μοντέλου υποστρώματος κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες συνθήκες στους 5°C. *Pseudomonas* spp. (●), βακτήρια που παράγουν H₂S (▲), *Brochothrix thermosphacta* (□), οξυγαλακτικά βακτήρια (■), Enterobacteriaceae (★) και *Listeria monocytogenes* (Δ).

Σχήμα 5.2. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας (με τη φυσική τους μικροβιακή σύνθεση) (α) και σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας μετά τον εμβολιασμό τους με *L. monocytogenes* (β), και μεταβολή του pH

του μοντέλου υποστρώματος κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συνθήκες MAP στους 5°C, *Pseudomonas* spp. (●), βακτήρια που παράγουν H₂S (▲), *Brochothrix thermosphacta* (□), οξυγαλακτικά βακτήρια (■), Enterobacteriaceae (✱) και *Listeria monocytogenes* (Δ).

Σχήμα 5.3. Πληθυσμιακές μεταβολές (α) των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών ιχθύος τσιπούρας και του *Listeria monocytogenes* και μεταβολές του pH του υποστρώματος (β), μετά τον εμβολιασμό τους ως μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες συνθήκες στους 5°C. *Pseudomonas* spp. (●), *Shewanella* spp. (▲), οξυγαλακτικά βακτήρια (■) και *Listeria monocytogenes* (Δ). Τα σημεία είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων.

Σχήμα 5.4. Πληθυσμιακές μεταβολές (α) των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών ιχθύος τσιπούρας και του *Listeria monocytogenes* και μεταβολές του pH του υποστρώματος (β), μετά τον εμβολιασμό τους ως μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε MAP στους 5°C. *Pseudomonas* spp. (●), *Shewanella* spp. (▲), οξυγαλακτικά βακτήρια (■) και *Listeria monocytogenes* (Δ). Τα σημεία είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων.

Σχήμα 5.5. Πληθυσμιακές μεταβολές των *Pseudomonas* spp. (●) και *L. monocytogenes* (Δ) μετά τον εμβολιασμό τους σε συγκαλλιέργεια σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε συνθήκες MAP (β) στους 5°C. Τα σημεία είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων.

Σχήμα 5.6. Πληθυσμιακές μεταβολές των *Shewanella* spp. (▲) και *L. monocytogenes* (Δ) μετά τον εμβολιασμό τους σε συγκαλλιέργεια σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (β) στους 5°C. Τα σημεία είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων.

Σχήμα 5.7. Πληθυσμιακές μεταβολές των οξυγαλακτικών βακτηρίων (■) και *L. monocytogenes* (Δ) μετά τον εμβολιασμό τους σε συγκαλλιέργεια σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε συνθήκες MAP (β) στους 5°C. Τα σημεία είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων.

Σχήμα 5.8. Πληθυσμιακές μεταβολές των *Pseudomonas* spp. (●), *Shewanella* spp. (▲) και οξυγαλακτικών βακτηρίων (■) μετά τον εμβολιασμό τους σε συγκαλλιέργεια σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες

συνθήκες (α) και σε συνθήκες MAP (β) στους 5°C. Τα σημεία είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων.

Σχήμα 5.9. Πληθυσμιακές μεταβολές των *Pseudomonas* spp. (●), *Shewanella* spp. (▲), οξυγαλακτικών βακτηρίων (■) και *L. monocytogenes* (Δ) μετά τον εμβολιασμό τους σε συγκαλλιέργεια σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε συνθήκες MAP (β) στους 5°C. Τα σημεία είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων.

Σχήμα 6.1. Μεταβολές των χαρακτηριστικών οσμής (α), γεύση (β), συνεκτικότητα (γ) και εμφάνιση (δ) των ψημένων φιλέτων, σε συσκευασία αέρα (-) και MAP (- - -) και των ψημένων φιλέτων με την προσθήκη κιτρικών σε συσκευασία αέρα (----) και MAP (.....) στους 5°C. Με το σύμβολο (●) παρουσιάζεται η βαθμολογία που αντιστοιχεί στο χρόνο απόρριψης των φιλέτων.

Σχήμα 6.2. Μεταβολές μικροβιακού πληθυσμού σε φιλέτα τσιπούρας (α & β) και σε φιλέτα εμβολιασμένα με *L. monocytogenes* (γ & δ), χωρίς (α & γ) και με την προσθήκη κιτρικών (β & δ) που αποθηκεύθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 5°C για 10 ημέρες. Τα σημεία αντιστοιχούν στον μέσο όρο 3 επαναλήψεων ενώ οι καμπύλες προσαρμογής έγιναν με τη χρήση του μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994). *Pseudomonas* spp. (●), βακτήρια που παράγουν H₂S (▲), *Brochothrix thermosphacta* (□), οξυγαλακτικά βακτήρια (■), Enterobacteriaceae (★) και *L. monocytogenes* (Δ).

Σχήμα 6.3. Μεταβολές μικροβιακού πληθυσμού σε φιλέτα τσιπούρας (α & β) και σε φιλέτα εμβολιασμένα με *L. monocytogenes* (γ & δ), χωρίς (α & γ) και με την προσθήκη κιτρικών (β & δ) που αποθηκεύθηκαν σε MAP στους 5°C για 12 ημέρες. Τα σημεία αντιστοιχούν στον μέσο όρο 3 επαναλήψεων ενώ οι καμπύλες προσαρμογής έγιναν με τη χρήση του μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994). *Pseudomonas* spp. (●), βακτήρια που παράγουν H₂S (▲), *Brochothrix thermosphacta* (□), οξυγαλακτικά βακτήρια (■), Enterobacteriaceae (★) και *L. monocytogenes* (Δ).

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis

EAM: Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί

HL: Hugh και Leifson

IA: Iron Agar

L: Listeria

LAB: Lactic Acid Bacteria

LH: Long and Hammer

MAP: Modified Atmosphere Package (Τροποποιημένη Ατμόσφαιρα)

MRD: Maximum Recovery Diluent

PCA: Plate Count Agar

PCR: Polymerase Chain Reaction

Ps: Pseudomonas

SDS-PAGE analysis: Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Sh: Shewanella

SSO: Specific Spoilage Organisms

SSCP: Single-strand conformation polymorphism

STAA: Streptomycin Sulphate, Thallus Acetate, cycloheximide (actidione) Agar

TGGE: thermal gradient gel electrophoresis

TMAO: Trimethylamine oxide (Οξείδιο της τριμεθυλαμίνης)

TMA: Trimethylamine (Τριμεθυλαμίνη)

TMA-N: Trimethylamine nitrogen (Άζωτο της τριμεθυλαμίνης)

TVB-N: total volatile basic nitrogen (Ολικό Πτητικό Βασικό Άζωτο)

TSA: Tryptone Soy Agar

TSB: Tryptone Soy Broth

T-RFLP: Terminal restriction fragment length polymorphism

TGE: Tryptone Glucose Extract agar

VRBGA: Violet Red Bile Glucose agar

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΟΥΣΙΩΝ ΑΓΓΛΙΚΑ: ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Acetic acid : οξικό οξύ

Acetophenone: ακετοφαινόνη

Acetyl propionyl (ή 2,3 pentedione): 2,3 πενταδιόνη

Amyl alcohol: αμυλική αλκοόλη

1-butoxy-2-propanol: 1-βούτοξυ-2-προπανόλη

Butyl alcohol (ή butanol): βουτανόλη

Dimethyl disulfide: διμεθυλοσουλφίδιο

n-decanal: n-δεκανάλη

2-decenal: 2-δεκα-εν-άλη

1-decanol: 1-δεκανόλη

n-dodecane : n-δωδεκάνιο

Ethyl acetate : οξικός αιθυλεστέρας

Ethyl crotonate: κροτονικός αιθυλεστέρας ή αιθυλεστέρας του 2-βουτενικού οξέος

Ethyl isovalerate: ισοβαλερικός αιθυλεστέρας

Ethyl propionate: προπιονικός αιθυλεστέρας

Ethyl-2-methylbutyrate: 2-μεθύλ-βουτυρικός αιθυλεστέρας

Ethyl isovalerate: ισοβαλερικός αιθυλεστέρας

Ethyl tiglate (ή Ethyl trans-2-methyl-2-butenate): trans-2-μεθύλ-2-βουτενικός αιθυλεστέρας

Ethyl Isobutyrate: ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας

Ethyl butyrate: βουτυρικός αιθυλεστέρας

2-Ethyl-1-hexanol: 2-αιθύλ-1-εξανόλη

n-eicosane: n-εικοσάνιο

Hexanoic acid, ethyl ester: αιθυλεστέρας εξανικού οξέος

trans-2-Hexenal: trans-2-εξενάλη

1-Hexanol: 1-εξανόλη

2-heptanone : 2-επτανόνη

cis-4-Heptenal: cis-4-επτενάλη

Heptanal: επτανάλη

1,4-heptadiene: 1,4-επταδιένιο

Heptyl alcohol (ή 1-Heptanol): 1-επτανόλη

n-hexadecane: n-δεκαεξάνιο

3-hydroxy-1-butanone: 3-ύδροξυ-1-βουτανόνη

trans,trans-2,4-Heptadienal: trans, trans,-2,4,-επταδιενάλη

Hexanal : εξανάλη

trans-2-Hexenal: trans-2-εξενάλη

trans,trans-2,4-Heptadienal : trans,trans-2,4-επταδιενάλη

Isobutyl isobutyrate: ισοβουτυρικός ισοβουτυλεστέρας

Isoamyl alcohol : ισοαμυλική αλκοόλη

Lauryl alcohol (ή 1-dodecanol): 1-δωδεκανόλη

2-Methyl-1-butanal: 2-μεθύλ-1-βουτανάλη

3-Methyl-1-butanal: 3-μεθύλ-1-βουτανάλη

4-methyl-2-pentanone: 4-μεθύλ-2-πεντανόνη

2-methylbutyrate: άλας του 2-μεθυλ βουτυρικού

6-methyl-5-hepten-2-one: 6-μεθύλ-5-επτέν-2-όνη

2-methyl-1-butanol: 2-μεθύλ-1-βουτανόλη

Nonanoic acid: εννεανοϊκό οξύ

2-nonanone: 2-εννεανόνη

cis-6-nonenal: cis-6-εννεανάλη

Nonanal: εννεανάλη

trans-2-nonenal: trans-2-εννέα-εν-άλη

cis-6-Nonen-1-ol: cis-6- εννέα-εν-1-όλη

2-octanone: 2-οκτανόνη

1-octen-3-ol: 1-οκτέν-3-όλη

2,3 octanedione: 2,3 οκτανοδιόνη

trans-2-octenal: trans-2-οκτενάλη

1-Penten-3-ol: 1-πεντέν-3-όλη

2-pentanone: 2-πεντανόνη

3-pentanone: 3-πεντανόνη

2-Penten-1-ol (Z): 2-πεντέν-1-όλη

Pentadecane: δεκαπεντάνιο

n-tetradecane: n-δεκατεσεράνιο

n-tetracosane: n-εικοστεσεράνιο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μικροβιακή αλλοίωση ιχθύων

Ως αλλοίωση των τροφίμων θεωρείται η υποβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών καθιστώντας το προϊόν μη αποδεκτό για κατανάλωση (Huis in't Veld 1996). Η υποβάθμιση της ποιότητας των αλιευτικών προϊόντων μπορεί να προκληθεί κυρίως λόγω της δράσης των μικροοργανισμών (μικροβιακή αλλοίωση), ενδογενών ενζύμων (αυτόλυση) και χημικών αντιδράσεων οξείδωσης (τάγγιση) (Ashie *et al.* 1996, Gram & Huss 1996).

Η μικροβιακή αλλοίωση αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό υποβάθμισης της ποιότητας στους νωπούς ιχθύες (Gram & Dalgaard 2002). Η μικροβιακή αλλοίωση στα τρόφιμα εκδηλώνεται με αλλαγές στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά (οσμή, γενική εμφάνιση) εξαιτίας της δράσης των μικροοργανισμών (Gill 1986). Οι μικροοργανισμοί αυτοί που λαμβάνουν μέρος στην αλλοίωση προέρχονται από την αρχική μικροβιακή σύνθεση και από επιμόλυνση (μείανση).

Η αρχική μικροβιακή σύνθεση των νωπών ιχθύων εξαρτάται κυρίως από το περιβάλλον διαβίωσής τους (Shewan 1977). Η αρχική μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων, οι οποίοι προέρχονται από τα ύδατα της εύκρατης ζώνης, αποτελείται από ψυχρότροφα αρνητικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* και από θετικά κατά Gram βακτήρια των γενών *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Cornynebacterium* και *Brochothrix thermosphacta* (Gram & Huss 1996, Huis in't Veld 1996). Η μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων, οι οποίοι προέρχονται από τα ύδατα της τροπικής ζώνης, αποτελείται κυρίως από θετικά κατά Gram βακτήρια (coryneforms, Micrococcaceae) και Enterobacteriaceae (Wood 1953,

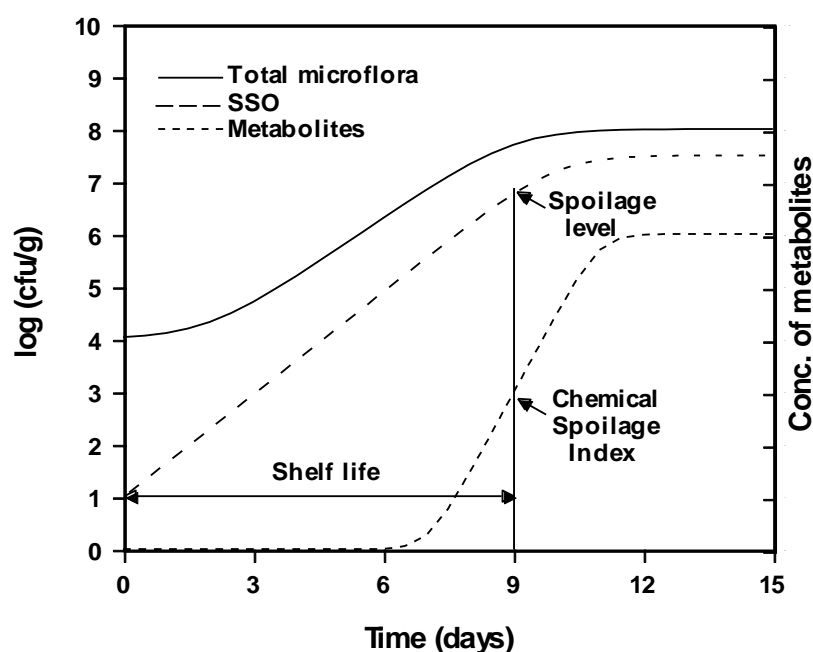
Gillespie & Macrae 1975, Shewan 1977, Liston 1980, Gram 1990), αλλά σε αρκετές περιπτώσεις είναι παρόμοια με τη μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων των εύκρατων κλιμάτων (Colwell & Liston 1962, Gram *et al.* 1990).

Τα νωπά αλιευτικά προϊόντα μπορεί να επιμολυνθούν από μια πληθώρα μικροοργανισμών που προέρχονται από το φυσικό τους περιβάλλον, τον άνθρωπο, τον εξοπλισμό και τις επιφάνειες επεξεργασίας (Jay *et al.* 2005). Οι ιχθύες οι οποίοι προέρχονται από μολυσμένα ύδατα φέρουν μεγάλους αριθμούς βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae (Huss, 1995). Ο άνθρωπος μπορεί να επιμολύνει τα τρόφιμα με παθογόνα βακτήρια όπως το *Staphylococcus aureus* του οποίου πολλές φορές είναι φορέας και με εντερικά παθογόνα λόγω έλλειψης ορθής υγιεινής πρακτικής. Επιπλέον, άλλοι μικροοργανισμοί όπως είναι το *Listeria monocytogenes* έχουν την ικανότητα να προσκολλούνται στις επιφάνειες επεξεργασίας και να δημιουργούν βιοϋμένια. Η επαφή των προϊόντων με τις επιφάνειες αυτές κατά την επεξεργασία έχει ως αποτέλεσμα την επιμόλυνση.

Κατά τη συντήρηση, μόνο ένα μικρό κλάσμα της αρχικής μικροβιακής σύνθεσης φθάνει σε υψηλά αριθμητικά επίπεδα που χαρακτηρίζουν την αλλοίωση. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, γνωστοί ως Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM), παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές στα τρόφιμα και επομένως την οργανοληπτική απόρριψη. Η επιλογή των μικροοργανισμών που θα αποτελέσουν το μικρό αυτό κλάσμα εξαρτάται κυρίως από τις επικρατούσες συνθήκες της αποθήκευσης όπως είναι η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα (Leisner & Gram 1999, Dalgaard 2003).

1.1.1. Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM)

Οι Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί αποτελούν την κύρια αιτία της ποιοτικής υποβάθμισης στα νωπά αλιευτικά προϊόντα (Gram & Huss 1996, Gram & Dalgaard 2002). Οι EAM (SSO, Specific Spoilage Organisms) αναπτύσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς και όταν ο πληθυσμός τους πλησιάσει στο επίπεδο αλλοίωσης (spoilage level) των 10^7 - 10^9 cfu/g οι ουσίες που έχουν παραχθεί λόγω του μεταβολισμού τους (metabolites: CSI-chemical spoilage ind(ex)-ices), έχουν φθάσει σε συγκεντρώσεις τέτοιες όπου προκαλούν την οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος (Dalgaard *et al.* 1993, Gram & Huss 1996, Huis in't Veld 1996) (Σχ. 1.1).



Σχήμα 1.1 Γενική περιγραφή της αλλοίωσης των ιχθυηρών (Dalgaard *et al.* 1993).

Στους ιχθύες που προέρχονται από τα ύδατα των εύκρατων κλιμάτων και αποθηκεύονται σε πάγο στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής, τα γένη *Pseudomonas*

και *S. putrefaciens* αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού των αλλοιωμένων ιχθύων (Liston 1960, Gram *et al.* 1987, Gram *et al.* 1990). Οι μικροοργανισμοί αυτοί επικρατούν λόγω του μικρού χρόνου διπλασιασμού που παρουσιάζουν στις χαμηλές θερμοκρασίες (Morita 1975). Το *S. putrefaciens* αποτελεί κυρίως τον ΕΑΜ σε ιχθύες που αλιεύονται από τα ύδατα της Β. Ευρώπης και συντηρούνται σε πάγο, λόγω του υψηλότερου δυναμικού αλλοίωσης που παρουσιάζει εξαιτίας της ικανότητάς του να μετατρέπει το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (ΤΜΑΟ) σε τριμεθυλαμίνη (ΤΜΑ) και να προσδίδει στο προϊόν την έντονη μυρωδιά της ‘ψαρίλας’ το οποίο προκαλεί και την οργανοληπτική απόρριψη (Gram *et al.* 1987). Στα αλιεύματα της Μεσογείου, αν και οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί είναι οι ίδιοι με αυτούς που επικρατούν στα αλιεύματα της Β. Ευρώπης, ως ΕΑΜ έχουν χαρακτηριστεί τα *Pseudomonas* spp. διότι φθάνουν σε υψηλότερους πληθυσμούς από το *S. putrefaciens*, ενώ οι κύριοι μεταβολίτες που προκαλούν την οργανοληπτική απόρριψη είναι κυρίως αζωτούχα παραπροϊόντα του μεταβολισμού των αμινοξέων (Dainty, 1996). Τα *Pseudomonas* spp. επικρατούν έναντι του *S. putrefaciens* στους ιχθύες της Μεσογείου κυρίως λόγω της αδυναμίας των τελευταίων να παράγουν επαρκή ενέργεια από την αναγωγή του ΤΜΑΟ σε ΤΜΑ. Η πρόδρομη ουσία για την παραγωγή του ΤΜΑ είναι το ΤΜΑΟ, το οποίο απαντάται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στους ιχθύες της Μεσογείου (Kyraia & Lougouvois 2002). Έτσι, τα *Pseudomonas* spp. και κατά δεύτερον το *S. putrefaciens* αποτελούν τους πιο επικρατέστερους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε αλιεύματα που προέρχονται από Ελληνικά ύδατα και συντηρούνται υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες (Koutsoumanis & Nychas 1999, Koutsoumanis & Nychas 2000; Tryfinopoulou *et al.* 2002, Tryfinopoulou *et al.* 2007, Boziaris *et al.* 2011).

Είναι πλέον γνωστό ότι διάφορες αλλαγές στις συνθήκες επεξεργασίας, συσκευασίας και αποθήκευσης είναι δυνατόν να δώσουν μία τελείως διαφορετική μικροβιακή σύνθεση και κατά συνέπεια και τύπο αλλοίωσης (Gram & Huss 1996). Η συντήρηση των ιχθύων σε ατμόσφαιρα διαφορετικής σύνθεσης αερίων από αυτή του αέρα, όπως είναι η αποθήκευση σε συσκευασία MAP (Modified Atmosphere Package), ευνοεί την επικράτηση διαφορετικών ομάδων μικροοργανισμών. Έχει παρατηρηθεί ότι η συσκευασία των ιχθυηρών σε MAP (μειωμένο ή καθόλου οξυγόνο, υψηλό διοξείδιο του άνθρακα) παρεμποδίζει πολλές φορές την αύξηση τόσο των *Pseudomonas* spp. όσο και του *S. putrefaciens*. Αντίθετα, έχει αναφερθεί ότι οι συσκευασίες αυτές ευνοούν την αύξηση μικροοργανισμών με ζυμωτικό μεταβολισμό όπως είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια και το *B. thermosphacta* στους ιχθύες της Μεσογείου (Drosinos & Nychas 1996, Drosinos *et al.* 1997, Koutsoumanis & Nychas 1999, Taoukis *et al.* 1999a, Taoukis *et al.* 1999b, Koutsoumanis *et al.* 2000), τα οξυγαλακτικά βακτήρια και το *Photobacterium phosphoreum* στους ιχθύες των βόρειων κλιμάτων (Lannelonque *et al.* 1982, Dalgaard 1995a, Dalgaard *et al.* 1997). Στους ιχθύες της Β. Ευρώπης σε συνθήκες MAP επικρατεί κυρίως το *P. phosphoreum* έναντι του *S. putrefaciens* διότι είναι περισσότερο ανθεκτικό στο διοξείδιο του άνθρακα και παράγει 10-100 φορές περισσότερο TMA ανά κύτταρο σε σχέση με το *S. putrefaciens* (Dalgaard 1995b). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι πληθυσμοί του *S. putrefaciens* μικρότεροι του 10^8 δεν είναι ικανοί να προκαλέσουν αλλοίωση, λόγω του μικρού ποσού TMA που παράγουν (Dalgaard 1995a).

1.2. Διερεύνηση του μικροβιακού πληθυσμού

Οι μικροβιολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της μικροβιακής σύνθεσης ενός τροφίμου (απομόνωση, ταυτοποίηση, ανίχνευση και απαρίθμηση των μικροοργανισμών) στηρίζονται κυρίως στη χρήση εκλεκτικών ή γενικής χρήσης τεχνητών υποστρωμάτων (θρεπτικά υλικά) και χαρακτηρίζονται ως κλασσικές μέθοδοι. Η αξιοπιστία των κλασσικών τεχνικών περιορίζεται εξαιτίας της δυνατότητας μέτρησης μόνο των κυττάρων που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν αποικίες καθώς και από την αξιοπιστία του ίδιου του υποστρώματος. Επίσης, τα καταπονημένα ή τραυματισμένα κύτταρα δεν αναπτύσσονται σε εκλεκτικά υλικά, ενώ άλλα παρεμποδίζονται από μικροοργανισμούς που βρίσκονται σε αφθονία (Hugenholtz *et al.* 1998). Γενικά, οι κλασσικές τεχνικές χαρακτηρίζονται ως χρονοβόρες και καλύπτουν μικρότερο ποσοστό του 1% των ειδών των μικροοργανισμών που απαρτίζουν τη μικροβιακή σύνθεση ενός περιβαλλοντικού δείγματος (Ward *et al.* 1990).

Ο προσδιορισμός/ταυτοποίηση της μικροβιακής σύνθεσης στα αλιεύματα πραγματοποιείται κυρίως με φαινοτυπικές δοκιμές μετά από απομόνωση των μικροοργανισμών που απαντώνται στον ιστό του αλιεύματος σε θρεπτικά υλικά. Κατά καιρούς, διάφοροι ερευνητές μελέτησαν τη μικροβιακή σύνθεση των ιχθυηρών είτε σε εκλεκτικά ή σε γενικής χρήσης θρεπτικά υλικά με τον έλεγχο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών κάθε αποικίας (Gram *et al.* 1987, Gennari & Tomaselli 1988, Heinsz *et al.* 1988, Jorgensen & Huss 1989, Dalgaard 1995, Gennari *et al.* 1999, Rodriguez *et al.* 2003, Tryfinopoulou *et al.* 2002, 2007). Η χρήση φαινοτυπικών δοκιμών (μορφολογικές, βιοχημικές) σε καθαρές καλλιέργειες δεν επαρκεί για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών κυρίως εξαιτίας της χαμηλής διακριτικής τους ικανότητας.

Διάφοροι ερευνητές αναφέρουν ότι οι κλασσικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών παρέχουν πολλές φορές ελλιπή αποτελέσματα (Baumann *et al.* 1972, Molin & Ternstrom 1986, Christensen *et al.* 1994, Tryfinopoulou *et al.* 2002, 2007).

Τα τελευταία χρόνια είναι προς εξέλιξη πιο γρήγορες και αξιόπιστες μέθοδοι όπως είναι οι μοριακές τεχνικές. Οι τεχνικές αυτές διακρίνονται σε μοριακές καλλιεργητικές και σε μοριακές μη καλλιεργητικές. Οι μοριακές καλλιεργητικές τεχνικές αφορούν μόνο τα βακτήρια που αναπτύσσονται στα θρεπτικά υλικά. Με τις τεχνικές αυτές οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται στα θρεπτικά υλικά μπορούν εύκολα να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν με αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA λαμβάνοντας μόνο μία μικρή ποσότητα DNA. Η αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου είναι σήμερα η πιο κοινή προσέγγιση για την ανάλυση της μικροβιακής σύνθεσης λόγω της φυλογενετικής πληροφορίας που παρέχει το γονίδιο αυτό. Η αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των βακτηρίων καθώς και για τον εντοπισμό των άγνωστων βακτηρίων σε επίπεδο γένους ή είδους (Sacchi *et al.* 2002). Επομένως, η πληροφορία που λαμβάνεται είναι μακράν ακριβέστερη σε σχέση με αυτή που λαμβάνεται με τις φαινοτυπικές δοκιμές. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα θρεπτικά υλικά παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα. Επιπλέον, αρκετοί σημαντικοί μικροοργανισμοί αδυνατούν να αναπτυχθούν σε ορισμένα θρεπτικά υλικά γενικής χρήσης (Broekaert *et al.* 2011). Οι μοριακές μη καλλιεργητικές τεχνικές αποτελούν την εναλλακτική προσέγγιση για τη διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης στα τρόφιμα διότι έχουν το πλεονέκτημα έναντι των καλλιεργητικών να περιγράφουν όχι μόνο τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στα θρεπτικά υλικά αλλά και αυτούς οι οποίοι

είναι αδύνατον να καλλιεργηθούν ή γενικότερα αυτούς που διαφεύγουν των καλλιεργητικών τεχνικών (Olofsson *et al.* 2007, Schirmer *et al.* 2009, Rasolofo *et al.* 2010). Οι Rasolofo *et al.* (2010) με ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA, κλωνοποίηση και αλληλούχιση έπειτα από εκχύλιση DNA κατευθείαν από γάλα αναφέρουν βακτήρια τα οποία δεν είχαν βρεθεί έως τότε με την εφαρμογή άλλων τεχνικών (μοριακών, κλασσικών). Οι Olofsson *et al.* (2007) μελετώντας τη μικροβιακή σύνθεση καπνιστού σολομού σε συσκευασία κενού με την ίδια τεχνική με τους παραπάνω ερευνητές αναφέρουν ότι το 10% των βακτηρίων ανήκε σε μη ταυτοποιημένα, άγνωστα βακτήρια. Επιπλέον, οι παραπάνω ερευνητές αναφέρουν ότι ανάμεσα στα *Photobacterium* spp. που αποτελούν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς στον καπνιστό σολομό, δεν είναι μόνο τα *P. phosphoreum* αλλά και άλλα είδη που δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη.

Σήμερα, οι μοριακές τεχνικές, ιδιαίτερα όταν το γονίδιο στόχος είναι το 16S rRNA, αποτελούν σημαντικό εργαλείο για μελλοντική χρήση στην τεκμηρίωση της διασφάλιση της ποιότητας και της ασφάλειας ενός τροφίμου (Martinez *et al.* 2011). Τα τελευταία χρόνια, λίγες σχετικά μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό τη διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης στα αλιεύματα (βλέπε Εισαγωγή Κεφ.3). Η ύπαρξη και άλλων μικροοργανισμών που δύναται να συνεισφέρουν στην αλλοίωση αποτελεί σημαντικό πεδίο για μελέτη στις μέρες μας. Με την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού αυτού και περαιτέρω με τον ενοφθαλμισμό του σε υποστρώματα-μοντέλα που προσομοιάζουν υπόστρωμα ιχθύος, είναι δυνατόν να επιτευχθεί ο προσδιορισμός της αλλοιωγόνου δυναμικής του, δηλαδή της ικανότητάς του να παράγει ουσίες που οδηγούν στην οργανοληπτική απόρριψη.

1.3. Χημικοί δείκτες αλλοίωσης

Ένας εναλλακτικός τρόπος προσδιορισμού της μικροβιακής αλλοίωσης είναι η εκτίμηση της αλλοιωγόνου δυναμικής των μικροοργανισμών μέσω του προσδιορισμού των μεταβολικών τους προϊόντων που προκαλούν την αλλοίωση και την οργανοληπτική απόρριψη. Περαιτέρω, είναι δυνατό η χρήση τέτοιων μεταβολιτών ως χημικοί δείκτες μικροβιολογικής αλλοίωσης. Οι κυριότεροι χημικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι το ολικό πτητικό βασικό άζωτο (TVB-N), η τριμεθυλαμίνη (TMA) ή άζωτο της τριμεθυλαμίνης (TMA-N).

Το TVB-N παράγεται σε σημαντικές ποσότητες μόνο κατά τα στάδια της προχωρημένης αλλοίωσης των ιχθύων και δεν θεωρείται αξιόπιστη ουσία για την αξιολόγηση της φρεσκάδας των ψαριών στο αρχικό στάδιο της αποθήκευσης (Oehlenschläger 1992, 1997a,b). Επιπλέον, η τιμή του TMA είναι χαμηλή έως και μηδαμινή σε ιχθύες τσιπούρας που έχουν αλιευθεί από ελληνικά ύδατα (Drosinos & Nychas 1996, Drosinos *et al.* 1997, Koutsoumanis & Nychas 1999, 2000). Οι βιογενείς αμίνες γενικότερα απαντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στους ιχθύες της Μεσογείου (Koutsoumanis *et al.* 1999). Έτσι, η αδυναμία του ακριβή προσδιορισμού της αλλοίωσης (στάδιο αλλοίωσης) με την εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων έχει οδηγήσει στην αναζήτηση πιο αξιόπιστων μεθόδων.

Άλλες ουσίες, κυρίως πτητικές, όπως είναι οι αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, θειώδη συστατικά, αμμωνία, εστέρες και τα οργανικά οξέα είναι οι κυριότερες ομάδες μικροβιακών μεταβολιτών που παράγονται από τη δράση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα ιχθυηρά (Leisner & Gram 1999). Πιο συγκεκριμένα, τα *Pseudomonas* spp. ως αερόβιοι μικροοργανισμοί οξειδώνουν την γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ (Drosinos & Board 1994) και αφού το αφομοιώσουν, συνεχίζουν διασπώντας τα

αμινοξέα προς NH_3 και άλλες πτητικές αζωτούχες ενώσεις (Dainty 1996). Το *S. putrefaciens* παράγει TMA, H_2S και σχηματίζει σουλφίδια από τις πρόδρομες ουσίες όπως οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO), κυστεΐνη και μεθειονίνη, αντίστοιχα, και αποκαρβοξυλιώνει αμινοξέα όπως ισταμίνη και τυροσίνη με αποτέλεσμα την παραγωγή των αντίστοιχων βιογενών αμινών (ισταμίνη και τυραμίνη) (Gram & Huss 1996). Τα Enterobacteriaceae παράγουν κυρίως TMA από TMAO, κετόνες, αλδεύδες, εστέρες και αμμωνία από αμινοξέα, οξέα από υδατάνθρακες κ.α. (Leisner & Gram 1999). Η κυριαρχία των *B. thermosphacta* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ένα τρόφιμο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή οργανικών οξέων (Blickstad 1983, Blickstad & Molin 1984, Nychas & Arkoudelos 1991, Drosinos & Board 1995, Drosinos & Nychas 1997). Οι μεταβολίτες που παράγονται από τη δράση των μικροοργανισμών κατά την αλλοίωση των αλιευμάτων είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές όπως αυτή της ‘αμμωνιάς’ από TMA και αμμωνία, του ‘πιπεριού’ από ισταμίνη, του ‘σάπιου’ από καδαβερίνη, πουτρεσκίνη και τυραμίνη, του ‘θειαφιού’ από θειούχες πτητικές ενώσεις, της ‘βύνης’ από μικρού μοριακού βάρους αλκοόλες, αλδεύδες και κετόνες (Dalgaard *et al.* 2003). Επίσης, η παραγωγή οργανικών οξέων από τα παραπάνω θετικά κατά Gram βακτήρια (*B. thermosphacta* και οξυγαλακτικά) έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της οξύτητας στο μέσο της ανάπτυξής τους όταν σε αυτό αποτελούν την κυρίαρχη αλλοιωγόνο σύνθεση (Dainty 1996). Αντίθετα, στην περίπτωση των *Pseudomonas* spp. και *S. putrefaciens* όπου παρατηρείται η παραγωγή πτητικών αζωτούχων βάσεων, πτητικών οξέων, η αύξηση της συγκέντρωσης αμινοξέων, η παραγωγή υδροθείου και άλλων (Miller *et al.* 1973a,b, Dainty *et al.* 1989, Drosinos & Nychas 1997, Koutsoumanis & Nychas 1999), το αποτέλεσμα είναι η αύξηση του pH στο μέσο της ανάπτυξής τους.

Ο προσδιορισμός των διάφορων πτητικών ουσιών, συμπεριλαμβάνοντας και τα οργανικά οξέα, που παράγονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης ενός αλιευτικού προϊόντος και ευθύνονται για τις διάφορες χαρακτηριστικές οσμές σε αυτό αποτελεί τη νέα τάση για μελέτη. Οι πτητικές ουσίες έχουν αρχίσει να μελετούνται για να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης διότι μεταβάλλονται σημαντικά μεταξύ της πρώτης ημέρας και της ημέρας απόρριψης κατά τη διάρκεια συντήρησης των αλιευμάτων (Joffraud *et al.* 2001, Jorgensen *et al.* 2001, Chung *et al.* 2002, Duflos *et al.* 2006, Edirisinghe *et al.* 2007, Soncin *et al.* 2008, Selli & Cayhan 2009, Iglesias *et al.* 2010). Για να χαρακτηριστεί κάποια ουσία από αυτές ως χημικός δείκτης θα πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις όπως α) να βρίσκεται σε μικρή ή μηδενική συγκέντρωση στο τρόφιμο όταν αυτό είναι υψηλής ποιότητας β) να αυξάνεται η συγκέντρωσή του όσο προχωρά η αλλοίωση γ) να μην επηρεάζεται η συγκέντρωσή του από τη διαδικασία επεξεργασίας δ) να είναι προϊόν μεταβολισμού του ειδικού αλλοιωγόνου οργανισμού ε) η μέθοδος προσδιορισμού να είναι ταχεία, εύκολη και ακριβής (Fields *et al.* 1986).

1.4. Μικροβιακές αλληλεπιδράσεις

Η επιλογή των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης δεν εξαρτάται μόνο από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες αλλά και από τις μικροβιακές αλληλεπιδράσεις. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να είναι είτε συνεργιστικές ή αλληλεπιδράσεις ανταγωνισμού μεταξύ των μικροοργανισμών.

Στις συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις, οι μικροοργανισμοί, κυρίως τα αρνητικά Gram βακτήρια, προσπαθούν να συντονίσουν την έκφραση ορισμένων φαινοτυπικών

χαρακτηριστικών (π.χ. υδρολυτικά ένζυμα) μέσω βακτηριακής επικοινωνίας με χημικά σήματα (Quorum sensing) (Fuqua *et al.* 1996, Eberl *et al.* 1999, Gram *et al.* 2002).

Στις αλληλεπιδράσεις ανταγωνισμού, ο ανταγωνισμός για θρεπτικά όπως είναι η γλυκόζη και για χημικά συστατικά όπως είναι ο σίδηρος, επιδρούν στη φυσιολογική συμπεριφορά των μικροοργανισμών (Drosinos & Board 1994, Lambropoulou *et al.* 1996, Drosinos *et al.* 1997, Gram & Dalgaard 2002). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα *Pseudomonas* sp., το *S. putrefaciens* και γενικότερα τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια διακρίνονται για τις ανταγωνιστικές τους ιδιότητες παράγοντας διάφορες ουσίες έναντι των υπολοίπων μικροοργανισμών κατά την αλλοίωση των ιχθυηρών. Τα οξυγαλακτικά παράγουν κυρίως βακτηριοσίνες (Adams & Nicolaidis 1997), τα *Pseudomonas* sp. και το *S. putrefaciens* παράγουν κυρίως σιδηροφόρες ουσίες (Gram 1993, Gram 1994, Cheng *et al.* 1995, Laine *et al.* 1996), και γενικότερα, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια παράγουν ουσίες όπως είναι η NH₃ και η TMA, οι οποίες δρουν τοξικά έναντι των υπολοίπων μικροοργανισμών. Ως αποτέλεσμα, οι μικροοργανισμοί αλληλεπιδρούν και επηρεάζει ο ένας την αύξηση του άλλου (Boddy & Wimpenny 1992).

Οι Tsigarida *et al.* (2003) μελέτησαν την αύξηση και τη μεταβολική δραστηριότητα, συγκεκριμένα την παραγωγή οργανικών οξέων, των μικροοργανισμών *S. putrefaciens*, *B. thermosphacta* και *Pseudomonas* sp. σε μονοκαλλιέργειες και σε συγκαλλιέργειες σε μοντέλα υποστρώματα (gel cassettes) που περιείχαν 0,1 % γλυκόζη στους 5°C. Η αύξηση των *Pseudomonas* sp. βρέθηκε να ευνοεί την αύξηση του *B. thermosphacta* σε κοινή καλλιέργεια των *Pseudomonas* sp. - *B. thermosphacta*, ενώ αντίθετα βρέθηκε να εμποδίζει την αύξηση των *S. putrefaciens* σε κοινή καλλιέργεια των *Pseudomonas* sp. - *S. putrefaciens*. Παρόλο που τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη βιβλιογραφία, έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση και η μεταβολική δραστηριότητα των

μικροοργανισμών διαφέρει σημαντικά μεταξύ των εργαστηριακών υποστρωμάτων και του ιστού των ιχθύων (Koutsoumanis & Nychas 1999). Επομένως, η μελέτη της αύξησης των μικροοργανισμών σε υποστρώματα-μοντέλα τα οποία θα προσομοιάζουν, το δυνατότερον, τη σάρκα των ιχθύων, αποτελεί ανάγκη για τον επιτυχή προσδιορισμό της αλλοιωγόνου δυναμικής τους.

1.5. Παθογόνοι μικροοργανισμοί στα αλιευτικά προϊόντα

Τα αλιεύματα και τα προϊόντα τους είναι δυνατό να επιμολυνθούν με παθογόνους μικροοργανισμούς σε διάφορα στάδια της παραγωγικής αλυσίδας τους, με αποτέλεσμα να είναι επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία. Η αύξηση ή όχι των παθογόνων μικροοργανισμών εξαρτάται από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις με τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (Buchanan & Bagi 1999, Gram *et al.* 2002, Skandamis & Nychas 2002).

Ορισμένα παθογόνα βακτήρια όπως τα *C. botulinum* type E, παθογόνα στελέχη *Vibrio* spp. και *Aeromonas* spp. απαντώνται φυσικώς στα υδάτινα οικοσυστήματα και άλλα όπως τα *Clostridium botulinum* type A, B και *L. monocytogenes* απαντώνται γενικότερα στο περιβάλλον (Huss *et al* 2000). Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να βρεθούν και στους ιχθύες συνήθως σε χαμηλούς πληθυσμούς. Ορισμένα άλλα βακτήρια όπως τα *Salmonella* spp. και διάφορα άλλα εντερικά παθογόνα όπως τα *Shigella* spp., παθογόνα στελέχη του *Escherichia coli*, κ.ά. είναι δυνατόν να βρεθούν στα υδάτινα οικοσυστήματα και περαιτέρω στους ιχθύες από κόπρανα ανθρώπων και ζώων. Επιπλέον, μικροοργανισμοί όπως το *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *C. perfringens* και εντερικά παθογόνα μπορεί να βρεθούν στα αλιευτικά προϊόντα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τους (Feldhusen 2000). Τα παθογόνα βακτήρια ως επί το

πλείστον απαιτούν θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 5 °C για την αύξησή τους. Επιπλέον, τα βακτήρια αυτά ανταγωνίζονται με τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς οι οποίοι πολλαπλασιάζονται συγκριτικά πιο γρήγορα σε χαμηλές θερμοκρασίες (Tsigarida *et al.* 2000). Έτσι, τα επιμολυσμένα προϊόντα πιθανόν να αλλοιωθούν πριν από την παραγωγή της τοξίνης ή την αύξηση μεγάλου αριθμού παθογόνων. Όταν τα προϊόντα αυτά μαγειρευθούν εξαλείφεται σχεδόν ο κίνδυνος πρόκλησης τροφοδηλητηριάσεων (Feldhusen 2000). Οι μικροοργανισμοί της φυσικής μικροβιακής σύνθεσης είναι δυνατό να παρεμποδίσουν ή να ευνοήσουν την αύξηση των παθογόνων μικροοργανισμών (Jay 1996, Tsigarida *et al.* 2000, Vold *et al.* 2000). Οι Tsigarida *et al.* (2000), μελετώντας την επίδραση της συσκευασίας σε κενό (vacuum packaging), σε MAP (40%CO₂/30%O₂/30%N₂) και σε αέρα στην αύξηση / επιβίωση του *L. monocytogenes* σε ιστό βόειου κρέατος, αναφέρουν ότι όταν τα *Pseudomonas* spp. αποτελούν τον κυρίαρχο πληθυσμό (στην αερόβια συσκευασία και σε MAP/ VP σε υψηλής διαπερατότητας φιλμ) ευνοείται η αύξηση του παθογόνου. Σε άλλες όμως συνθήκες (MAP/VP με χαμηλής διαπερατότητας φιλμ) όπου ο κυρίαρχος πληθυσμός είναι το *B. thermosphacta*, δεν παρατηρείται αύξηση του παθογόνου.

Το *L. monocytogenes* είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, αερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο, η παρουσία του οποίου έχει αναφερθεί αρκετές φορές στα αλιεύματα (Jørgensen & Huss 1998, Gram 2001). Οι υψηλοί αριθμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων αποτελούν τον σημαντικότερο παράγοντα που εμποδίζει την αύξηση του παθογόνου αυτού σε ιχθύες σολομού υπό κενό σε χαμηλές θερμοκρασίες (Dalgaard & Jørgensen 1998, Ghalfi *et al.* 2006, Nilsson *et al.* 1999, Brillet *et al.* 2004, Giménez & Dalgaard 2004, Nilsson *et al.* 2004).

Στις συσκευασίες των αλιευμάτων σε MAP, η αύξηση του *L. monocytogenes* πολλές φορές δεν παρεμποδίζεται (Gibson & Davis 1995). Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι η προσθήκη πρόσθετων εμποδίων όπως είναι τα φυσικά ή/και τα χημικά συντηρητικά αποτελούν αποτελεσματική λύση στο παραπάνω πρόβλημα.

1.6. Συντήρηση νωπών ιχθύων

Εξαιτίας των αλλαγών στον τρόπο ζωής, οι καταναλωτές αναζητούν τρόφιμα υψηλής ποιότητας, ασφαλή, χωρίς χημικά συντηρητικά, εύκολα στην χρήση και με όσο το δυνατό μεγαλύτερο εμπορικό χρόνο ζωής (Smid & Gorris 1999). Προκειμένου να ικανοποιηθούν οι απαιτήσεις των καταναλωτών, η διατήρηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών ενός νωπού αλιευτικού προϊόντος από μικροβιολογικής μεριάς ελέγχεται κυρίως με τη μείωση της θερμοκρασίας και με την αποθήκευση σε σύσταση ατμόσφαιρας διαφορετικής του αέρα (MAP), ενώ η προσθήκη και άλλων εμποδίων, όπως είναι οι αντιμικροβιακές ουσίες, εξετάζεται ως μελλοντική πρακτική (Sikorski 1990, Ashie *et al.* 1996, Sivertsvik *et al.* 2002).

1.6.1. Συντήρηση σε συσκευασία αέρα

Η διάρκεια ζωής των νωπών ιχθύων εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού (Brownsell *et al.* 1989) και από τη θερμοκρασία αποθήκευσης (Pastoriza *et al.* 1996). Η αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες και ειδικότερα στον πάγο, αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς τρόπους συντήρησης των ιχθύων (Kyraana *et al.* 1997). Πληθώρα πειραμάτων έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό την εκτίμηση του χρόνου ζωής των ιχθύων σύμφωνα με τις οργανοληπτικές, μικροβιολογικές και χημικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια

συντήρησής τους σε θερμοκρασίες ψύξης (Πίν. 1.1). Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζεται ο εκτιμώμενος χρόνος ζωής των ιχθύων, ιδιαίτερα των ιχθύων της Μεσογείου, όπως είναι η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*). Η διάρκεια ζωής των ιχθύων τσιπούρας κατά τη διάρκεια συντήρησής τους στον πάγο, κυμαίνεται συνήθως από 15 έως 18 ημέρες, ενώ του λαβρακιού από 11 έως 15 ημέρες (Πίν. 1.1). Ο μεγαλύτερος χρόνος ζωής παρατηρήθηκε στο σολομό (*Salmo salar*) από τη Β. Ευρώπη όπου ο χρόνος ζωής εκτιμάται σε 20 ημέρες. Ο χρόνος ζωής μειώνεται σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Η θερμοκρασία των υδάτων από όπου αλιεύονται οι ιχθύες επιδρά σημαντικά στη διάρκεια του χρόνου ζωής τους (Sumner *et al.* 1986). Οι ιχθύες των τροπικών κλιμάτων που συντηρούνται σε πάγο παρουσιάζουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από αυτή των ιχθύων των ψυχρότερων κλιμάτων (Disney 1976, Shewan 1977, Lima dos Santos 1981, Gram 1989). Στο παρελθόν έχει αναφερθεί ότι η διατηρησιμότητα ιχθυηρών από την ανατολική Αφρική ξεπερνά τις τρεις εβδομάδες (Disney *et al.* 1969). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί σύμφωνα με το ότι η μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων που προέρχονται από τροπικά κλίματα αποτελείται από μικρότερο αριθμό ψυχρόφιλων ή ψυχρότροφων μικροοργανισμών από ότι η μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων από τα ψυχρότερα κλίματα (Shewan 1977). Η μικροβιακή σύνθεση των ιχθύων που προέρχονται από τα ψυχρά ύδατα αποτελείται κυρίως από ψυχρότροφους αρνητικούς κατά Gram μικροοργανισμούς, οι οποίοι πιθανόν δεν υπόκεινται θερμικό σοκ με την τοποθέτηση των ιχθύων στον πάγο, με αποτέλεσμα να προσαρμόζονται συντομότερα από αυτούς που εποικούν στους ιχθύες των τροπικών κλιμάτων, να εμφανίζουν υψηλότερους ρυθμούς αύξησης και τελικά ορισμένοι από αυτούς να

φθάνουν συντομότερα σε αριθμητικά επίπεδα που χαρακτηρίζουν την αλλοίωση (Ward & Bai 1988, Ashie *et al.* 1996).

1.6.2. Συντήρηση σε συσκευασία MAP

Παράλληλα με την αποθήκευση των ιχθύων σε χαμηλές θερμοκρασίες, έχουν αναπτυχθεί άλλες τεχνολογίες με σκοπό την διατήρηση της ποιότητας και την επέκταση του εμπορικού χρόνου ζωής των τροφίμων. Μεταξύ αυτών των τεχνολογιών, η συσκευασία σε MAP έχει υιοθετηθεί από ένα μεγάλο αριθμό Βιομηχανιών Τροφίμων στην Ευρώπη (Davies 1995), καθώς είναι αποδεδειγμένο ότι αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές μεθόδους συντήρησης των αλιευτικών προϊόντων, η οποία σε συνδυασμό με θερμοκρασίες ψύξης είναι ικανή να επιμηκύνει τον εμπορικό χρόνο ζωής του προϊόντος (Πίν. 1.2). Τα αέρια που συνθέτουν την ατμόσφαιρα MAP είναι το CO₂, το O₂ και το N₂. Το CO₂ χρησιμοποιείται συνήθως σε υψηλή συγκέντρωση εξαιτίας της βακτηριοστατικής δράσης του. Η χρήση του CO₂ στις συσκευασίες MAP επιμηκύνει σημαντικά τη φάση προσαρμογής και μειώνει τον ειδικό ρυθμό αύξησης των μικροοργανισμών σε αντίθεση με τη συσκευασία αέρα σε χαμηλές θερμοκρασίες (Farber 1991, Nosedá *et al.* 2012). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η επιμήκυνση του εμπορικού χρόνου ζωής του προϊόντος. Ο εμπορικός χρόνος ζωής των αλιευτικών προϊόντων σε MAP είναι δυνατόν να αυξηθεί από μερικές ημέρες έως και μία εβδομάδα ή/και περισσότερο (Pastoriza *et al.* 1998). Οι Pastoriza *et al.* (1998) αναφέρουν ότι ο χρόνος ζωής φιλέτων μπακαλιάρου (*Merluccius merluccius*) στους 0 °C ήταν 7 ημέρες κατά τη συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες (Πίν. 1.1) και 14 ημέρες κατά τη συντήρησή τους υπό συνθήκες MAP (50% CO₂ 5% O₂ 45% N₂) (Πίν.1.2), γεγονός που δείχνει ότι ο χρόνος ζωής αυξήθηκε 100% με τη χρήση του MAP. Το O₂, το οποίο

ευνοεί την αύξηση των αερόβιων μικροοργανισμών που ευθύνονται για την αλλοίωση των αλιευμάτων, χρησιμοποιείται σε χαμηλά επίπεδα (Sivertsvik *et al.* 2002). Το N₂ είναι αδρανές αέριο και δεν επιδεικνύει αντιμικροβιακή δράση. Στη συσκευασία MAP όμως, αντικαθιστά πολλές φορές το O₂ επιβραδύνοντας την οξειδωτική τάγγιση και παρεμποδίζοντας την αύξηση των αερόβιων μικροοργανισμών (Sivertsvik *et al.* 2002).

Η χρήση του CO₂ σε αρκετά υψηλή αναλογία και η έλλειψη O₂ μπορεί να αποτελέσει απειλή για τον καταναλωτή διότι επιτρέπει, υπό συγκεκριμένες συνθήκες συντήρησης, την αύξηση του υποχρεωτικά αναερόβιου παθογόνου βακτηρίου *Clostridium botulinum*. Η χρήση του O₂ είναι απαραίτητη για την παρεμπόδιση της αύξησης του παθογόνου αυτού βακτηρίου (Lannelongue *et al.* 1982). Το CO₂ ακόμη και σε συγκέντρωση 5-10% είναι δυνατόν να αναστείλει την αύξηση των αερόβιων βακτηρίων, τα οποία αναπτύσσονται στα αλιεύματα σε θερμοκρασίες ψύξης και είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση στις συνθήκες αυτές (Dainty 1971). Σύμφωνα με Davies (1997), η συσκευασία σε MAP αν και είναι δυνατόν να επιμηκύνει τον εμπορικό χρόνο ζωής ενός αλιευτικού προϊόντος, παράλληλα μπορεί να επιτρέψει την αύξηση παθογόνων μικροοργανισμών σε επίπεδα μεγαλύτερα από εκείνα που παρατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι δυνατό να αναπτύξουν προσαρμοστικότητα σε αντίξοα περιβάλλοντα (Davies 1997, Farber 2001, Skandamis & Nychas 2002). Η χρήση πρόσθετων εμποδίων όπως είναι τα φυσικά συντηρητικά ή άλλες νεοεμφανιζόμενες τεχνολογίες αποτελούν σημαντικά υποσχόμενα όπλα για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων.

1.6.3. Χρήση Αντιμικροβιακών συστημάτων ως πρόσθετα εμπόδια

Η προσθήκη φυσικών ή χημικών συντηρητικών στα τρόφιμα πολλές φορές αποτελεί έναν επιπλέον τρόπο παρεμπόδισης της αύξησης των αλλοιωγόνων ή/και των παθογόνων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την επέκταση του εμπορικού χρόνου ζωής ή/και τη διασφάλιση της ποιότητας (Skandamis & Nychas 2002, Skandamis *et al.* 2002a,b, Gutierrez *et al.* 2008, Karabagias *et al.* 2011, Khanjari *et al.* 2013).

Τα χημικά συντηρητικά που χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση των τροφίμων είναι κυρίως το βενζοϊκό, οξικό, σορβικό, γαλακτικό, προπιονικό οξύ και τα άλατά τους, καθώς και τα νιτρικά, νιτρώδη και θειώδη άλατα. Τα φυσικά συντηρητικά που χρησιμοποιούνται για τη βιοσυντήρηση των τροφίμων είναι τα αιθέρια έλαια όπως ρίγανη, μέντα, γαρύφαλλο, κανέλλα, οι βακτηριοσίνες όπως η νισίνη και οι προστατευτικές καλλιέργειες όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια.

Η χρήση των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών από φυτά, όπως τα αιθέρια έλαια, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της αντιμικροβιακής αλλά και αντιοξειδωτικής τους δράσης (Nychas *et al.* 2003). Η χρήση ρίγανης, ιδιαίτερα, έχει βρεθεί να επιδρά σημαντικά στην αύξηση των εντεροβακτηρίων, οξυγαλακτικών, *B. cereus* και *Pseudomonas* spp. σε έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά (Gutierrez *et al.* 2008), στην αύξηση του *Salmonella* Typhimurium και των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε κρέας αποθηκευμένο υπό διάφορες ατμόσφαιρες σε ψύξη (Skandamis *et al.* 2002a), στην αύξηση των *S. Enteritidis* PT4 και *Escherichia coli* O157:H7 NCTC12900 σε ταραμοσαλάτα και μελιτζανοσαλάτα (Skandamis *et al.* 2002b). Επιπλέον, η χρήση συντηρητικών φυτικής και ζωικής προέλευσης όπως η ρίγανη και η χιτοζάνη αντίστοιχα, καθώς και ο συνδυασμός αυτών, επιδρούν στην αύξηση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα αλιεύματα επιμηκύνοντας σημαντικά τον εμπορικό χρόνο ζωής

τους (Vatavali *et al.* 2012). Ο συνδυασμός των δύο αυτών ουσιών βρέθηκε να επιδρά και στην αύξηση του *L. monocytogenes* σε φιλέτα κοτόπουλου (Khanjari *et al.* 2013). Παρόλα αυτά, η χρήση των αιθέριων ελαίων στα τρόφιμα είναι σχετικά περιορισμένη λόγω της οσμής τους η οποία επιδρά σημαντικά στις οργανοληπτικές ιδιότητες του τροφίμου ειδικά εάν χρησιμοποιηθούν σε συγκεντρώσεις όπου επιδεικνύουν σημαντική αντιμικροβιακή δράση (Nychas *et al.* 2003).

Οι βακτηριοσίνες όπως είναι η νισίνη αποτελούν έναν άλλο αποτελεσματικό τρόπο έναντι της αύξησης των αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιεύματα (Luo & Pan 2004, Thomas & Delves-Broughton 2005) και στα τρόφιμα γενικότερα (Boziaris *et al.* 1998, Boziaris & Adams 1999, 2000). Επιπλέον, βακτήρια τα οποία παράγουν βακτηριοσίνες, όπως είναι τα στελέχη *Carnobacterium divergens* V41 και *Carnobacterium piscicola* V1 (*Carnobacterium maltaromaticum*) των οξυγαλακτικών βακτηρίων, έχουν προταθεί ότι μπορούν να χρησιμοποιούνται ως προστατευτικές καλλιέργειες έναντι του *L. monocytogenes* στα αλιεύματα (Brillet *et al.* 2004).

Η προσθήκη των αλάτων οργανικών οξέων παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον στα τρόφιμα λόγω της αντιμικροβιακής (Zhuang *et al.* 1996, Al-Dagal & Bazaraa 1999, Thomas 2000, Sallam 2007, FDA 2009) και αντιοξειδωτικής τους δράσης (Lee *et al.* 2005). Τα άλατα σορβικό κάλιο, βενζοϊκό νάτριο και διοξικό νάτριο έχουν εγκριθεί ως συντηρητικά τροφίμων (Surekha & Reddy 2000). Έχει αναφερθεί ότι η δράση των αλάτων αυτών επιμηκύνει τον εμπορικό χρόνο ζωής ή/και παρεμποδίζει την αύξηση του *L. monocytogenes* ή/και του *Salmonella* στο κοτόπουλο (González-Fanzos & Dominguez, 2007, Economou *et al.* 2009), στο κρέας (Zhang & Mustapha 1999, Ariyapitipun *et al.* 2000) και στα αλιεύματα (Neetoo *et al.* 2008, Wan Norhana *et al.*

2012). Οι Wan Norhana *et al.* (2012) αναφέρουν ότι τα άλατα αυτά σε συνδυασμό ή όχι με νισίνη και EDTA επιδρούν στην αύξηση του *L. monocytogenes* και της ενδογενούς μικροβιακής σύνθεσης σε γαρίδες που μετά την εμβάπτισή τους αποθηκεύθηκαν σε συσκευασία κενού στους 4°C. Η επίδραση των αλάτων αυτών στη μικροβιακή σύνθεση αλλά και στην αύξηση των παθογόνων μικροοργανισμών στα αλιεύματα είναι ελάχιστα γνωστή (Neetoo *et al.* 2008, Wan Norhana *et al.* 2012). Επιπλέον, ελάχιστη είναι η γνώση της επίδρασης και άλλων αλάτων οργανικών οξέων όπως το οξικό νάτριο, γαλακτικό νάτριο και κιτρικό νάτριο στην τύχη των μικροοργανισμών στα αλιεύματα (Zhuang *et al.* 1996, Boskou & Debevere 2000, Sallam 2007).

Η επίδραση των συνθηκών επεξεργασίας και συντήρησης στην τύχη/συμπεριφορά των μικροοργανισμών είναι πρωτεύοντος σημασίας για την παραγωγή και διάθεση ποιοτικών και υγιεινών αλιευμάτων. Η εφαρμογή των διαφορετικών μεθόδων συντήρησης απαιτεί διαρκή παρακολούθηση των συνθηκών και εις βάθος γνώση της ποσοτικής συσχέτισης αυτών των συνθηκών με τους αναπτυσσόμενους μικροβιακούς πληθυσμούς και κατ' επέκταση με το χρόνο ζωής και την ασφάλεια των αλιευμάτων.

1.7. Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής

Το αντικείμενο της διδακτορικής διατριβής είναι

1. Ο προσδιορισμός της επικρατούσας μικροβιακής σύνθεσης των υπό εξέταση προϊόντων υπό διαφορετικές συνθήκες συντήρησης με χρήση κλασσικών και μοριακών (καλλιεργητικών και μη καλλιεργητικών) τεχνικών. Συγκεκριμένα, η ταυτοποίηση βακτηρίων του ολικού μικροβιακού πληθυσμού με ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA και αλληλούχιση (sequencing) σε απομονωμένες αποικίες μικροοργανισμών από τα

τρουβλία (μοριακές-καλλιεργητικές τεχνικές) και διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης με ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA, κλωνοποίηση και αλληλούχιση σε προκαρυωτικό DNA απευθείας από τη σάρκα των ιχθύων (μοριακές-μη καλλιεργητικές τεχνικές).

2. Η μελέτη των παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων από τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (ολικό πτητικό άζωτο, τριμεθυλαμίνη, βιογενείς αμίνες, πτητικοί μεταβολίτες συμπεριλαμβάνοντας τα οργανικά οξέα) με κλασσικές και μοντέρνες (συσκευή προσδιορισμού ολικού πτητικού αζώτου, φασματοφωτόμετρο, HPLC, GC-MS SPME) κατά περίπτωση χημικές αναλύσεις με σκοπό να αξιολογηθούν ως πιθανοί χημικοί δείκτες αλλοίωσης.

3. Η αποσαφήνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αλλοιωγόνου μικροβιακού πληθυσμού και του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*.

4. Η μελέτη της αλλοιωγόνου μικροβιακής αλληλουχίας καθώς και η τύχη (αύξηση-επιβίωση-αδρανοποίηση) του *L. monocytogenes* υπό την επίδραση κιτρικών αλάτων σε πραγματικά αλιευτικά προϊόντα σε διαφορετικές συνθήκες συντήρησης.

Η διατριβή αυτή έχει ως γενικό στόχο μια ολοκληρωμένη προσέγγιση στο θέμα ποιότητα και ασφάλεια των ελληνικών αλιευμάτων και συγκεκριμένα της τσιπούρας. Η διερεύνηση της ύπαρξης και άλλων μικροοργανισμών που πιθανόν να συμμετέχουν στην αλλοίωση, η μελέτη των παραγόμενων μικροβιακών μεταβολιτών και οι μεταβολές της μικροβιακής αλληλουχίας καθώς και η τύχη του *L. monocytogenes* λόγω της επίδρασης διαφορετικών συνθηκών κατά την αποθήκευση και των μικροβιακών αλληλεπιδράσεων θα βοηθήσει στην εξαγωγή συμπερασμάτων τα οποία θα έχουν επιστημονική σημασία και πρακτική εφαρμογή, ώστε να βοηθηθεί η Ελληνική Βιομηχανία στο να παρέχει προϊόντα ασφαλέστερα και με μεγαλύτερο εμπορικό χρόνο ζωής.

Πίνακας 1.1. Διάρκεια ζωής των ιχθυηρών κατά τη συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες σε διάφορες θερμοκρασίες συντήρησης.

Προϊόν	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια ζωής (ημέρες)	Βιβλιογραφική Αναφορά
Τσιπούρα	0 (Πάγος)	17	Kyрана <i>et al.</i> 1997
	0 (Πάγος)	15	Huidobro <i>et al.</i> 2000 Cakli <i>et al.</i> 2007
	0 (Πάγος)	18	Ozogul <i>et al.</i> 2007
	0 (Πάγος)	16	Lougovois <i>et al.</i> 2003
	0 (Πάγος)	16	
	0	8-9	Koutsoumanis & Nychas 2000
	5	4	
	10	2	
15	1		
Λαβράκι	0 (Πάγος)	12-13	Taliadorou <i>et al.</i> 2003
	0 (Πάγος)	15-16	Kyрана & Lougovois 2002
	0 (Πάγος)	15	Cakli <i>et al.</i> 2007
	0	9	Koutsoumanis <i>et al.</i> 2002
	5	4	
	10	2	
	15	1	
Λαβράκι, απεντερωμένο	0 (Πάγος)	8	Papadopoulos <i>et al.</i> 2003
Λαβράκι, φιλέτο	0 (Πάγος)	8-9	Taliadorou <i>et al.</i> 2003
Μπακαλιάρος, φιλέτο	0	7	Pastoriza <i>et al.</i> 1998
Σολομός Ατλαντικού, φιλέτο	-2	21	Sivertsvik <i>et al.</i> 2003
	4	7	
Σολομός	0 (Πάγος)	20	Sveinsdottir <i>et al.</i> 2002
	4	1,96	Corbo <i>et al.</i> 2005
	8	1,76	
	12	1,54	
Κολιός	3	8	Stamatis & Arkoudelos 2007
	6	7	
Καλκάνι εκτροφής	0 (Πάγος)	19	Rodriguez <i>et al.</i> 2003
Καλκάνι	0 (Πάγος)	12-15	Ozogul <i>et al.</i> 2006
Σκουμπρί	0 (Πάγος)	10	Tzikas <i>et al.</i> 2007
Μπλε σκουμπρί	0 (Πάγος)	7	
Γόπα	0	7	Koutsoumanis & Nychas 1999
	3	4	
	7	2,5	
	10	1,8	
Σκουμπρί	4±1	1	Mol <i>et al.</i> 2007
Μπακαλιάρος	4±1	2	
Γάυρος	4±1	2	
Ιριδίζουσα πέστροφα	4±1	3	
Κολιός	4	9	
Τόνος	0	12	Guizani <i>et al.</i> 2005

	8	5	
	20	1	
Ευρωπαϊκό χέλι	0 (Πάγος) 3±1	12-14 5-7	Ozogul <i>et al.</i> 2005
Σαρδέλα	4	3	Ozogul <i>et al.</i> 2004
Χορτοφάγος κυπρίνος	0 (Πάγος)	13-16	Scherer <i>et al.</i> 2006
Μύδια	4	8-9	Goulas <i>et al.</i> 2005
Κοτσομούρα	4	6	Pournis <i>et al.</i> 2005
Γατόψαρο, φιλέτο	4	7	Nosedá <i>et al.</i> 2012

Πίνακας 1.2 Διάρκεια ζωής των ιχθυηρών από τα ύδατα της ψυχρής και της εύκρατης ζώνης κατά τη συντήρησή τους υπό συνθήκες MAP σε διάφορες θερμοκρασίες συντήρησης.

Προϊόν	Ατμόσφαιρα % CO ₂ : O ₂ : N ₂	T (°C)	Διάρκεια ζωής (ημέρες)	Βιβλιογραφική Αναφορά
Μπακαλιάρος, φιλέτο	60 : 10 : 30	6	4-5	Debevere & Boskou 1996
	60 : 20 : 20			
	60 : 30 : 10			
	60 : 40 : 0			
Μπακαλιάρος, φιλέτο	50 : 5 : 45	0	14	Pastoriza <i>et al.</i> 1998
Σολομός Ατλαντικού, φιλέτο	60 : 0 : 40	-2	24	Sivertsvik <i>et al.</i> 2003
	60 : 0 : 40	4	10	
Μπακαλιάρος, φιλέτο	30 : 5 : 65	4	5,42	Corbo <i>et al.</i> 2005
	20 : 80 : 0	4	2,62	
	30 : 5 : 65	8	4,99	
	20 : 80 : 0	8	2,62	
	30 : 5 : 65	12	2,02	
	20 : 80 : 0	12	1,02	
Μύδια	50 : 0 : 50	2±1	5	Caglak <i>et al.</i> 2008
	80 : 0 : 20	2±1	8	
	65 : 0 : 35	2±1	8	
	50 : 0 : 50	4	11-12	Goulas <i>et al.</i> 2005
	40 : 30 : 30	4	14-15	
80 : 0 : 20	4			
Κολιός	50 : 0 : 50	3	12	Stamatis & Arkoudelos 2007
	50 : 0 : 50	6	10	
Λαβράκι, απεντερωμένο	50 : 30 : 20	3	9	Torrieri <i>et al.</i> 2006
Κοτσομούρα	20 : 10 : 70	4	8	Pournis <i>et al.</i> 2005
	60 : 10 : 30	4	10	
Λαβράκι, φιλέτο	40 : 10 : 50	4	10	Masniyom <i>et al.</i> 2002
	60 : 0 : 40	4	18	
	60 : 10 : 30			
	60 : 20 : 20			
	80 : 0 : 20	4	21	
80 : 10 : 10				
80 : 20 : 0				
Σαρδέλα	35 : 5 : 60	2	6	Erkan <i>et al.</i> 2006
	70 : 5 : 25	2	8	
	70 : 5 : 25	4	12	
	60 : 0 : 40	4	12	

Γατόψαρο, φιλέτο	50 : 0 : 50	4	12	Nosedá <i>et al.</i> 2012
	50 : 50 : 0	4	14	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μικροβιολογικά υλικά και χημικά αντιδραστήρια

Τα μικροβιολογικά υλικά προέρχονταν από την LAB M (Lancashire, UK), εκτός από το STAA (streptomycin sulphate, thallus acetate, cycloheximide actidione agar) το οποίο προέρχονταν από την Biolife Italiana srl (Milano, Italy). Το Iron Agar (IA) προετοιμάστηκε σύμφωνα με τους Gram *et al.* (1987) και περιείχε τα παρακάτω: peptone 20 g l⁻¹, meat extract 3.0 g, yeast extract 3.0 g l⁻¹, ferric citrate 3.0 g l⁻¹, sodium thiosulphate 0.3 g l⁻¹, NaCl 5 g, L-cysteine 0.6 g l⁻¹, agar 14 g l⁻¹. Το pH ρυθμίσθηκε στο 7.4. Τα χημικά αντιδραστήρια προέρχονταν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

2.2 Απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών

Οι μικροοργανισμοί που απαριθμήθηκαν ήταν α) Ολικός Μικροβιακός Πληθυσμός σε TSA (Tryptone Soy Agar) μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 48-72 ώρες, β) βακτήρια που παράγουν H₂S σε IA, με καταμέτρηση μόνο των μαύρων αποικιών, μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 72 ώρες, γ) Enterobacteriaceae σε VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar) με καταμέτρηση των μωβ αποικιών με δακτύλιο, μετά από επώαση στους 37° C για 24 ώρες, δ) Οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS Agar (Mann, Rogosa, Sharpe agar), με καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25°C για 72 ώρες, ε) *Pseudomonas* spp. σε CFC Pseudomonas Agar (Cetrimide-Fucidin-Cephaloridine agar) με καταμέτρηση των αποικιών, μετά από επώαση στους 25°C για 48 ώρες και ζ) *B. thermosphacta* σε STAA Agar (Streptomycin Sulfate Thallous Acetate Agar) με καταμέτρηση των αποικιών κίτρινου χρώματος μετά από επώαση στους 25°C για 48-72 ώρες. Η απαρίθμηση του *L.*

monocytogenes πραγματοποιήθηκε σε Palcam agar και επώαση στους 37°C για 24 ώρες.

Η απαρίθμηση των μικροοργανισμών των Enterobacteriaceae και των οξυγαλακτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης, ενώ του Ολικού Μικροβιακού Πληθυσμού, *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta* και του *L. monocytogenes* με την τεχνική της επίστρωσης.

2.3 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων

Οι κινητικές παράμετροι των πληθυσμών υπολογίσθηκαν χρησιμοποιώντας το πρωτογενές μοντέλο του Baranyi. Οι παράμετροι αυτές ήταν: η φάση προσαρμογής (lag time), ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (μ_{max}) και ο τελικός μικροβιακός πληθυσμός (N_{max}). Η προσαρμογή των δεδομένων που απαριθμήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία στο μοντέλο του Baranyi έγινε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Dmfit (Institute of Food Research, Reading, UK) (Baranyi & Roberts 1994).

2.4 Στατιστική επεξεργασία

Για τον έλεγχο των διαφορών μεταξύ των μέσων όρων των μικροβιακών πληθυσμών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα υπολογιστικά φύλλα Excel ή το STATISTICA 6.0 ανάλογα την περίπτωση, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

2.5. Οργανοληπτική αξιολόγηση

Η οργανοληπτική αξιολόγηση για τους ολόκληρους ιχθύες έγινε βάση των κριτηρίων που περιγράφονται στο Multilingual Guide to EU Freshness Grades for

Fishery Products (Howgate *et al.* 1992) (Πίν. 2.1). Για τα φιλέτα, έγινε αξιολόγηση των χαρακτηριστικών εμφάνιση, συνεκτικότητα, οσμή κατά ISO 8586-1 (1983) (Πίν. 2.2). Η οργανοληπτική εξέταση πραγματοποιούνταν σε κάθε δειγματοληψία πριν την έναρξη των αναλύσεων. Οι κριτές (panel) αποτελούνταν από πέντε (5) άτομα. Κάθε προϊόν απορρίπτονταν όταν οι τρεις (3) από τους πέντε (5) κριτές το αξιολογούσαν ως ακατάλληλο (υποβαθμισμένο αλλά μη αποδεκτό) για κατανάλωση. Η βαθμολογία για κάθε χαρακτηριστικό προέκυψε από τους μέσους όρους των πέντε (5) κριτών.

Πίνακας 2.1 Κριτήρια αξιολόγησης της ποιότητας με τις αισθήσεις σε ολόκληρους ιχθύες τσιπούρας

	Άριστο E	Πολύ καλό A	Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό B	Υποβαθμισμένο αλλά μη αποδεκτό C
Δέρμα	Λαμπερό, στιλπνό, δέρμα με ιριδισμούς, χωρίς αποχρωματισμούς	Λαμπερό δέρμα με ελαφρά απώλεια λαμπρότητας, ελαφρά ιριδίζον	Αισθητή απώλεια λαμπρότητας μερικώς αποχρωματισμένο	Δέρμα αρκετά Θαμπό, αποχρωματισμένο
Εξωτερική βλέννα	Διαφανής ή υδαρής λευκή	Γαλακτώδης	Γκριζοκιτρινωπή ελαφρά κολλώδης	Καφέ – κιτρινωπή, έντονα κολλώδης και παχύρρευστη
Μάτια	Κυρτά, μαύρη κόρη, διαφανής κερατοειδής	Επίπεδα, κόρη ελαφρά θαμπή, κερατοειδής ελαφρά οπαλίζον	Ελαφρά κοίλα, γκριζα κόρη, θαμπός κερατοειδής	Κοίλα, γκριζα κόρη, θαμπός ελαφρά αποχρωματισμένος κερατοειδής
Εμφάνιση βραγχίων	Κόκκινα λαμπερά, διαφανής βλέννα	Ρόδινα ελαφρά, ελαφρά θολή βλέννα	Γκριζα – καφέ, αποχρωματισμένα, βλέννα θολή	Καφέ, βλέννα θολή και παχύρρευστη
Οσμή βραγχίων και Εσωτερικές Οσμές	Έντονα θαλασινή	Ελαφρά θαλασινή	Ούτε θαλασινή, ούτε δυσάρεστη	Δυσάρεστη

Πίνακας 2.2 Κριτήρια αρεσκείας για την αξιολόγηση της ποιότητας με τις αισθήσεις σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας

	5 ΒΑΘΜΟΙ (Άριστο)	4 ΒΑΘΜΟΙ (Πολύ καλό)	3 ΒΑΘΜΟΙ (Υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό)	2 ΒΑΘΜΟΙ (Υποβαθμισμένο αλλά μη αποδεκτό)	1 ΒΑΘΜΟΣ (Αλλοιωμένο)
Εμφάνιση	Ημιδιαφανές, γυαλιστερό	Ελαφριά έλλειψη λαμπρότητας	Αισθητή απώλεια λαμπρότητας	Θαμπό, ξεθωριασμένο, αιματοβαμμένο	Εξαιρετικά θαμπό, ξεθωριασμένο, αιματοβαμμένο
Συνεκτικότητα σάρκας	Σφικτή	Λιγότερο σφικτή	Ελαφριά μαλακή	Αρκετά μαλακή	Πολύ μαλακή, διαλύεται
Οσμή	Έντονα θαλασσινή	Ελαφρά θαλασσινή	Ούτε θαλασσινή, ούτε δυσάρεστη	Δυσάρεστη	Πολύ δυσάρεστη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Διερεύνηση μικροβιακής σύνθεσης ολόκληρων ιχθύων και φιλέτων τσιπούρας (*Sparus aurata*) με χρήση κλασσικών και μοριακών τεχνικών

3.1 Εισαγωγή

Για την κατανόηση της διαδικασίας της αλλοίωσης πρωταρχική ανάγκη είναι ο προσδιορισμός των ‘πραγματικών’ αλλοιωγόνων μικροοργανισμών. Όπως ήδη έχει αναφερθεί (βλέπε Κεφ. 1) οι κλασσικές τεχνικές δεν είναι πάντοτε ικανές να περιγράψουν την πραγματική μικροβιακή σύνθεση ενός τροφίμου με αποτέλεσμα ορισμένοι μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορεί να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αλλοίωση, να μην μπορούν να προσδιορισθούν και έτσι να μη λαμβάνονται υπόψη.

Οι παραδοσιακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών παρέχουν πολλές φορές ελλιπή αποτελέσματα (Baumann *et al.* 1972, Molin και Ternstrom 1986, Christensen *et al.* 1994). Η χρήση φαινοτυπικών δοκιμών (μορφολογικές, βιοχημικές) σε καθαρές καλλιέργειες δεν επαρκεί για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών κυρίως εξαιτίας της χαμηλής διακριτικής τους ικανότητας. Αντίθετα, οι μοριακές τεχνικές έχουν αναγνωρισθεί ως το πιο χρήσιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα (Martinez *et al.* 2011). Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται στα θρεπτικά υλικά μπορούν εύκολα να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν με αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA λαμβάνοντας μόνο μία μικρή ποσότητα DNA. Ωστόσο, αρκετοί σημαντικοί μικροοργανισμοί αδυνατούν να αναπτυχθούν σε ορισμένα θρεπτικά υλικά γενικής χρήσης (Broekaert *et al.* 2011). Οι μοριακές μη καλλιεργητικές τεχνικές αποτελούν την εναλλακτική προσέγγιση για τη διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης στα τρόφιμα

συμπεριλαμβάνοντας και τους μικροοργανισμούς που διαφεύγουν των καλλιεργητικών τεχνικών (Olofsson *et al.* 2007, Schirmer *et al.* 2009, Rasolofo *et al.* 2010).

Τα τελευταία χρόνια σχετικά ελάχιστες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών, ιδιαίτερα με αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA, για τη διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης στα αλιεύματα. Οι Honda *et al.* (2007a,b) με εφαρμογή της τεχνικής DGGE διερεύνησαν την αλλοιωγόνο μικροβιακή σύνθεση ιχθύων βακαλάου του Ατλαντικού (*Hippoglossus hippoglossus*) και μπακαλιάρου του Ατλαντικού (*Gadus morhua*), αντίστοιχα. Τα *P. phosphoreum*, *Pseudomonas* spp. και *B. thermosphacta* βρέθηκε να αποτελούν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς στους ιχθύες *H. hippoglossus* που συσκευάστηκαν σε ατμόσφαιρα αέρα και σε MAP (CO₂:N₂, CO₂:O₂, 50%:50%) και αποθηκεύθηκαν στους 4 °C. Η εικόνα των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών βρέθηκε να είναι λίγο διαφορετική στην περίπτωση του ιχθύος *G. morhua*, υπό τις ίδιες συνθήκες ατμόσφαιρας στους 0 °C. Τα *Pseudomonas* spp. βρέθηκε να αποτελούν τον κυρίαρχο μικροοργανισμό στην συσκευασία 50%CO₂:50%O₂, ενώ τα *Photobacterium* spp., *S. putrefaciens* και *Pseudomonas* spp. στην ατμόσφαιρα αέρα και 50%CO₂:50%N₂. Οι Macé *et al.* (2012) εφαρμόζοντας την TGGE σε καθαρές καλλιέργειες μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τα υλικά LH, Elliker medium, IA, STAA, Caso/VRBGA καθώς και σε DNA που προέκυψε από απευθείας εκχύλιση από φιλέτο σολομού (*Salmo salar*) μετά από συντήρηση σε συσκευασία κενού και σε MAP (50% CO₂/50% N₂), αναφέρουν ότι η αρχική μικροβιακή σύνθεση αποτελούνταν κυρίως από *Pseudomonas* spp., ενώ τα *P. phosphoreum* και *Lactobacillus piscium* αποτελούσαν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς στο χρόνο απόρριψης. Οι Jaffrès *et al.* (2009) διερεύνησαν την αλλοιωγόνο μικροβιακή σύνθεση γαρίδων στους 5 °C και 15 °C εφαρμόζοντας

κλασσικές και μοριακές τεχνικές. Οι τεχνικές αυτές εφαρμόστηκαν σε καλλιέργειες που απομονώθηκαν μετά από καταμέτρηση του Ολικού Μικροβιακού Πληθυσμού σε LH και IA. Η διερεύνηση ολοκληρώθηκε με TGGE σε DNA που προέκυψε απευθείας από τη σάρκα αποφλοιωμένων και μαγειρεμένων τροπικών γαρίδων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, όπως είδη των *Carnobacterium* (*C. divergens*, *C. maltaromaticum*, *C. alterfunditum/pleistocenium*), τα *Vagococcus* (*V. carniphilus/fluvialis*), καθώς και των *Enterococcus* (*E. faecalis* and *E. faecium*) αποτέλεσαν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς. Επίσης, το *B. thermosphacta* και τα Enterobacteriaceae (κυρίως *Serratia liquefaciens*) βρέθηκαν ανάμεσα στις υπόλοιπες ομάδες που αποτελούσαν την κυρίαρχη μικροβιακή σύνθεση. Παρόλα αυτά, οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν από τους παραπάνω ερευνητές για τη διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης στα αλιεύματα, αν και δίνουν μία καλή εκτίμηση για την φυλογενετική πληροφορία των μικροοργανισμών, στοχεύουν μόνο σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου 16S rRNA και όχι σε ολόκληρο το γονίδιο. Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδίου 16S rRNA μετά από κλωνοποίηση δίνει μακράν την ακριβέστερη φυλογενετική πληροφορία (Rudi et al. 2004, Olofsson et al. 2007, Schirmer et al. 2009, Rasolofo et al. 2010). Οι Rudi et al. (2004) με ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA σε σολομό και γάδο (ανάλυση αλληλουχιών σε απομονωμένους μικροοργανισμούς, T-RFLP και κλωνοποίηση σε DNA που προέκυψε απευθείας από τη σάρκα των ιχθύων) αποθηκευμένα σε MAP (60%CO₂/40%N₂) στους 1°C και 5°C, αντίστοιχα, αναφέρουν ότι το *P. phosphoreum* βρέθηκε να κυριαρχεί στο γάδο ενώ τα *Brochothrix* spp. και *Carnobacterium* spp. στο σολομό στο χρόνο απόρριψης. Οι Olofsson et al. (2007) μελέτησαν τη μικροβιακή σύνθεση σε καπνιστό σολομό αποθηκευμένο σε συσκευασία κενού στους 7°C. Η μελέτη διεξήχθη σε βακτήρια που απομονώθηκαν μέσω του θρεπτικού υλικού γενικής

χρήσης TGE με ανάλυση γονιδίου 16S rRNA καθώς και σε DNA που προέκυψε απευθείας από τη σάρκα με ανάλυση γονιδίου 16S rRNA και κλωνοποίηση. Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με απευθείας αλληλούχιση και με ανάλυση βιβλιοθήκης κλώνων, αντίστοιχα. Η αρχική μικροκοινότητα του καπνιστού σολομού αποτελούνταν κυρίως από *B. thermosphacta*, *Yersinia ruckeri*, *Photobacterium* και *Carnobacterium*, ενώ τα *Lactobacillus* και *Photobacterium* αποτελούσαν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς στο χρόνο απόρριψης του εξεταζόμενου ιχθύος. Νέοι τύποι των *Photobacterium*, συγγενικά παρόμοιοι με *P. iliopiscarium* και *P. phosphoreum*, προέκυψαν από την ανάλυση.

Στην Ελλάδα, έως το 2012, δεν υπήρχε καμία μελέτη σχετικά με τη διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης σε αλιεύματα χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές και ιδιαίτερα αυτές που περιλαμβάνουν την ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA έπειτα από εκχύλιση DNA κατευθείαν από τον ιστό του αλιεύματος. Στο παρελθόν, δύο μόνο μελέτες πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης των κυτταρικών πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με δωδεκανοθειϊκό νάτριο (SDS-PAGE analysis) με στόχο την ανεύρεση των ειδών που απαρτίζουν τα γένη *Pseudomonas* και *Shewanella*, τα οποία αυξήθηκαν σε εκλεκτικά υλικά, στο χρόνο απόρριψης της τσιπούρας (Tryfinopoulou *et al.* 2002, Tryfinopoulou *et al.* 2007). Επιπρόσθετα, οι Tryfinopoulou *et al.* (2007) μελέτησαν με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA, τη μικροβιακή ποικιλότητα του γένους *Shewanella* στο εκλεκτικό υλικό ΙΑ.

Ο στόχος του κεφαλαίου αυτού είναι η διερεύνηση της κυρίαρχης μικροβιακής σύνθεσης ιχθύων τσιπούρας (ολόκληρο, φιλέτο) οι οποίοι συντηρήθηκαν σε διάφορες συνθήκες όπως είναι η αερόβια συντήρηση καθώς και η συντήρηση σε συσκευασία MAP σε θερμοκρασίες 0, 5 και 15 °C. Η μελέτη περιλαμβάνει τη διερεύνηση της

αρχικής και της αλλοιωγόνου μικροβιακής σύνθεσης των ιχθύων με τη χρήση κλασσικών και σύγχρονων μοριακών τεχνικών (καλλιεργητικών και μη-καλλιεργητικών) με αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA.

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός

Στο παρόν κεφάλαιο διερευνήθηκε η αρχική και η τελική (στο χρόνο απόρριψης) μικροβιακή σύνθεση σε ολόκληρους ιχθύες και σε φιλέτα τσιπούρας αποθηκευμένα σε 3 θερμοκρασίες (0, 5 και 15 °C) και σε δύο (2) ατμόσφαιρες (αέρα, MAP) που απομονώθηκε στο θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης TSA με τη χρήση κλασσικών και μοριακών-καλλιεργητικών τεχνικών.

Επιπλέον, διερευνήθηκε η αρχική και η τελική (στο χρόνο απόρριψης) μικροβιακή σύνθεση ολόκληρων ιχθύων τσιπούρας αποθηκευμένων στον πάγο, πραγματοποιώντας απευθείας εκχύλιση DNA από τον μυϊκό ιστό των ιχθύων (μοριακές-μη καλλιεργητικές τεχνικές)

3.2.2 Προέλευση δειγμάτων

Ολόκληροι ιχθύες

Ολόκληροι ιχθύες βάρους περίπου 400 g από ελληνική υδατοκαλλιέργεια στην Πελασγία (ΔΙΑΣ ΑΕ), τοποθετήθηκαν μέσα σε πολυεστερικά κιβώτια με πάγο και μεταφέρθηκαν εντός μίας (1) ώρας στο εργαστήριο του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο Βόλο. Τα κιβώτια με τους ιχθύες και τον πάγο, τοποθετήθηκαν σε ψυγείο στους 5 °C για 20 ημέρες. Ο πάγος ανανεώνονταν κάθε δύο ημέρες. Από τα υπόλοιπα κιβώτια,

αφαιρέθηκε ο πάγος και οι ιχθύες αποθηκεύθηκαν σε επωαστικούς θαλάμους στους 5 και 15 °C για οκτώ (8) και τέσσερις (4) ημέρες, αντίστοιχα.

Φιλέτα τσιπούρας

Φιλέτα τσιπούρας βάρους περίπου 100-120 γρ, συσκευάστηκαν σε δισκάκια από διογκωμένη πολυστερίνη (SIRAP GEMA) με πλαστικό φιλμ BDF 8050F (SEALED AIR) σε συνθήκες αέρα και μίγματος αερίων (MAP: CO₂: 60%, O₂: 10%, N₂: 30%) από ελληνική βιομηχανία στην Αττική (ΔΙΑΣ ΑΕ). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε ισοθερμικά κιβώτια εντός τεσσάρων ωρών στο εργαστήριο του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο Βόλο όπου αποθηκεύθηκαν στους 0, 5 και 15 °C.

3.2.3 Απομόνωση Μικροβιακού Πληθυσμού

Κατά τη διάρκεια της συντήρησης των ιχθύων (ολόκληρο, φιλέτο) υπό αερόβιες συνθήκες και υπό συνθήκες MAP (60% CO₂, 10% O₂, 30% N₂), για τα φιλέτα μόνο, σε θερμοκρασία 0, 5 και 15°C, ελήφθησαν δείγματα σάρκας, την πρώτη ημέρα και την ημέρα απόρριψης, από έξι (6) διαφορετικούς ιχθύες ή τέσσερα (4) διαφορετικά φιλέτα τα οποία ομογενοποιούνταν και κατόπιν 25 g μεταφέρονταν υπό ασηπτικές συνθήκες και προσθέτονταν σε 225 ml αποστειρωμένου ισοτονικού πεπτονόχου ύδατος (0,1 % w/v πεπτόνη και 0,85 % w/v NaCl). Επιπρόσθετα, 1 g από το ομογενοποιημένο δείγμα ολόκληρων ιχθύων τσιπούρας από την πρώτη και την ημέρα απόρριψης (στον πάγο) αποθηκεύθηκε στους -20 °C για περαιτέρω μοριακή ανάλυση.

Η ομογενοποίηση για τη δημιουργία της πρώτης δεκαδικής αραιώσης των δειγμάτων γινόταν σε αποστειρωμένες σακούλες τύπου Stomacher σε θερμοκρασία

δωματίου για 2 min με τη βοήθεια ομογενοποιητή τύπου Stomacher (Bug Mixer, Interscience, London, UK). Κατόπιν γινόταν οι δεκαδικές αραιώσεις με τη μεταφορά 1 ml δείγματος σε 9 ml αποστειρωμένου ισοτονικού πεπτονούχου ύδατος. Ακολουθούσε ενοφθαλμισμός σε τρυβλία Petri με TSA με τη μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης (0,1 ml) και επώαση για 48-72 h στους 25 °C. Το TSA επιλέχθηκε ως καταλληλότερο θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης για την απαρίθμηση του ολικού μικροβιακού πληθυσμού σε σχέση με το PCA και το IA (Kakasis *et al.* 2011).

Οι αποικίες από τα τρυβλία TSA αρχικά απαριθμούνταν και ακολουθούσε μορφολογικός διαχωρισμός των αποικιών σύμφωνα με το χρώμα, το μέγεθος και το σχήμα. Στη συνέχεια, αντιπροσωπευτικός αριθμός αποικιών (50%) από κάθε μορφολογικά διαφορετική ομάδα μεταφέρονταν με τη μέθοδο της γραμμικής μετασποράς (streaking) σε τρυβλία TSA και επωάζονταν για 18-24 ώρες στους 25 °C. Οι απομονωμένες καθαρές αποικίες συντηρήθηκαν σε μικροφιαλίδια Protect (LAB M, Lancashire, UK) σε θερμοκρασία -80 °C και χρησιμοποιήθηκαν αργότερα, μετά από ανανέωση σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν θρεπτικό μέσο αύξησης TSB, επώαση για 18-24 ώρες στους 25 °C και νέο καθαρισμό σε TSA, για τις κλασσικές και μοριακές δοκιμές.

3.2.4 Προσδιορισμός χρόνου απόρριψης

Ο χρόνος απόρριψης προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.

3.2.5 Χαρακτηρισμός των απομονωμένων αποικιών με τη χρήση κλασσικών δοκιμών

Κάθε απομονωμένη καλλιέργεια υποβλήθηκε σε μια σειρά από κλασσικές δοκιμές όπως χρώση Gram, σχήμα κυττάρων, δοκιμή της οξειδάσης και της καταλάσης (Hariggan & McCance 1976), μεταβολισμός της γλυκόζης (O/F-test) (Hugh & Leifson 1953), μετατροπή του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (TMAO) σε τριμεθυλαμίνη (TMA) και παραγωγή υδροθείου (H_2S) (Gram *et al.* 1987). Στη συνέχεια, ακολουθούσε ταυτοποίηση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων με τη μέθοδο του API system 20 NE (non-enteric bacteria) και 20 E (enteric bacteria) και των θετικών κατά Gram βακτηρίων με ζύμωση υδατανθράκων χρησιμοποιώντας το API system 50 CH (BioMérieux, France). Η χρώση Gram, οι δοκιμές καταλάσης, και οξειδάσης και ο έλεγχος του μεταβολισμού της γλυκόζης καθόριζαν τον τύπο του API που χρησιμοποιούνταν (API Guide, Biomerieux). Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, τα βακτήρια που παρουσίασαν οξειδωτικό μεταβολισμό ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο του API 20 NE, ενώ τα βακτήρια που παρουσίασαν ζυμωτικό μεταβολισμό ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο του API 20 E. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος ApiLab Plus (BioMérieux, France).

3.2.6 Χαρακτηρισμός των απομονωμένων αποικιών με ενίσχυση γονιδίου 16S rRNA

Μετά την ολοκλήρωση των κλασσικών δοκιμών, κάθε απομονωμένη καλλιέργεια υποβλήθει σε ανάλυση γονιδίου 16S rRNA και απευθείας αλληλούχιση. Η ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA στις απομονωμένες καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε

με τους εκκινητές 27fBAC (5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3', M=A/C) (Lane 1991) and 907rBAC (5'-CCCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3') (Muyzer *et al.* 1995). Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων ήταν περίπου 850 ζ.β. Το μείγμα της PCR, τελικού όγκου 20 μl, περιείχε 4 μL buffer 5x (Green GoTaq Flexi buffer, Promega), 2 μL dNTPs (2 mM), 1,2 μL MgCl₂ (25 mM, 1,2 ml), 0,1 μL από κάθε εκκινητή, 0,1 μL Taq πολυμεράσης (GoTaq DNA polymerase, Promega) και μικρή ποσότητα από μία αποικία από κάθε απομονωμένη καλλιέργεια. Η εκχύλιση του DNA από τα βακτήρια πραγματοποιούνταν κατά το πρώτο στάδιο της διαδικασίας της PCR (αρχική αποδιάταξη, pre-PCR) στους 94°C για 5 min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR ήταν: αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation) στους 94°C για 5 min (1^ο βήμα), αποδιάταξη στους 94°C για 45 sec (2^ο βήμα), υβριδισμός (annealing) των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο στους 52.5°C για 45 sec (3^ο βήμα), σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών (elongation) με τη βοήθεια του ενζύμου Taq πολυμεράσης στους 72°C για 1 min (4^ο βήμα) και ακολουθούσε ένα επιπλέον στάδιο τελικής επιμήκυνσης του DNA για 10 min (post-PCR) στους 72°C (5^ο βήμα). Τα βήματα 2 - 4 του θερμοκρασιακού προγράμματος της PCR επαναλήφθηκαν για 32 κύκλους. Τα προϊόντα της PCR (5 μl ανά αντίδραση) υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση (90 Volts για 30 min) σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel electrophoresis) 1 % σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris/Acetate/EDTA (1x TAE), προκειμένου να επαληθευτεί ο πολλαπλασιασμός της επιθυμητής περιοχής DNA. Ο έλεγχος του μήκους του προϊόντος DNA που βρίσκονταν στο πήκτωμα σε σχέση με το μήκος του DNA που πολλαπλασιάστηκε μέσω της PCR (μήκος περιοχής ανάμεσα στους 2 εκκινητές) πραγματοποιούνταν με τη βοήθεια ενός μάρτυρα. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης το DNA γίνονταν ορατό σε πήκτωμα

αγαρόζης μέσω της εμβάπτισης αυτού σε διάλυμα φθορίζουσας χρωστικής - βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide, EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο δεσμεύονταν στο DNA, απορροφούσε αόρατη υπεριώδη (UV) ακτινοβολία και σηματοδοτούσε με ορατή ακτινοβολία το DNA. Στη συνέχεια, τα δείγματα με τα προϊόντα της PCR (αντίγραφα του γονιδίου - στόχου) καθαρίζονταν με τη χρήση του KIT MONTAGE PCR (Millipore, Massachusetts, USA) και ακολουθούσε η ποσοτικοποίηση του DNA με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου NanoDrop ND-1000. Τα δείγματα DNA στέλνονταν απευθείας για αλληλούχιση.

3.2.7 Χαρακτηρισμός της μικροβιακής σύνθεσης από απευθείας εκχύλιση προκαρυωτικού DNA από ιστό ιχθύος

Απομόνωση DNA

Το DNA απομονώθηκε μετά από απευθείας εκχύλιση ca. 0.7 g σάρκας ολόκληρου ιχθύος τσιπούρας, στην αρχή και στο χρόνο απόρριψης, με τη χρήση του Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, USA). Η χρήση του πρωτόκολλου απομόνωσης απομάκρυνε τους αναστολείς της PCR. Στην αρχή πραγματοποιούνταν μηχανική λύση των κυττάρων με εξειδικευμένα σφαιρίδια, θερμότητα και απορρυπαντικά και το DNA δεσμεύονταν σε ένα φίλτρο πυριτίου. Στο τελευταίο στάδιο της διαδικασίας, το φίλτρο ξεπλένονταν με ένα ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα που απελευθέρωνε το DNA. Στη συνέχεια, ακολουθούσε ποσοτικοποίηση του DNA με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου NanoDrop ND-1000.

Ενίσχυση γονιδίου 16S rRNA

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της PCR ήταν το ίδιο που περιγράφηκε παραπάνω (βλέπε παράγραφο 2.2.5). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε PCR στους 30 κύκλους για να ελεγχθεί η καταλληλότητα των εκκινητών προς το γονίδιο - στόχο. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση κύκλων ώστε να βρεθεί ο μικρότερος αριθμός επαναλήψεων που θα έδινε θετικό αποτέλεσμα ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι εγγενείς περιορισμοί της PCR (Spiegelman *et al.* 2005). Τελικά, η PCR διεξήχθη στους 26 και 28 κύκλους για τα δείγματα που ελήφθησαν την πρώτη ημέρα (d0) και στο χρόνο απόρριψης (d16), αντίστοιχα. Μετά την ηλεκτροφόρηση, ο καθαρισμός του DNA στο αρχικό δείγμα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Pure Link™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, USA), ενώ ο καθαρισμός του DNA στο τελικό δείγμα, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του KIT MONTAGE PCR (Millipore, Massachusetts, USA). Το Pure Link™ Quick Gel Extraction Kit χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση όπου ο καθαρισμός του DNA δεν επιτεύχθη επιτυχώς με τη χρήση του KIT MONTAGE PCR. Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε για να μεγιστοποιηθεί η ανάκτηση των νουκλεϊκών οξέων και να ελαχιστοποιηθούν οι προσμίξεις, ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες απόδοσης της κλωνοποίησης. Το DNA που ελήφθησε στο τέλος της διαδικασίας ήταν απαλλαγμένο από πρωτεΐνες, χρωστικές και αгарόζη και ήταν έτοιμο προς χρήση για κλωνοποίηση.

Κλωνοποίηση και αλληλούχιση

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων που προέκυψαν από τον καθαρισμό των προϊόντων PCR, χρησιμοποιήθηκε το TOPO™ R™ TA PCR CLONING KIT (Invitrogen

Co., Carlsbad, USA) και το πρωτόκολλο μετασχηματισμού χημικώς δεκτικά κυττάρων *Escherichia coli* (Invitrogen Co., Carlsbad, USA). Το μείγμα που ετοιμάστηκε για την αντίδραση της κλωνοποίησης περιείχε ποσότητα από το καθαρό προϊόν (2 μL), διάλυμα αλάτων (0,5 μL) και το φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδια, 0,5 μL). Το μείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min και προστέθηκε στα κύτταρα *E. coli*. Στη συνέχεια, ακολούθησε ο μετασχηματισμός των κυττάρων σε ειδική συσκευή ηλεκτροπόρωσης με εφαρμογή ρεύματος (1800 volts) μέσω ειδικής κυψελίδας. Έπειτα, τα κύτταρα με το θρεπτικό μέσο αύξησης επώαστηκαν για 1h στους 37°C. Στη συνέχεια, έγινε επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο Luria-Bertani agar με καναμυκίνη (100 mg ml⁻¹) (που θεωρητικά επιτρέπει την αύξηση μόνο των κυττάρων που έχουν δεχτεί το ένθεμα κατά την κλωνοποίηση) και επώαστηκαν για 18h στους 37°C.

Η παρουσία του ενθέματος στα κύτταρα *E. coli* ελέγχονταν με PCR, όπου στο μείγμα κάθε αντίδρασης ως δείγμα προστίθονταν μικρή ποσότητα βακτηριακής αποικίας από τα τρυβλία (colony PCR). Οι εκκινητές (ειδικοί για το φορέα κλωνοποίησης) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο M13F (5'-GTAAAACGCCCAG-3') και M13R (5'CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Το μείγμα της PCR τελικού όγκου 20 μL , περιείχε 4 μL buffer 5x (Green GoTaq Flexi buffer, Promega), 2 μL dNTPs (2mM), 1,2 μL MgCl₂, 0,2 μL από κάθε εκκινητή και 0,08 μL Taq πολυμεράσης (GoTaq DNA polymerase, Promega). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της αντίδρασης ήταν: αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 94°C για 5 min (1^ο βήμα), αποδιάταξη στους 94°C για 45 sec (2^ο βήμα), υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο στους 52.5°C για 45 sec (3^ο βήμα), σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη

βοήθεια του ενζύμου Taq πολυμεράσης στους 72°C για 2 min (4^ο βήμα) και ακολουθούσε ένα επιπλέον στάδιο τελικής επιμήκυνσης του DNA για 10 min (post-PCR) στους 72°C (5^ο βήμα). Τα βήματα 2 - 4 επαναλήφθηκαν για 25 κύκλους. Ακολούθησε η οπτικοποίηση του αποτελέσματος σε πήκτωμα αγαρόζης όπως έχει αναφερθεί παραπάνω (βλέπε παράγραφο 3.2.5).

Οι κλώνοι εμβολιάστηκαν σε υγρές καλλιέργειες θρεπτικού μέσου Luria-Bertani με καναμυκίνη, όγκου 1,2 ml η κάθε μία και ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 18 h στις 180 rpm. Μετά την επώαση, πραγματοποιούνταν απομόνωση των πλασμιδίων με το τυποποιημένο Nucleospin Plasmid QuickPure kit (Macherey-Nagel, Germany). Το πλασμιδιακό DNA απελευθερώνονταν από τα κύτταρα *E. coli* και στέλνονταν για αλληλούχηση σε συσκευή αλληλούχησης τριχοειδούς αγγείου, με τη χρήση του BigDye Terminator kit (Applied Biosystems Inc., Carlsbad, USA).

3.2.8 Επεξεργασία αλληλουχιών

Η στοίχιση των αλληλουχιών πραγματοποιούνταν με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης CLUSTALW2, το οποίο οργανώνει τις επιλεγμένες αλληλουχίες έτσι ώστε οι ομοιότητες και οι διαφορές τους να είναι ορατές (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Το πρόγραμμα αυτό υπολογίζει το βαθμό ομοιότητας κάθε ακολουθίας με κάθε μία ξεχωριστά. Η ομαδοποίηση μεταξύ των ακολουθιών πραγματοποιούνταν με κριτήριο ομοιότητας $\geq 98\%$ (Stackebrandt & Goebel 1994).

Για να διαπιστωθεί αν οι φυλότυποι (για τους κλώνους μόνο) και τα επιμέρους δείγματα στις βιβλιοθήκες που δημιουργήθηκαν αντιπροσωπεύουν επαρκώς την ποικιλότητα των δειγμάτων που μελετήθηκαν, ελέγχθηκε αν το μέγεθος της

βιβλιοθήκης είναι αντιπροσωπευτικό. Αυτό επιτυγχάνθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού που πρότειναν οι Kemp & Aller (2004). Η διαδικασία αξιολόγησης βασίσθηκε στους δείκτες S_{Chao1} (Chao 1984) και S_{ACE} (Chao *et al.* 1993).

Ο αλγόριθμος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Zhang *et al.* 2000) ο οποίος έχει αναπτυχτεί από το NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση κάθε αλληλουχίας που προέκυψε από τη μελέτη, με διαθέσιμες αλληλουχίες από τις βάσεις δεδομένων του NCBI, έτσι ώστε να βρεθούν οι κοντινότεροι συγγενείς. Για την πιθανή εύρεση χμαιρικών αλληλουχιών, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Pintail (Ashelford *et al.* 2005, <http://www.bioinformatics-toolkit.org/Web-Pintail/>) το οποίο σύγκρινε τις εξελικτικές αποστάσεις μεταξύ των αλληλουχιών που προέκυψαν από τη μελέτη, με συγγενικές αξιόπιστες αλληλουχίες.

3.2.9 Φυλογενετική ανάλυση

Τα φυλογενετικά δέντρα χρησιμοποιήθηκαν για την απεικόνιση της εξελικτικής σχέσης των φυλοτύπων. Για τη δημιουργία φυλογενετικού δένδρου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA έκδοση 5 (Tamura *et al.* 2007). Η τοπολογία του δένδρου βασίσθηκε στη μέθοδο του κοντινότερου γείτονα (Neighbour-Joining) (Saitou & Nei 1987) και έγινε διόρθωση κατά Jukes-Cantor (1969). Ο έλεγχος της στατιστικής εγκυρότητας της τοπολογίας του δένδρου έγινε 1000 φορές με τη μέθοδο bootstrap.

Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες του φυλογενετικού γονιδίου 16S rRNA, οι αλληλουχίες των πλησιέστερων συγγενών τους καθώς και μία μακρινή αλληλουχία ως ρίζα (outgroup), που αποτελεί

τον κοινό πρόγονο όλων των αλληλουχιών ώστε να προσδιοριστεί η εξελικτική σχέση των ειδών.

Οι φυλότυποι που προέκυψαν από τη μελέτη τόσο με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA με απευθείας αλληλούχιση σε καθαρές καλλιέργειες μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από ιχθύες τσιπούρας (ολόκληρο, φιλέτο) στην αρχή και στο χρόνο απόρριψης όσο και με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA με κλωνοποίηση και ταυτοποίηση με ανάλυση βιβλιοθήκης κλώνων απευθείας σε ιστό τσιπούρας στην αρχή και στο χρόνο απόρριψης, υποβλήθηκαν στην GenBank (JQ664571-JQ664578).

3.3 Αποτελέσματα

3.3.1 Προσδιορισμός χρόνου οργανοληπτικής απόρριψης

Όλα τα προϊόντα την πρώτη ημέρα (d 0) αξιολογήθηκαν οργανοληπτικά ως άριστα, ενώ το επίπεδο του ολικού μικροβιακού πληθυσμού ήταν 3,38 και 3,79 log cfu/g για τους ολόκληρους ιχθύες και για τα φιλέτα αντίστοιχα.

Ο χρόνος απόρριψης των προϊόντων, βάσει της οργανοληπτικής αξιολόγησης, ήταν 16, 5 και 2 ημέρες για τους ολόκληρους ιχθύες, 14, 5, 2 ημέρες για τα φιλέτα που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες και 18, 8, 2 ημέρες για τα φιλέτα σε MAP, στους 0 (στον πάγο για τους ολόκληρους ιχθύες μόνο), 5 και 15 °C αντίστοιχα. Το επίπεδο του μικροβιακού πληθυσμού στο χρόνο απόρριψης κυμαίνονταν μεταξύ 7-8 log cfu/g σε όλα τα προϊόντα (Πίν. 3.1).

3.3.2 Μικροβιακή σύνθεση στην αρχή και στο χρόνο απόρριψης ιχθύων τσιπούρας

3.3.2.1 Φαινοτυπική ανάλυση

Συνολικά μελετήθηκαν 296 αποικίες (Πίν. 3.2 & 3.3). Η πλειοψηφία των μικροοργανισμών που εξετάστηκε ήταν αρνητικοί κατά Gram βάκιλλοι (90 %), ενώ ένα μικρότερο ποσοστό ήταν θετικοί κατά Gram κόκκοι ή κοκκο-βάκιλλοι (10 %). Οι αρνητικοί κατά Gram βάκιλλοι ήταν θετικοί ως προς την καταλάση και την οξειδάση και παρουσίαζαν είτε οξειδωτικό μεταβολισμό (62% του συνόλου) ή καμία μεταβολή (26% του συνόλου) στη γλυκόζη στο μέσο των Hugh και Leifson (HL). Οι 31 από αυτούς (11% του συνόλου) μετέτρεπαν το TMAO σε TMA και παρήγαγαν H₂S, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν αρνητικοί στις δύο αυτές δοκιμές. Οι θετικοί κατά Gram κόκκοι και κοκκο-βάκιλλοι παρουσίασαν ζυμωτικό μεταβολισμό (12% του συνόλου). Οι 24 αποικίες θετικών κατά Gram κοκκο-βάκιλλων απομονώθηκαν στο χρόνο απόρριψης των φιλέτων που είχαν αποθηκευθεί σε συνθήκες MAP στους 5°C, ενώ οι 6 αποικίες θετικών κατά Gram κόκκων απομονώθηκαν από τα φιλέτα στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής (Πίν. 3.3). Ο αριθμός των μικροοργανισμών οι οποίοι απομονώθηκαν από τα τρυβλία με θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης TSA την πρώτη ημέρα (d0) και την ημέρα απόρριψης, ανά περίπτωση, καθώς και οι κυριότερες δοκιμές που απαιτήθηκαν για την αρχική ομαδοποίηση των μικροοργανισμών με βάση τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά παρουσιάζονται αναλυτικά στους παρακάτω Πίνακες (Πίν. 3.2 & 3.3).

Μετά την πρώτη ομαδοποίηση των μικροοργανισμών ακολούθησε η ταυτοποίηση αυτών με τη μέθοδο του συστήματος API. Συνολικά, 261 αποικίες (88,2%) που παρουσίασαν είτε οξειδωτικό μεταβολισμό ή καμία μεταβολή στη γλυκόζη (μη εντερικά βακτήρια) ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο του API 20 NE, ενώ 11 αποικίες

(3,8%) που παρουσίασαν ζυμωτικό μεταβολισμό (εντερικά βακτήρια) ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο του API 20 E. Οι υπόλοιπες 24 (6,1%) αποικίες που παρουσίασαν ζυμωτικό μεταβολισμό ήταν θετικοί κατά Gram κόκκοι ή κοκκο-βάκιλλοι και ταυτοποιήθηκαν με το API 50 CH (Πίν. 3.5-3.8).

3.3.2.2 Μοριακή ανάλυση

Στη συνέχεια, 149 αποικίες εξετάστηκαν με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA, εκ των οποίων οι 90 αποικίες έδωσαν αποτέλεσμα κατά την αλληλούχιση. Εκ των 90 αποικιών, οι 75 προέρχονταν από τα φιλέτα και μόνο 15 αποικίες προέρχονταν από την ολόκληρη τσιπούρα. Επομένως, συνολικά πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση σε 90 αλληλουχίες του γονιδίου 16S rRNA.

Μετά τη στοίχιση των αλληλουχιών προέκυψαν 18 διαφορετικοί φυλότυποι για τα δείγματα από τα φιλέτα και 11 διαφορετικοί φυλότυποι για τα δείγματα από τους ολόκληρους ιχθύες, εκ των οποίων κάποιοι (A8-A42, A22-B22, A66-A33, A69-B18, B47-A78) ήταν κοινοί στα δείγματα των φιλέτων και των ολόκληρων ιχθύων, σύμφωνα με το κριτήριο ομοιότητας $\geq 98\%$. Οι διαφορετικοί φυλότυποι, η συχνότητα εμφάνισής τους στα φιλέτα και στους ολόκληρους ιχθύες, καθώς και η ομοιότητά τους με τους κοντινότερους συγγενείς τους, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4. Στα φιλέτα υπό συνθήκες αέρα, εντοπίστηκαν οι φυλότυποι B5, B1, B2, B6, B8 στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής, οι B19, B18, B22 στο χρόνο απόρριψης στους 0 °C, οι B19, A12 στους 5°C και οι A33, A40, A42, B5 στους 15 °C. Στα φιλέτα υπό συνθήκες MAP εντοπίστηκαν οι φυλότυποι B9 στο χρόνο απόρριψης στους 0 °C, οι B19, B18, B48, A27, A29, A30, B47 στους 5°C και ο A33 στους 15 °C. Οι φυλότυποι B5, B19, A33 ανήκαν στους κυρίαρχους μικροοργανισμούς στα φιλέτα σε ατμόσφαιρα αέρα, και οι

φυλότυποι B9, B19, A33, B48 ανήκαν στους κυρίαρχους μικροοργανισμούς στα φιλέτα σε MAP.

Η φυλογενετική σχέση μεταξύ των αλληλουχιών του φυλογενετικού γονιδίου 16S rRNA που προέκυψαν από τους μικροοργανισμούς οι οποίοι απομονώθηκαν από φιλέτα υπό συνθήκες αέρα και MAP στους 0, 5 και 15°C και των αλληλουχιών των πλησιέστερων χαρακτηρισμένων συγγενών τους παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.1.

Μικροβιακός πληθυσμός στα φιλέτα

Στα φιλέτα, στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής, επικράτησαν 5 ομάδες μικροοργανισμών με διαφορετικά χαρακτηριστικά ως προς το σχήμα, το μέγεθος και το χρώμα της κάθε αποικίας. Οι τέσσερις (4) από τις πέντε (5) ομάδες χαρακτηρίστηκαν ως *Pseudomonas fluorescens* με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, ενώ μία (1) ομάδα χαρακτηρίστηκε ως *Micrococcus* sp. (Πίν. 3.5). Με ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA, δύο (2) ομάδες χαρακτηρίστηκαν ως *Pseudomonas fluorescens* συμφωνώντας με τα φαινοτυπικά, μία (1) ως *Micrococcus caseolyticus* συμφωνώντας με τα φαινοτυπικά σε επίπεδο γένους μόνο, ενώ οι άλλες δύο (2) χαρακτηρίστηκαν ως *Psychrobacter cryohalolentis* και *Psychrobacter maritimus*, σε αντίθεση με τα φαινοτυπικά όπου προσδιορίστηκαν ως *Pseudomonas fluorescens* (Πίν. 3.5). Συγκεκριμένα, ο φυλότυπος B5, ο οποίος ανήκε στην κυρίαρχη ομάδα (35,5%) των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από το φιλέτο την ημέρα 0 και προσδιορίστηκαν φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*, παρουσίασε 99% ομοιότητα με τον clone LP09x_D8A ακαλλιέργητου βακτηρίου που προέρχονταν από τη φυλλόσφαιρα μήλου (Yashiro & McManus) και 99% με το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* strain DF41TB το οποίο απομονώθηκε από μολυσμένο πόδι διαβητικού ασθενούς (Shahi &

Kumar, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK). Ο φυλότυπος B1, ο οποίος αντιπροσώπευε τα βακτήρια που αποτελούσαν το 19% της μικροβιακής σύνθεσης στο φιλέτο την ημέρα 0 που προσδιορίστηκαν φαινοτυπικά ως *Micrococcus* sp., παρουσίασε 99% ομοιότητα με τον *Micrococcus* sp. clone T438 ο οποίος προέρχονταν από βακτήρια σε φρέσκο γάλα από φάρμες του Β. Ισραήλ (Raats *et al.* 2011) και 99% με το βακτήριο *Micrococcus caseolyticus* strain YSY1-12 (κοντινότερος χαρακτηρισμένος συγγενής) το οποίο είχε απομονωθεί από νερόβραστη αλατισμένη πάπια (Liu *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK).

Ο φυλότυπος B2, ο οποίος αντιπροσώπευε το 19,5% των βακτηρίων που προσδιορίστηκαν φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*, παρουσίασε 97% ομοιότητα με τον clone SB-d16-1 ο οποίος προέρχονταν από εδάφιμο ιστό τσιπούρας στο χρόνο απόρριψης στον πάγο (Parlapani *et al.* 2013) και 97% με το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* strain LMG 14577 το οποίο απομονώθηκε από μολυσμένα νερά ποταμού στο Βέλγιο (Matthijs, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK). Ο φυλότυπος B6, ο οποίος αντιπροσώπευε το 13 % των βακτηρίων που προσδιορίστηκε φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*, παρουσίασε 99% ομοιότητα με το βακτήριο *Psychrobacter* sp. C16 το οποίο απομονώθηκε από θαλασσινό νερό στον κόλπο του Terra Nova στην Ανταρκτική (Lo Giudice *et al.* 2007) και 99% ομοιότητα με το *Psychrobacter cryohalolentis* strain KOPRI_22219 (Lee *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK). Ο φυλότυπος B8, ο οποίος αντιπροσώπευε το υπόλοιπο 13 % των βακτηρίων που προσδιορίστηκε φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*, παρουσίασε 99% ομοιότητα με το βακτήριο *Psychrobacter* sp. FI 1008 το οποίο απομονώθηκε από τον πυλωρό ιχθύος γλώσσας (Sanchez *et al.* 2012) και 99% με το

Psychrobacter maritimus strain CAIM 952 το οποίο απομονώθηκε από συκώτι ιχθύος *Lutjanus guttatus* στο Μεξικό (Gomez-Gil, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK).

Στα φιλέτα υπό συνθήκες αέρα, στο χρόνο απόρριψης, επικράτησαν αρχικά τρεις (3) ομάδες μικροοργανισμών στους 0 °C, τρεις (3) στους 5 °C και τέσσερις (4) στους 15°C. Στους 0 °C, οι τρεις (3) ομάδες χαρακτηρίστηκαν αρχικά βάσει των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών ως *Pseudomonas fluorescens* (δύο ομάδες) και *Shewanella putrefaciens* (μία ομάδα) (Πίν. 3.6). Στη συνέχεια, με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA, οι δύο (2) ομάδες χαρακτηρίστηκαν ως *Pseudomonas fragi* (80%) και η μία (1) ομάδα ως *Shewanella morhuae* (20%). Συγκεκριμένα, ο φυλότυπος B19, ο οποίος αντιπροσώπευε τα βακτήρια που αποτελούσαν την κυρίαρχη ομάδα (66,7%) της μικροβιακής σύνθεσης στα φιλέτα την ημέρα αλλοίωσης (d14) και προσδιορίστηκαν φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*, παρουσίασε 99% ομοιότητα με το *Pseudomonas* sp. FI 1029 το οποίο απομονώθηκε από κοκκινόψαρο (Sanchez *et al.* 2012) και 99% με το *Pseudomonas fragi* strain JCM 5396 που προέρχονταν από την Ιαπωνική συλλογή Μικροοργανισμών (Japan Collection of Microorganisms, JCM) 5396 (Hirosawa,Wako, Saitama) (Oshida *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK). Ο φυλότυπος B18, ο οποίος αντιπροσώπευε το 13,3 % των βακτηρίων που προσδιορίστηκε φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*, παρουσίασε 99% ομοιότητα με το *Pseudomonas* sp. HSF20-13 το οποίο απομονώθηκε από ιχθύ υπό ψύξη (Fukuda *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK) και 99% με το *Pseudomonas fragi* strain JCM 5435 από την JCM 5435 (Oshida *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK). Ο φυλότυπος B22, ο οποίος αντιπροσώπευε το 20 % των βακτηρίων που προσδιορίστηκε φαινοτυπικά ως *Shewanella putrefaciens*, παρουσίασε

99% ομοιότητα με το *Shewanella morhuae* strain U1417 το οποίο απομονώθηκε από μπακαλιάρo σε πάγο (Fonnesbech Vogel *et al.* 2005).

Στους 5°C, οι τρεις (3) ομάδες χαρακτηρίστηκαν αρχικά βάσει των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών ως *Pseudomonas fluorescens* (δύο ομάδες) και *Pseudomonas putida* (μία ομάδα) (Πίν. 3.7). Στη συνέχεια, με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA, οι τρεις (3) ομάδες χαρακτηρίστηκαν ως *Pseudomonas fragi*. Ο φυλότυπος B19 βρέθηκε να αντιπροσωπεύει τα βακτήρια που αποτελούσαν την κυρίαρχη ομάδα (75%) της μικροβιακής σύνθεσης στα φιλέτα την ημέρα αλλοίωσης (d5), τα οποία προσδιορίστηκαν φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*. Ο φυλότυπος A12, ο οποίος αντιπροσώπευε το 25 % των βακτηρίων που προσδιορίστηκαν φαινοτυπικά ως *Pseudomonas putida*, παρουσίασε 98% ομοιότητα με το *Pseudomonas fragi* strain MA07 το οποίο απομονώθηκε από αλλοιωμένο χοιρινό κρέας υπό ψύξη (Maneerat & Anarak, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK).

Στους 15 °C, οι τέσσερις (4) ομάδες παρουσίασαν παρόμοια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και χαρακτηρίστηκαν ως *Pseudomonas fluorescens* παρόλο που οι αποικίες τους διέφεραν ως προς το σχήμα, το χρώμα και το μέγεθος. Στη συνέχεια, με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA, διαπιστώθηκε ότι όντως όλες οι ομάδες ανήκαν στο γένος *Pseudomonas* sp. αλλά διαφέραν ως προς το είδος (Πίν. 3.8). Ο φυλότυπος A33, ο οποίος αντιπροσώπευε τα βακτήρια που αποτελούσαν την κυρίαρχη ομάδα (59%) της μικροβιακής σύνθεσης στα φιλέτα την ημέρα αλλοίωσης (d2) που προσδιορίστηκαν φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*, παρουσίασε 99% ομοιότητα με το *Pseudomonas migulae* strain P11 το οποίο απομονώθηκε από λάσπη (De Gelder *et al.* 2005). Ο φυλότυπος A40, ο οποίος αντιπροσώπευε το 17,6 % των βακτηρίων που προσδιορίστηκε φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*, παρουσίασε 99%

ομοιότητα με το *Pseudomonas* sp. S_T_TSA_35 το οποίο προέρχονταν από την εντερική οδό του εντόμου *Rutilus rutilus* (Skrodenyte-Arbaciauskiene *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK). Ο φυλότυπος A42, ο οποίος αντιπροσώπευε το 5,9 % των βακτηρίων που προσδιορίστηκαν φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*, παρουσίασε 99% ομοιότητα με το *Pseudomonas* sp. Pier7 που προέρχονταν από ρυπασμένο με βαρέα μέταλλα έδαφος (Colinon *et al.* 2013) και 99% με το *Pseudomonas vranovensis* strain MM1-5 που προέρχονταν από το σπήλαιο Mawsmai (Joshi & Banerjee, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK). Ο φυλότυπος B5 που όπως έχει ήδη αναφερθεί, παρουσίασε ομοιότητα με το *Pseudomonas fluorescens* strain DF41TB (Shahi & Kumar, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK), αντιπροσώπευε το υπόλοιπο 17,6 % των βακτηρίων, το οποίο προσδιορίστηκε φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*.

Στα φιλέτα υπό συνθήκες MAP, στο χρόνο απόρριψης, επικράτησαν δύο (2) ομάδες μικροοργανισμών στους 0 °C, επτά (7) στους 5 °C και δύο (2) στους 15°C. Στους 0 °C, η μία (1) ομάδα χαρακτηρίστηκε ως *Pseudomonas mendocina* (60,7%) και η άλλη ως *Aeromonas salmonicida* (39,3%) βάσει των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών (Πίν. 3.6). Στη συνέχεια, με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA, οι δύο (2) ομάδες χαρακτηρίστηκαν ως *Pseudomonas veronii*. Συγκεκριμένα, ο φυλότυπος B9, βρέθηκε να αντιπροσωπεύει τα βακτήρια που αποτελούσαν και τις δύο (2) ομάδες (100%) της μικροβιακής σύνθεσης στα φιλέτα την ημέρα αλλοίωσης (d18). Ο φυλότυπος αυτός, παρουσίασε 99% ομοιότητα με το βακτήριο *Pseudomonas* sp. HC4-14 το οποίο εντοπίστηκε σε τάπητα από κυανοβακτήρια στην Αρκτική (Shivaji *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK) και 98% με το *Pseudomonas veronii* strain PDD-37b-8 το οποίο εντοπίστηκε σε νερό βροχής στη Γαλλία (Vaitilingom *et al.* 2012).

Στους 5°C, οι επτά (7) ομάδες χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens* (δύο ομάδες), *Lactobacillus* sp. (τέσσερις ομάδες) και *Shewanella putrefaciens* (μία ομάδα). Με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA, οι δύο (2) ομάδες χαρακτηρίστηκαν ως *Pseudomonas fragi* και συγκεκριμένα ο φυλότυπος B19 βρέθηκε να αντιπροσωπεύει τη μία (1) ομάδα (25%) και ο B18 την άλλη ομάδα (11,4%). Οι τέσσερις (4) ομάδες, οι οποίες αποτελούνταν από θετικούς κατά Gram κοκκοβακίλλους, βρέθηκε να εκπροσωπούνται από τους φυλότυπους B48, A27, A29 και A30, η κάθε μία αντίστοιχα (Πίν. 3.7). Ο φυλότυπος B48, ο οποίος αντιπροσώπευε το 27,3 % των βακτηρίων παρουσίασε 100% ομοιότητα με το *Carnobacterium maltaromaticum* strain MMF-32 το οποίο απομονώθηκε από ιχθύες πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) που προέρχονταν από λίμνη του Μίσιγκαν (Loch *et al.* 2011). Ο φυλότυπος A27, ο οποίος αντιπροσώπευε το 9,1 % των βακτηρίων, έδειξε 100% ομοιότητα με το *Vagococcus* sp. MES18 που απομονώθηκε από τρόφιμα που είχαν υποστεί ζύμωση (Joshi & Koijam, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK) και 98% με το *Vagococcus fluvialis* strain MS23 που προέρχονταν από ίζημα σε εκβολές ποταμού στην ΒΑ Αγγλία (Zhang *et al.* 2012). Ο φυλότυπος A29, ο οποίος αντιπροσώπευε το 9,1 % των βακτηρίων, παρουσίασε 99% ομοιότητα με το *Lactobacillus fuchuensis* strain MFPC41A28-08 το οποίο απομονώθηκε από βοδινό κρέας σε κενό (Lucquin *et al.* 2012). Ο φυλότυπος A30, ο οποίος αντιπροσώπευε το 9,1 % των βακτηρίων, παρουσίασε 99% ομοιότητα με το *Carnobacterium* sp. 'eilaticum 021211' το οποίο εντοπίστηκε σε καλλιέργεια από σφυρίδες που είχαν νοσήσει (Ucko & Colorni, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK) και 99% με το *Carnobacterium divergens* strain MFPC25A3001 το οποίο απομονώθηκε από βοδινό κρέας σε κενό (Lucquin *et al.* 2012). Ο φυλότυπος B47, ο οποίος αντιπροσώπευε το 9,1 % των βακτηρίων που

προσδιορίστηκαν φαινοτυπικά ως *Shewanella putrefaciens*, παρουσίασε 100% ομοιότητα με τον clone 219 από ακαλλιέργητο βακτήριο που προέρχονταν από χορτοφάγο κυπρίνο (*Ctenopharyngodon idellus*) (Wang & Wang, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK) και 99% με το *Shewanella putrefaciens* strain NBRC 101726 που προέρχονταν από συλλογή μικροοργανισμών της Ιαπωνίας (Nakagawa *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK). Ο φυλότυπος A33 αντιπροσώπευε την ομάδα των μικροοργανισμών που αποτελούσε το 70% της μικροβιακής σύνθεσης στους 15 °C που προσδιορίστηκε φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens* (Πίν. 3.8). Το υπόλοιπο 30% δεν ταυτοποιήθηκε.

Οι φυλότυποι B19, A33 ανήκαν στους κυρίαρχους μικροοργανισμούς στα φιλέτα σε ατμόσφαιρα αέρα, και οι φυλότυποι B9, B19, B48, A33 ανήκαν στους κυρίαρχους μικροοργανισμούς στα φιλέτα σε MAP. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη τη συνολική εικόνα που δόθηκε μέσω της κλασσικής και μοριακής προσέγγισης, οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί για τα φιλέτα αέρα ήταν το *Pseudomonas fragi* στους 0°C και στους 5°C και το *Pseudomonas migulae* strain P11 στους 15°C, ενώ για τα φιλέτα υπό MAP ήταν το *Pseudomonas veronii* strain PDD-37b-8 στους 0°C, το *Pseudomonas fragi* σε συγκυριαρχία με το *Carnobacterium maltaromaticum* strain MMF-32 στους 5°C και το *Pseudomonas migulae* strain P11 στους 15°C.

Μικροβιακός πληθυσμός στην ολόκληρη τσιπούρα

Στους ολόκληρους ιχθύες, ο αριθμός των φυλοτύπων που εντοπίστηκαν ήταν μικρότερος σε σχέση με τα φιλέτα. Παρόλα αυτά, πραγματοποιήθηκε μία σχετικά καλή εκτίμηση για τους φυλότυπους που ανήκαν στους κυρίαρχους μικροοργανισμούς οι οποίοι προέρχονταν από ιχθύες στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής και στο χρόνο

απόρριψης στους 0, 5 και 15 °C. Οι φυλότυποι που εντοπίστηκαν ήταν ο A6, A78, A5, A7 στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής, οι A72, A77, A22 στο χρόνο απόρριψης στους 0 °C, ο A8 στους 5°C και οι A70, A69, A66 στους 15 °C. Οι φυλότυποι A6, A8, A72 ανήκαν στους κυρίαρχους μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν από τους ολόκληρους ιχθύες στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής και στο χρόνο απόρριψης στους 5°C και 15°C, αντίστοιχα.

Στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής, επικράτησαν τέσσερις (4) ομάδες μικροοργανισμών οι οποίες χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά ως *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* (34,2%), *Shewanella putrefaciens* (28,9%), *Pseudomonas fluorescens* (26,3%) και *Flavobacterium damsela* (10,5%) (Πίν. 3.9). Με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA, οι ομάδες βρέθηκε να αποτελούνται από το *Pseudomonas fragi*, το *Shewanella putrefaciens*, το *Pseudomonas fluorescens* και το *Chryseobacterium shigense*, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, ο φυλότυπος A6 ο οποίος αντιπροσώπευε την κυρίαρχη ομάδα μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τους ολόκληρους ιχθύες την ημέρα 0 και προσδιορίστηκε φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*, έδειξε 99% ομοιότητα με το *Pseudomonas fragi* strain JCM 5477 που προέρχονταν από την Ιαπωνική συλλογή Μικροοργανισμών (Japan Collection of Microorganisms, JCM) 5477 (Hirosawa, Wako, Saitama) (Oshida *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Ο φυλότυπος A78, ο οποίος αντιπροσώπευε την ομάδα των μικροοργανισμών με ποσοστό 28,9%, που προσδιορίστηκε φαινοτυπικά ως *Shewanella putrefaciens*, παρουσίασε 100% ομοιότητα με τον clone 219 από ακαλλιέργητο βακτήριο που προέρχονταν από χορτοφάγο κυπρίνο (*Ctenopharyngodon idellus*) (Wang & Wang, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK) και 99% με το *Shewanella putrefaciens* strain NBRC 101726 που προέρχονταν από συλλογή μικροοργανισμών της Ιαπωνίας (Nakagawa *et*

al., αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK). Ο φυλότυπος A5, ο οποίος αντιπροσώπευε την ομάδα των μικροοργανισμών με ποσοστό 26,3%, που προσδιορίστηκε φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*, παρουσίασε 99% ομοιότητα με τον clone TM1831ObO5 από ακαλλιέργητο βακτήριο που προέρχονταν από τοίχο σπηλαίου καλυμμένο με λάβα (Northup *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK) και με το *Pseudomonas fluorescens* strain M-T-TSA_35 το οποίο προέρχονταν από την εντερική οδό του εντόμου *Rutilus rutilus* (Skrodenyte-Arbaciauskiene *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK). Ο φυλότυπος A7, ο οποίος αντιπροσώπευε την ομάδα των μικροοργανισμών με ποσοστό 10,5%, που προσδιορίστηκε φαινοτυπικά ως *Flavobacterium damsela*, παρουσίασε 99% ομοιότητα με το *Chryseobacterium* sp. 8_R23573 το οποίο απομονώθηκε από νωπό κοτόπουλο (Charimba *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK) και 98% με το *Chryseobacterium shigense* isolate 706B-08 το οποίο απομονώθηκε από το έντερο ιχθύος ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) (Zamora *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK).

Στο χρόνο απόρριψης επικράτησαν πέντε (5) ομάδες μικροοργανισμών στους 0 °C, τρεις (3) στους 5 °C και τέσσερις (4) στους 15°C. Στους 0 °C, την ημέρα της απόρριψης (d16), οι τέσσερις (4) ομάδες (με ποσοστό 25%, 25%, 17,9%, 17,9%, η κάθε μία αντίστοιχα) χαρακτηρίστηκαν ως *Pseudomonas fluorescens* και η άλλη (με ποσοστό 14,3%) ως *Shewanella putrefaciens* βάσει των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών (Πίν. 3). Ο φυλότυπος A72 ο οποίος βρέθηκε να αντιπροσωπεύει την ομάδα των μικροοργανισμών με ποσοστό 25%, έδειξε 99% ομοιότητα με το *Psychrobacter* sp. CJ-G-MA3 το οποίο εντοπίστηκε σε κόκκινο καβούρι (*Chionoecetes japonicus*) (Kim *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK) και 99% με το *Psychrobacter immobilis*

strain ATCC 43116 το οποίο προέρχονταν από σφάγιο πουλερικών (Deschaght *et al.* 2012). Ο φυλότυπος A77 ο οποίος βρέθηκε να αντιπροσωπεύει την ομάδα των μικροοργανισμών με ποσοστό 17,9%, έδειξε 100% ομοιότητα με το *Psychrobacter* sp. SON-1302 το οποίο προέρχονταν από χώμα που συλλέχθηκε από την πολιτεία Davis στην Ανταρκτική (Xiong & Yang, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK) και 100% με το *Psychrobacter cryohalolentis* strain HWG-A20 που προέρχονταν από παγωμένο έδαφος στην Σακγιά (Hu & Feng 2012, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK). Ο φυλότυπος A22 ο οποίος βρέθηκε να αντιπροσωπεύει την ομάδα των μικροοργανισμών με ποσοστό 14,3% που χαρακτηρίστηκε φαινοτυπικά ως *Shewanella putrefaciens*, έδειξε 99% ομοιότητα με το *Shewanella morhuae* strain U1417 το οποίο απομονώθηκε από μπακαλιάρo που προέρχονταν από τη θάλασσα της Βαλτικής στη Δαννία (Satomi *et al.* 2006). Οι φυλότυποι που αντιπροσωπεύουν τις άλλες δύο (2) ομάδες, που χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*, έδωσαν ελλιπή αποτελέσματα με αποτέλεσμα ένα σημαντικό ποσοστό των μικροοργανισμών (42,9%) να μην ταυτοποιηθεί με τις μοριακές καλλιεργητικές τεχνικές και την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA.

Στους 5 °C, με μοριακά χαρακτηρίστηκε η μία (1) από τις τρεις (3) ομάδες, η οποία αποτελούσε την κυρίαρχη ομάδα στην ολόκληρη τσιπούρα την ημέρα αλλοίωσης (d5) και προσδιορίστηκε φαινοτυπικά ως *Pseudomonas* sp.. Ο φυλότυπος A8, ο οποίος βρέθηκε να αντιπροσωπεύει την ομάδα αυτή, παρουσίασε 99% ομοιότητα με το *Pseudomonas* sp. Pier7 που προέρχονταν από ρυπασμένο με βαρέα μέταλλα έδαφος (Colinon *et al.* 2013) και 99% με το *Pseudomonas vranovensis* strain MM1-5 που προέρχονταν από το σπύλαιο Mawsmal (Joshi & Banerjee, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK).

Στους 15 °C, χαρακτηρίστηκαν οι τρεις (3) από τις τέσσερις (4) ομάδες. Ο φυλότυπος A70, ο οποίος αντιπροσώπευε την κυρίαρχη ομάδα (50%) την ημέρα της απόρριψης (d2) που προσδιορίστηκε φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*, παρουσίασε 99% ομοιότητα με το *Pseudomonas fluorescens* strain M-T-TSA_84 το οποίο προέρχονταν από την εντερική οδό του εντόμου *Rutilus rutilus* (Skrodenyte-Arbaciauskiene *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK). Ο φυλότυπος A69, ο οποίος αντιπροσώπευε την ομάδα με ποσοστό 4,2% που προσδιορίστηκε φαινοτυπικά ως *Pseudomonas fluorescens*, έδειξε 99% ομοιότητα με το βακτήριο *Pseudomonas* sp. HSF20-13, το οποίο απομονώθηκε από νωπό ιχθύ υπό ψύξη (Fukuda *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK) και 99% με το *Pseudomonas fragi* strain JCM 5435 από την συλλογή JCM 5435 (Oshida *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK). Ο φυλότυπος A66, ο οποίος αντιπροσώπευε την ομάδα με ποσοστό 41,7% που προσδιορίστηκε φαινοτυπικά ως *Moraxella lacunata*, παρουσίασε 99% ομοιότητα με το *Pseudomonas migulae* strain P11 (De Gelder *et al.* 2005).

Οι φυλότυποι A8 και A70 ανήκαν στους κυρίαρχους μικροοργανισμούς οι οποίοι απομονώθηκαν από εδώδιμο ιστό ολόκληρης τσιπούρας στο χρόνο απόρριψης μετά από συντήρηση στους 5°C και στους 15°C, αντίστοιχα. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη τη συνολική εικόνα που δόθηκε μέσω της κλασσικής και μοριακής προσέγγισης, οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί ήταν το *Pseudomonas vranovensis* strain MM1-5 στους 5°C και το *Pseudomonas fluorescens* strain M-T-TSA_84 σε συγκυριαρχία με το *Pseudomonas migulae* strain P11 στους 15°C. Στους 0°C, ο εντοπισμός των φυλοτύπων που ανήκαν στους κυρίαρχους μικροοργανισμούς ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί διότι οι φυλότυποι (A69, A70) που εντοπίστηκαν ανήκαν σε μικροοργανισμούς που ο αριθμός τους ήταν ίσος με αυτούς που οι φυλότυποί τους δεν εντοπίστηκαν. Η κάλυψη

της πληροφορίας αυτής δόθηκε με την εφαρμογή της τεχνικής της κλωνοποίησης και αλληλούχισης του 16S rRNA γονιδίου σε προκαρυωτικό DNA απευθείας από τη σάρκα του ιχθύος.

Ανάλυση γονιδίου 16S rRNA σε ιστό ιχθύος τσιπούρας στον πάγο, κλωνοποίηση και ταυτοποίηση με ανάλυση βιβλιοθήκης κλώνων

Συνολικά, δημιουργήθηκαν δύο βιβλιοθήκες κλώνων (βιβλιοθήκη κλώνων d0 και βιβλιοθήκη κλώνων d16) από τις οποίες προέκυψαν και μελετήθηκαν 55 αλληλουχίες οι οποίες προέρχονταν από τη σάρκα ολόκληρης τσιπούρας στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής (d0) και 47 αλληλουχίες στο χρόνο απόρριψης (d16). Οι φυλότυποι SB-d0-2 και SB-d0-3 αποτέλεσαν τους κυρίαρχους φυλότυπους στη σάρκα του ιχθύος την ημέρα 0, με συχνότητες 34.7% και 59.2%, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, ο φυλότυπος SB-d0-2 παρουσίασε 100% ομοιότητα με τον clone 15-4-65 από ακαλλιέργητο βακτήριο (Chen *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK) και με τον *Acinetobacter* sp. clone 3.29m14 από ακαλλιέργητο βακτήριο (Fang, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK). Ο φυλότυπος SB-d0-3 παρουσίασε 99,9% ομοιότητα με τον gamma proteobacterium clone PEACE2006/173P3 ο οποίος προέρχονταν από ακαλλιέργητο βακτήριο του θαλάσσιου περιβάλλοντος (Van Oostende *et al.*, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK) και 99,9% με τον gamma proteobacterium clone OXIC-072 ακαλλιέργητου βακτηρίου που προέρχονταν από ρυπασμένο με πετρέλαιο ίζημα σε θαλάσσιο περιβάλλον στην Ισπανία (Acosta-Gonzalez *et al.* 2013). Οι δύο φυλότυποι βρέθηκε να έχουν τους ίδιους δύο χαρακτηρισμένους κοντινούς συγγενείς, τον *Acinetobacter baumannii* SDF (Vallenet *et al.* 2008) και τον *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. anitratus (Phetrong *et al.* 2008).

Ο SB-d16-3 αποτέλεσε τον επικρατέστερο φυλότυπο την ημέρα της απόρριψης (d16) με ποσοστό 28.6% έχοντας κοντινότερο χαρακτηρισμένο συγγενή κατά 99,8% το *Aeromonas salmonicida* strain CIP 57.50 (Σχ. 3.2). Ο φυλότυπος SB-d16-6 εντοπίστηκε σε ποσοστό 9.5% και χαρακτηρίστηκε ως *Shewanella putrefaciens*-like phylotype. Οι υπόλοιποι 4 φυλότυποι που εντοπίστηκαν (SB-d16-1, SB-d16-2, SB-d16-5, SB-d16-13), αποτέλεσαν συνολικά το υπόλοιπο 44.8% και ανήκαν στην ομάδα των *Pseudomonas* sp. Αναλυτικότερα, ο φυλότυπος SB-d16-1 εντοπίστηκε με συχνότητα 9,5% και έδειξε 99,7% ομοιότητα με το *Pseudomonas putida* isolate PhyCEm-187 το οποίο απομονώθηκε από τη ριζόσφαιρα της πόας *Lolium perenne* (Jossi, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK). Ο φυλότυπος SB-d16-2 εντοπίστηκε με συχνότητα 14,3% και έδειξε 100% ομοιότητα με το *Pseudomonas* sp. DD1 το οποίο απομονώθηκε από τον εντερικό σωλήνα του κλαδοκερωτού *Daphnia magna* (Martin-Creuzburg *et al.* 2011). Ο φυλότυπος SB-d16-5 εντοπίστηκε με συχνότητα 9,5% και έδειξε 99,5% ομοιότητα με τον clone A8 ακαλλιέργητου βακτηρίου που προέρχονταν από νωπό χοιρινό (Yun, αδημοσίευτα αποτελέσματα GENBANK) και βρέθηκε να έχει κοντινότερο χαρακτηρισμένο συγγενή, το βακτήριο *Pseudomonas lundensis* strain ATCC 49968 (Anzai *et al.* 2000). Ο φυλότυπος SB-d16-13 εντοπίστηκε με συχνότητα 9,5% και έδειξε 99,6% ομοιότητα με το *Pseudomonas fluorescens* strain LMG 14577 το οποίο απομονώθηκε από μολυσμένα νερά ποταμού στο Βέλγιο (Matthijs *et al.* 2012). Επομένως, οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί στην ολόκληρη τσιπούρα στο χρόνο απόρριψης μετά από συντήρηση στον πάγο 0°C ήταν τα *Pseudomonas* sp. σε συγκυριαρχία με το *Aeromonas salmonicida* strain CIP 57.50.

3.4 Συζήτηση

Τα *Pseudomonas* spp. φαίνεται να αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των κυρίαρχων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, τόσο σε προϊόντα ιχθύος αποθηκευμένα σε ατμόσφαιρα αέρα (φιλέτο, ολόκληρο) όσο και σε MAP (φιλέτο μόνο) και με τις δύο προσεγγίσεις (κλασσική και μοριακή). Εξαίρεση αποτέλεσε η περίπτωση της συντήρησης των φιλέτων σε MAP στους 5°C, όπου το μεγαλύτερο ποσοστό της μικροβιακής σύνθεσης αποτελούνταν από είδη/στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων με κυρίαρχο το *C. maltaromaticum* strain MMF-32. Επίσης, στην περίπτωση της συντήρησης ολόκληρης τσιπούρας στον πάγο, το *A. salmonicida* βρέθηκε να συγκυριαρχεί με τα *Pseudomonas* spp. στο χρόνο απόρριψης των ιχθύων.

Τα *Pseudomonas* spp. έχουν χαρακτηριστεί ως ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί των νωπών ιχθύων οι οποίοι συντηρούνται υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες (Lima dos Santos 1981, Gram *et al.* 1989, Gram *et al.* 1990, Koutsoumanis & Nychas 1999, Koutsoumanis & Nychas 2000, Tryfinopoulou *et al.* 2002), ενώ τα οξυγαλακτικά κυριαρχούν κυρίως σε συσκευασίες MAP στις θερμοκρασίες αυτές (Lanelonque *et al.* 1982, Koutsoumanis & Nychas 1999). Το *C. maltaromaticum* και το *A. salmonicida*, έως σήμερα, δεν έχουν αναφερθεί ως ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί νωπών ιχθύων της Μεσογείου. Ωστόσο, τα *Carnobacterium* spp. αποτελούν σημαντικό μέρος της αλλοιωγόνου μικροβιακής σύνθεσης διάφορων αλιευμάτων όπως είναι η αποφλοιωμένη και μαγειρεμένη τροπική γαρίδα (Jaffrès *et al.* 2009) και ο σολομός σε MAP (60% CO₂ and 40% N₂) στους 5°C (Rudi *et al.* 2004), ενώ τα *Aeromonas* spp. αποτελούν σημαντικό μέρος της αλλοιωγόνου μικροβιακής σύνθεσης τόσο σε νωπούς ιχθύες θαλασσινού όσο και σε γλυκού νερού στον πάγο (Gonzalez *et al.* 2001, Hozbor *et al.* 2007).

Οι κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί, λαμβάνοντας υπόψη τη μοριακή ταυτοποίηση, ως πλέον ακριβέστερη, έδειξαν ότι σε επίπεδο στελέχους, ήταν το *P. fragi* strain JCM 5396 στους 0 °C, *P. fragi* στους 5 °C και το *P. migulae* strain P11 στους 15 °C στα φιλέτα υπό συνθήκες αέρα, ενώ το *P. veronii* strain PDD-37b-8 στους 0 °C, το *C. maltaromaticum* strain MMF-32 στους 5 °C και το *Pseudomonas migulae* strain P11 στους 15 °C στα φιλέτα υπό συνθήκες MAP. Στους ολόκληρους ιχθύες, οι κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί που προέκυψαν ήταν το *A. salmonicida* strain CIP 57.50 στους 0 °C (πάγος), το *P. vranovensis* strain MM1-5 στους 5 °C και το *P. fluorescens* strain M-T-TSA-84 στους 15 °C. Το *P. fragi* και *P. fluorescens* αποτελούν τα δύο κυρίαρχα είδη των *Pseudomonas* spp. που απαντώνται στους ιχθύες (Gennari & Dragotto 1992). Οι Lebert *et al.* (1998) αναφέρουν ότι το *P. fragi* επικρατεί έναντι του *P. fluorescens*, σε ιχθύες υπό θερμοκρασίες ψύξης, λόγω της μικρότερης φάσης προσαρμογής που παρουσιάζει το πρώτο σε σχέση με το δεύτερο. Πράγματι, στην παρούσα διατριβή το *P. fragi* επικράτησε ως αλλοιωγόνος μικροοργανισμός στα φιλέτα υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης. Η αλλοιωγόνος μικροβιακή σύνθεση βρέθηκε να είναι διαφορετική σε διαφορετική ατμόσφαιρα από αυτή του αέρα (MAP) και σε υψηλή θερμοκρασία (15 °C). Το *P. veronii* και το *C. maltaromaticum* βρέθηκε να επικρατούν ως αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί στα φιλέτα σε MAP στους 0 °C και 5 °C αντίστοιχα. Η χρήση χαμηλής συγκέντρωσης O₂ (10%) φαίνεται να ευθύνεται για την επιλογή των μικροοργανισμών αυτών στη συσκευασία MAP σε σχέση με την αποθήκευση στη συσκευασία αέρα στις θερμοκρασίες αυτές. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η επιλογή διαφορετικών βακτηριακών ειδών ή στελεχών οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και ατμόσφαιρας οι οποίες επικρατούν κατά τη συντήρηση (Leisner & Gram 1999). Επιπλέον, η επιλογή

του *P. migulae* στους 15 °C στα φιλέτα και στις δύο ατμόσφαιρες φαίνεται να συνδέεται με την αποθήκευση σε υψηλή θερμοκρασία. Είναι γνωστό ότι η συσκευασία σε MAP δεν επιδρά στη μικροβιακή σύνθεση των αλιευμάτων κατά τη συντήρηση σε υψηλές θερμοκρασίες (Koutsoumanis *et al.* 2000). Επίσης, η αλλοιωγόνος μικροβιακή σύνθεση βρέθηκε να είναι διαφορετική στην ολόκληρη τσιπούρα σε σχέση με αυτή που βρέθηκε να επικρατεί στα φιλέτα στις ίδιες συνθήκες συντήρησης. Διαφορετικά είδη των *Pseudomonas* spp. βρέθηκε να επικρατούν στην ολόκληρη τσιπούρα σε σχέση με αυτά που επικρατούν στα φιλέτα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές μεταχειρίσεις των ολόκληρων και των φιλέτων από την υδατοκαλλιέργεια και τη βιομηχανία. Η παρουσία του *A. salmonicida* στους ολόκληρους ιχθύες στον πάγο φαίνεται να οφείλεται κυρίως στο ότι τα φιλέτα και οι ολόκληροι ιχθύες προέρχονταν από διαφορετικές παρτίδες ιχθύων οι οποίοι εξαλιεύθηκαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

Στον Ελλαδικό χώρο δεν υπάρχει καμία μελέτη σχετικά με τη διερεύνηση της ολικής μικροβιακής ποικιλότητας με κλασσικές τεχνικές, μοριακές καλλιεργητικές ή μοριακές-μη καλλιεργητικές τεχνικές όπως η εκχύλιση DNA απευθείας από τη σάρκα των ιχθύων για να μπορεί να γίνει κάποια σύγκριση. Οι Tryfinopoulou *et al.* (2002) μελέτησαν την ποικιλότητα των *Pseudomonas* που απομονώθηκαν στο εκλεκτικό υλικό CFC χρησιμοποιώντας κλασσικές τεχνικές καθώς και τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης των κυτταρικών πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με δωδεκανοθειϊκό νάτριο (SDS-PAGE analysis), όπου βρέθηκε ότι τα *P. lundensis* και *P. fluorescens* αποτέλεσαν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν με το CFC στο χρόνο απόρριψης της τσιπούρας στον πάγο. Στην παρούσα διατριβή, τα *P. lundensis* βρέθηκε να αποτελούν μέρος της κυρίαρχης μικροβιακής σύνθεσης κατά την αλλοίωση της

τσιπούρας στον πάγο, ενώ το *A. salmonicida* βρέθηκε να αποτελεί τον κυρίαρχο μικροοργανισμό. Η χρήση διαφορετικών τεχνικών φαίνεται να ευθύνεται για τις διαφορές που προέκυψαν μεταξύ της παρούσας διατριβής και της παραπάνω μελέτης κατά τη διερεύνηση της κυρίαρχης αλλοιωγόνου μικροβιακής σύνθεσης της τσιπούρας στον πάγο. Οι μοριακές μη-καλλιεργητικές τεχνικές, όπως αυτή της παρούσας διατριβής, έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικότερες σε σχέση με τις μοριακές καλλιεργητικές τεχνικές, διότι αποκαλύπτουν πολλές φορές μικροοργανισμούς οι οποίοι αδυνατούν να αναπτυχθούν σε κάποια θρεπτικά υλικά (Schirmer *et al.* 2009, Rasolofo *et al.* 2010).

Επιπρόσθετα, νέοι βακτηριακοί τύποι οι οποίοι φαίνεται να συγκυριαρχούν με τα *Pseudomonas* spp. αναδείχθηκαν μέσω της μοριακής προσέγγισης μόνο. Στην περίπτωση των φιλέτων, τα *Pseudomonas fragi* βρέθηκε να συγκυριαρχούν με το *C. maltaromaticum* strain MMF-32, το οποίο αναγνωρίστηκε ως ο κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός σε επίπεδο στελέχους στους 5°C υπό συνθήκες MAP με τις μοριακές καλλιεργητικές τεχνικές (ανάλυση γονιδίου 16S rRNA σε καλλιέργειες από τρυβλία). Παρόλα αυτά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι καλλιεργητικές τεχνικές παρουσιάζουν μειονεκτήματα. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να πραγματοποιηθούν επιπρόσθετες μελέτες με τη χρήση μοριακών μη-καλλιεργητικών τεχνικών. Με τον τρόπο αυτό θα δωθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η απάντηση για το αν το *C. maltaromaticum* μπορεί να αποτελέσει κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό των ιχθύων της Μεσογείου σε MAP.

Στην ολόκληρη τσιπούρα, τα *Pseudomonas* spp. βρέθηκε να συγκυριαρχούν με το *A. salmonicida* strain CIP 57.50 στον πάγο (0°C), με τις μοριακές-μη καλλιεργητικές τεχνικές (απευθείας εκχύλιση DNA από τη σάρκα του ιχθύος). Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα σε τρόφιμα, αναδεικνύοντας το *A.*

salmonicida ως ένα νέο πιθανό κυρίαρχο μικροοργανισμό στα αλιεύματα ο οποίος δεν ταυτοποιήθηκε με τις καλλιεργητικές τεχνικές (κλασσικές & ανάλυση γονιδίου σε καλλιέργειες από τρυβλία). Ωστόσο, ο χαρακτηρισμός του ως κυρίαρχου αλλοιωγόνου μένει να διελευκανθεί. Το *A. salmonicida* είναι ένα γνωστό παθογόνο βακτήριο το οποίο προσβάλλει την τσιπούρα υδατοκαλλιέργειας (Zorrilla *et al.* 2003). Παρόλα αυτά ήταν ο μικροοργανισμός που συγκυριάρχησε με τα *Pseudomonas* spp. κατά την αλλοίωση της ολόκληρης τσιπούρας στον πάγο. Δεν υπάρχει μέχρι στιγμής κάποια μελέτη σχετικά με το δυναμικό και την ικανότητα αλλοίωσης (spoilage potential and spoilage activity) του *A. salmonicida*.

Επίσης, τα *P. immobilis* και τα *P. cryohalolentis* βρέθηκε να αποτελούν ένα πολύ σημαντικό ποσοστό της μικροβιακής σύνθεσης στην ολόκληρη τσιπούρα στον πάγο, με τις μοριακές-καλλιεργητικές τεχνικές. Τα βακτήρια αυτά βρέθηκε να αποτελούν, μαζί με τα *Pseudomonas* spp., σημαντικό ποσοστό της αλλοιωγόνου μικροβιακής σύνθεσης του χονδρο-ιχθύος ρίνας (*Raja* sp.) στον πάγο με παρόμοιες τεχνικές στην Β. Ευρώπη (Broekaert *et al.* 2012).

Στους ιχθύες της Μεσογείου, οι συσκευασίες MAP, εκτός των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ευνοούν την αύξηση του *B. thermosphacta* (Drosinos & Nychas 1996, Drosinos *et al.* 1997, Koutsoumanis & Nychas 1999). Το *B. thermosphacta*, παρόλο που απαριθμήθηκε σε υψηλούς σχετικά πληθυσμούς στο εκλεκτικό υλικό STAA, δεν απομονώθηκε σε καμία εκ των περιπτώσεων στην παρούσα μελέτη. Το πιο πιθανό είναι να μειονεκτεί να αναπτυχθεί σε υλικό γενικής χρήσης όπως είναι το TSA. Οι Broekaert *et al.* (2011) ταυτοποίησαν μοριακά (με αλληλούχιση των γονιδίων 16S rRNA και *gyrB* καθώς και με ανάλυση DGGE) μικροοργανισμούς που προέρχονταν από διάφορα είδη ιχθύων αποθηκευμένα στον πάγο, μετά από απομόνωση αυτών σε διάφορα θρεπτικά

υλικά γενικής χρήσης (PCA, MA, LH, Lyngby IA, MA και LH με 1% NaCl). Από τις αναλύσεις προέκυψε ότι ορισμένοι μικροοργανισμοί των γενών *Shewanella*, *Vibrio*, *Aliivibrio*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas* και *Psychrobacter*, καθώς και το *P. phosphoreum*, *S. baltica* και *P. fluorescens* δεν αυξήθηκαν στο PCA, ενώ αυξήθηκαν στα υπόλοιπα υλικά που μελετήθηκαν. Τα LH και MA έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα, παρόλο που και σε αυτά κάποιοι μικροοργανισμοί, όπως είναι το *P. fragi* και το *Acinetobacter* sp., δεν αυξήθηκαν. Επομένως, η αύξηση του *B. thermosphacta* σε υλικά γενικής χρήσης αλλά και στο εκλεκτικό υλικό STAA χρήζει περαιτέρω διερεύνησης με τα πλέον σύγχρονα μοριακά εργαλεία. Επιπλέον, η αδυναμία αύξησης σημαντικών μικροοργανισμών στα θρεπτικά υλικά μπορεί να καλυφθεί πλέον με την εφαρμογή μη καλλιεργητικών τεχνικών.

Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με κλασσική και μοριακή προσέγγιση έδειξε ότι τις περισσότερες φορές, οι δύο προσεγγίσεις συμπίπτουν σε επίπεδο γένους ή/και είδους, αλλά ταυτόχρονα ένα σημαντικό ποσοστό βρέθηκε να παρουσιάζει μία τελείως διαφορετική εικόνα. Η εκτίμηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι μοριακές τεχνικές και ιδιαίτερα η ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης στα αλιεύματα, καλύπτοντας την πληροφορία που διαφεύγει των κλασσικών τεχνικών. Επίσης, διαπιστώνεται για ακόμα μία φορά ότι η μελέτη με μοριακές μεθόδους αποδεικνύεται αποτελεσματικότερη για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, σε αντίθεση με τη χρήση των κλασσικών μεθόδων, οι οποίες πολλές φορές παρέχουν ελλιπή αποτελέσματα (Baumann *et al.* 1972, Molin και Ternstrom 1986, Christensen *et al.* 1994).

Η διερεύνηση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και η επιβεβαίωση της ύπαρξης και άλλων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα με την εφαρμογή των σύγχρονων τεχνικών φαίνεται να αποτελεί ένα επιπλέον βήμα για την βαθύτερη κατανόηση της διαδικασίας της αλλοίωσης. Η διερεύνηση της αλλοιωγόνου δυναμικής των μικροοργανισμών αυτών, δηλαδή της ικανότητάς τους να παράγουν ουσίες οι οποίες οδηγούν στην οργανοληπτική απόρριψη, αποτελεί το επόμενο βήμα.

Πίνακας 3.1. Χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης και επίπεδο μικροβιακού πληθυσμού ολόκληρων ιχθύων και φιλέτων τσιπούρας υπό διάφορες συνθήκες συντήρησης.

Προϊόν	Θερμοκρασία αποθήκευσης (°C)	Χρόνος απόρριψης (ημέρες)	Επίπεδο μικροβιακού πληθυσμού (log cfu/g)
	0 (πάγος)	16	7,75
Ολόκληροι ιχθύες	5	5	7,56
	15	2	7,68
Φιλέτα σε αερόβιες συνθήκες	0	14	7,78
	5	5	7,75
	15	2	7,53
Φιλέτα σε MAP	0	18	7,75
	5	8	7,94
	15	2	8,30

Πίνακας 3.2. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποικιών που απομονώθηκαν σε TSA από τη σάρκα νωπών ολόκληρων ιχθύων τσιπούρας. Σε παρένθεση παρουσιάζεται η δεκαδική αραίωση από την οποία προέκυψε ο αριθμός των αποικιών στα τρυβλία.

	Αριθμός αποικιών	Χρώση Gram	Σχήμα	Οξειδάση	Καταλάση	H L	TMAO	H ₂ S
----- Αρχική μικροβιακή σύνθεση ολόκληρης τσιπούρας (αραίωση -1)								
	13	-	β	+	+	O	-	-
	11	-	β	+	+	-	+	+
	10	-	β	+	+	O	-	-
	4	-	β	+	+	O	-	-
----- Αλλοιωγόνος μικροβιακή σύνθεση ολόκληρης τσιπούρας (αραίωση -5)								
0°C	7	-	β	+	+	-	-	-
	7	-	β	+	+	-	-	-
	5	-	β	+	+	-	-	-
	5	-	β	+	+	-	-	-
	4	-	β	+	+	-	+	+
5°C	10	-	β	+	+	O	-	-
	7	-	β	+	+	-	+	+
	1	-	β	+	+	O	-	-
15°C	12	-	β	+	+	O	-	-
	10	-	β	+	+	O	-	-
	1	-	β	+	+	O	-	-
	1	-	β	+	+	-	+	+

β: βάκιλλος, O: οξειδωτικός μεταβολισμός, (-): αρνητική αντίδραση ή καμία μεταβολή, (+): θετική αντίδραση.

Πίνακας 3.3. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποικιών που απομονώθηκαν σε TSA από τη σάρκα νωπών φιλέτων ιχθύος τσιπούρας. Σε παρένθεση παρουσιάζεται η δεκαδική αραίωση από την οποία προέκυψε ο αριθμός των αποικιών στα τρυβλία.

	Αριθμός αποικιών	Χρώση Gram	Σχήμα	Οξειδάση	Καταλάση	H L	TMAO	H ₂ S
----- Αρχική μικροβιακή σύνθεση φιλέτων τσιπούρας (αραίωση -1) -----								
	11	-	β	+	+	O	-	-
	6	-	β	+	+	O	-	-
	6	+	κ	+	+	-	-	-
	4	-	β	+	+	-	-	-
	4	-	β	+	+	-	-	-
----- Αλλοιωγόνος μικροβιακή σύνθεση σε φιλέτα υπό συνθήκες αέρα (αραίωση -5) -----								
0°C	20	-	β	+	+	O	-	-
	6	-	β	+	+	O	-	-
	4	-	β	+	+	-	+	+
5°C	15	-	β	+	+	O	-	-
	7	-	β	+	+	O	-	-
	6	-	β	+	+	O	-	-
15°C	10	-	β	+	+	-	-	-
	3	-	β	+	+	O	-	-
	3	-	β	+	+	O	-	-
	1	-	β	+	+	O	-	-
----- Αλλοιωγόνος μικροβιακή σύνθεση σε φιλέτα υπό συνθήκες MAP (αραίωση -5) -----								
0°C	17	-	β	+	+	O	-	-
	11	-	β	+	+	Z	-	-
5°C	11	-	β	+	+	O	-	-
	5	-	β	+	+	O	-	-
	12	+	κ/β	-	-	Z	-	-
	4	+	κ/β	-	-	Z	-	-
	4	+	κ/β	-	-	Z	-	-
	4	+	κ/β	-	-	Z	-	-
	4	-	β	+	+	-	+	+
15°C	7	-	β	+	+	O	-	-
*	3	-	β	+	+	O	-	-

β: βάκιλλος, κ: κόκκος, O: οξειδωτικός μεταβολισμός, Z: ζυμωτικός μεταβολισμός, (-): αρνητική αντίδραση ή καμία μεταβολή, (+): θετική αντίδραση. *αρ. -6

Πίνακας 3.4 Επικρατείς φυλότυποι σε φιλέτα (Φ) και σε ολόκληρη τσιπούρα (Ο).

Φυλότυπος		Συχνότητα %		Κοντινότερος συγγενής (κωδικός GenBank) (ομοιότητα)		Κοντινότερος χαρακτηρισμένος συγγενής (κωδικός GenBank) (ομοιότητα)	
Φ	Ο	Φ	Ο	Φιλέτο	Ολόκληρο	Φιλέτο	Ολόκληρο
B1	A5	2,7	11,8	<i>Macrococcus</i> sp. clone T438 (EU029513) (99%)	clone TM1831ObO5 (JN615777) (99%)	<i>Macrococcus caseolyticus</i> strain YSY1-12 (GU197537) (99%)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain M-T-TSA (JQ795779) (99%)
B2	A6	2,7	11,8	clone SB-d16-1 (JQ664575) (97%)	<i>Pseudomonas fragi</i> strain JCM 5477 (AB685683) (99%)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain LMG 14577 (GU198122) (97%)	<i>Pseudomonas fragi</i> strain: JCM 5477 (AB685683)(99%)
B5	A7	9,3	5,9	clone LP09x_D8A (JQ047962) (99%)	<i>Chryseobacterium</i> sp. 8_R23573 (JN935268)(99%)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain DF41TB (JN642252) (99%)	<i>Chryseobacterium shigense</i> isolate 706B-08 (FR872752) (98%)
B6	A8*	2,7	5,9	<i>Psychrobacter</i> sp. C16 (DQ646864) (99%)	<i>Pseudomonas</i> sp. Pier7 (KC195895)(99%)	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> strain KOPRI22219 (EU090718) (99%)	<i>Pseudomonas vranovensis</i> strain MM1-5 (JX144946) (99%)
B8	A22*	2,7	5,9	<i>Psychrobacter</i> sp. FI 1008 (JQ691535) (99%)	<i>Shewanella morhuae</i> strain U1417 (NR041299) (99%)	<i>Psychrobacter maritimus</i> strain CAIM 952 (HM584045)(99%)	<i>Shewanella morhuae</i> strain U1417 (NR041299)(99%)
B9	A66*	16,0		<i>Pseudomonas</i> sp. HC4-1 (JF313000) (99%)	<i>Pseudomonas migulae</i> strain P11 (AY972167) (99%)	<i>Pseudomonas veronii</i> strain PDD-37b-8 (JF706536) (98%)	<i>Pseudomonas migulae</i> strain P11 (AY972167) (99%)
B19	A69*	29,3	11,8	<i>Pseudomonas</i> sp. FI 1029 (JQ691536) (99%)	<i>Pseudomonas</i> sp. HSF20-13 (AB705302) (99%)	<i>Pseudomonas fragi</i> strain: JCM 5396 (AB685609) (99%)	<i>Pseudomonas fragi</i> strain: JCM 5435 (AB685646) (99%)
B18*	A70	5,3	5,9	<i>Pseudomonas</i> sp. HSF20-13 (AB705302) (99%)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain M-T-TSA_84 (JQ795779) (99%)	<i>Pseudomonas fragi</i> strain: JCM 5435 (AB685646) (99%)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain M-T-TSA_84 (JQ795779) (99%)
B22*	A72	2,7	11,8	<i>Shewanella morhuae</i> strain U1417 (NR041299) (99%)	<i>Psychrobacter</i> sp. CJ-G-MA3 (HM584283)(99%)	<i>Shewanella morhuae</i> strain U1417 (NR041299)(99%)	<i>Psychrobacter immobilis</i> strain ATCC 43116 (HQ698589)(99%)
B47	A77	2,7	11,8	clone 219 (FR853471)	<i>Psychrobacter</i> sp. SON-1302	<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>

*				(100%)	(JX196639) (100%)	strain NBRC 101726 (AB681550) (99%)	strain HWG-A20 (JQ684243) (100%)
B48	A78*	8,0	11,8	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> strain MMF-32 (GQ304940) (100%)	clone 219 (FR853471) (100%)	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> strain MMF-32 (GQ304940) (100%)	<i>Shewanella putrefaciens</i> strain: NBRC 101726 (AB681550) (99%)
A27		2,7	11,8	<i>Vagococcus</i> sp. MES18 16S (JX026029) (100%)		<i>Vagococcus fluvialis</i> strain MS23 (FN997619)(98%)	
A29		2,7		<i>Lactobacillus fuchuensis</i> strain MFPC41A28-08 (JF756333) (99%)		<i>Lactobacillus fuchuensis</i> strain MFPC41A28-08 (JF756333) (99%)	
A12		2,7		<i>Pseudomonas fragi</i> strain:MA07(AB609073)		<i>Pseudomonas fragi</i> strain:MA07(AB609073)	
A30		2,7		<i>Carnobacterium</i> sp. 'eilaticum 021211' (JQ780608)		<i>Carnobacterium divergens</i> strain MFPC 25A3001(JF756314) (99%)	
A33*		2,7		<i>Pseudomonas migulae</i> strain P11 (AY972167) (99%)		<i>Pseudomonas migulae</i> strain P11 (AY972167) (99%)	
A40		1,3		<i>Pseudomonas</i> sp. S_T_TSA_35 (JX860539) (99%)		<i>Pseudomonas</i> sp. S_T_TSA_35 (JX860539) (99%)	
A42*		1,3		<i>Pseudomonas</i> sp. Pier7 (KC195895) (99%)		<i>Pseudomonas vranovenssis</i> strain MM1-5 (JX144946) (99%)	

*κοινοί φυλότυποι μεταξύ φιλέτων και ολόκληρων ιχθύων

Πίνακας 3.5 Ταυτοποίηση της αρχικής μικροβιακής σύνθεσης φιλέτων ιχθύων τσιπούρας με τον έλεγχο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών, τη μέθοδο του συστήματος API και με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA.

Αριθμός & ποσοστό αποικιών που ταυτοποιήθηκαν με κλασσική & μοριακή (παρένθεση) προσέγγιση		Με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά & API	Με ανάλυση γονιδίου 16S rRNA
Αριθμός	%	Κοντινότερος χαρακτηρισμός βακτηρίου	Κοντινότερος χαρακτηρισμένος συγγενής από Blast database (κωδικός GenBank) (ομοιότητα)
I	11 (6)	35.5	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> strain DF41TB (JN642252) (99%)
II	6 (2)	19.5	<i>Micrococcus</i> sp. <i>Micrococcus caseolyticus</i> strain YSY1-12 (GU197537) (99%)
III	6 (2)	19.5	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> strain LMG 14577 (GU198122) (97%)
IV	4 (2)	13.0	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Psychrobacter cryohalolentis</i> strain KOPRI_22219 (EU090718) (99%)
V	4 (2)	13.0	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Psychrobacter maritimus</i> strain CAIM 952 (HM584045) (99%)

Πίνακας 3.6. Ταυτοποίηση της αλλοιωγόνου μικροβιακής σύνθεσης φιλέτων ιχθύων τσιπούρας στους 0°C με τον έλεγχο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών, τη μέθοδο του συστήματος API και με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA. A: Αέρας, M: MAP

Αριθμός & ποσοστό αποικιών που ταυτοποιήθηκαν με κλασσική & μοριακή (παρένθεση) προσέγγιση		Με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά & API				Με ανάλυση γονιδίου 16S rRNA			
						Κοντινότερος συγγενής από Blast database (κωδικός GenBank) (ομοιότητα)			
Αριθμός		%		Κοντινότερος χαρακτηρισμός βακτηρίου					
A	M	A	M	A	M	A	M		
I	20 (8)	17 (8)	66. 7	60. 7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>	<i>Pseudomonas fragi</i> strain: JCM 5396 (AB685609) (99%)	<i>Pseudomonas veronii</i> strain PDD-37b-8 (JF706536) (98%)	
	II	4 (2)	11 (4)	13. 3	39. 3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Pseudomonas fragi</i> strain: JCM 5435 (AB685646) (99%)	<i>Pseudomonas veronii</i> strain PDD-37b-8 (JF706536) (98%)
II	6 (2)		20. 0		<i>Shewanella putrefaciens</i>		<i>Shewanella morhuae</i> strain U1417 (NR041299) (99%)		

Πίνακας 3.7. Ταυτοποίηση της αλλοιωγόνου μικροβιακής σύνθεσης φιλέτων ιχθύων τσιπούρας στους 5°C με τον έλεγχο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών, τη μέθοδο του συστήματος API και με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA. A: Αέρας, M: MAP

Αριθμός & ποσοστό αποικιών που ταυτοποιήθηκαν με κλασσική & μοριακή (παρένθεση) προσέγγιση				Με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά & API		Με ανάλυση γονιδίου 16S rRNA	
Αριθμός		%		Κοντινότερος χαρακτηρισμός βακτηρίου		Κοντινότερος χαρακτηρισμένος συγγενής από Blast database (κωδικός GenBank) (ομοιότητα)	
A	M	A	M	A	M	A	M
I	15 (7)	11 (5)	53. 25. 6 0	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fragi</i> (AB685609) (99%)	<i>Pseudomonas fragi</i> (AB685609) (99%)
II	7 (2)	5 (2)	25. 11. 0 4	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fragi</i> strain:MA07 (AB609073) (98%)	<i>Pseudomonas fragi</i> strain JCM 5435 (AB685646) (99%)
II I	6 (2)	12 (6)	21. 27. 4 3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Pseudomonas fragi</i> (AB685609) (99%)	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> strain MMF-32 (GQ304940) (100%)
I V		4 (2)			<i>Lactobacillus</i> sp.		<i>Lactobacillus fuchuensis</i> strain MFPC41A28-08 (JF756333) (99%)
V		4 (2)			<i>Lactobacillus</i> sp.		<i>Vagococcus fluvialis</i> strain MS23 (FN997619) (98%)
V I		4 (2)			<i>Lactobacillus</i> sp.		<i>Carnobacterium divergens</i> strain MFPC25A3001 (JF756314) (99%)
V II		4 (2)			<i>Shewanella putrefaciens</i>		<i>Shewanella putrefaciens</i> strain: NBRC 101726 (AB681550) (99%)

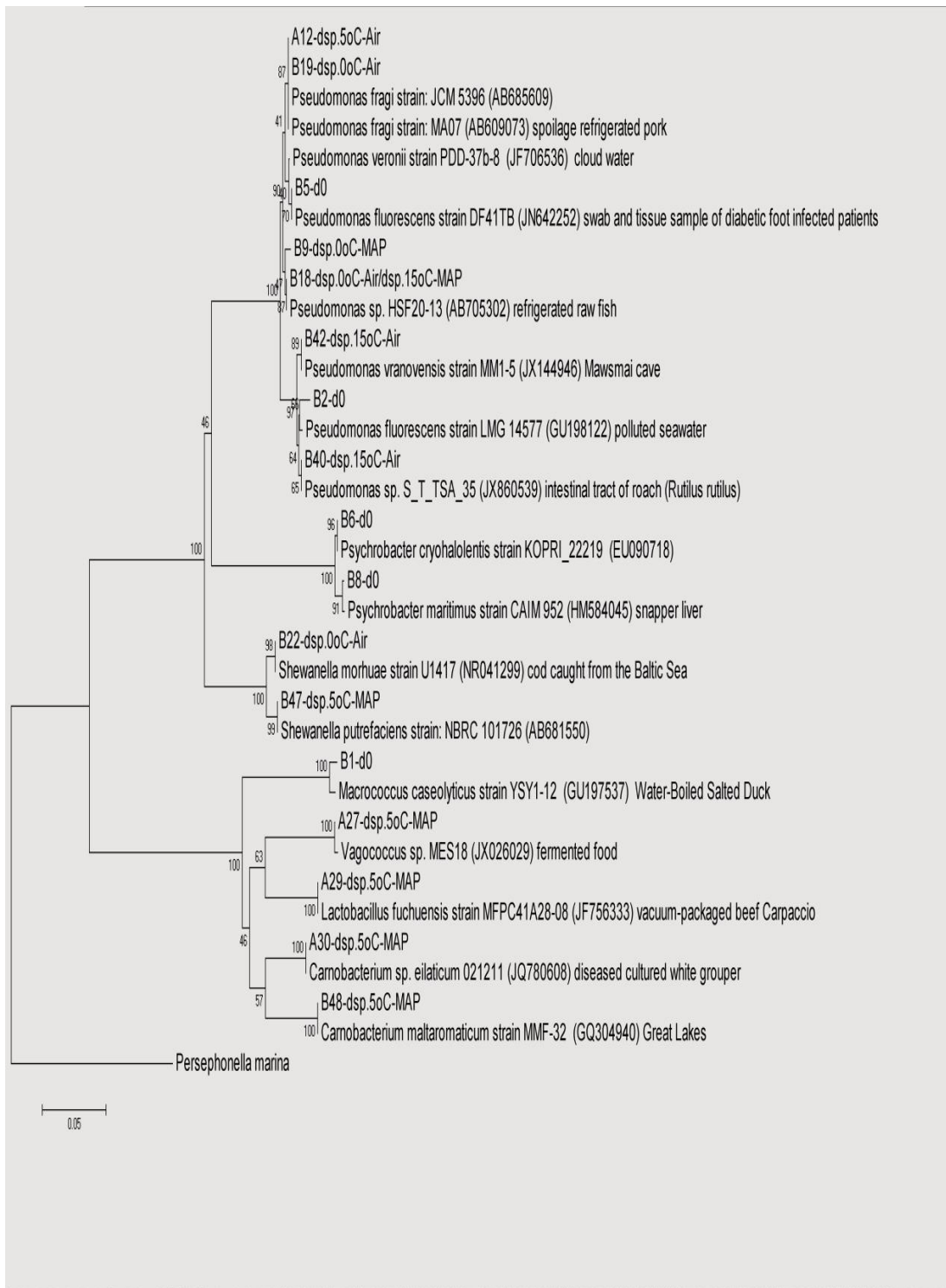
Πίνακας 3.8. Ταυτοποίηση της αλλοιωγόνου μικροβιακής σύνθεσης φιλέτων ιχθύων τσιπούρας στους 15°C με τον έλεγχο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών, τη μέθοδο του συστήματος API και με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA. Α: Αέρας, Μ: MAP

Αριθμός & ποσοστό αποικιών που ταυτοποιήθηκαν με κλασσική & μοριακή (παρένθεση) προσέγγιση						Με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά & API		Με ανάλυση γονιδίου 16S rRNA	
						Κοντινότερος χαρακτηρισμός βακτηρίου		Κοντινότερος χαρακτηρισμένος συγγενής από Blast database (κωδικός GenBank) (ομοιότητα)	
Αριθμός		%		A	M	A	M	A	M
I	10 (2)	7 (2)	59.0	70.0	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas migulae</i> strain P11 (AY972167) (99%)	<i>Pseudomonas migulae</i> strain P11 (AY972167) (99%)	
	II	3 (1)	3 (**)	17.6	30.0	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.ST_TSA35 (JX860539) (99%)	
II	3 (1)		17.6		<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain DF41TB (JN642252) (99%)		
I	1 (1)		5.9		<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Pseudomonas vranovensis</i> strain MM1-5 (JX144946) (99%)		

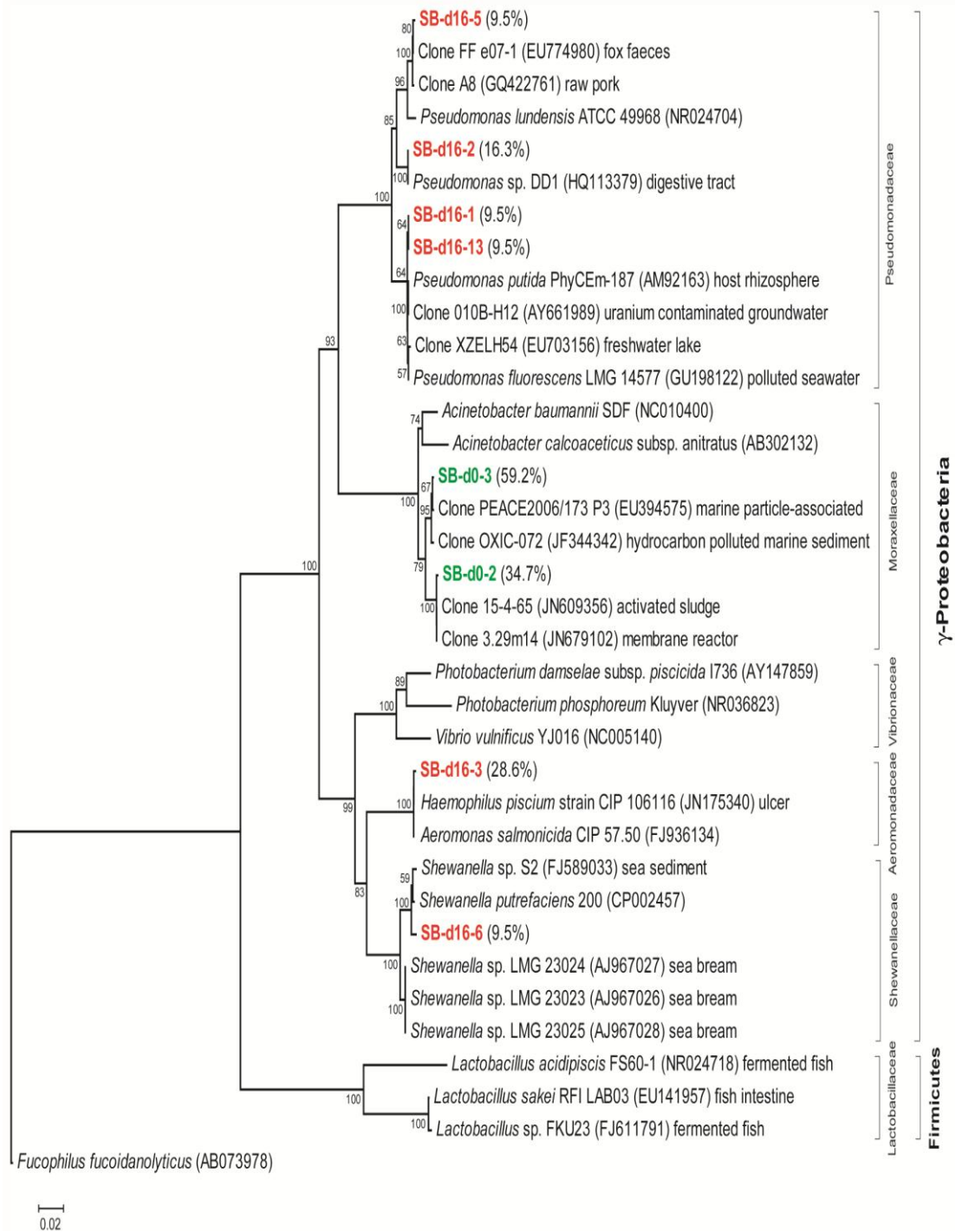
Πίνακας 3.9. Ταυτοποίηση της αρχικής και της αλλοιωγόνου μικροβιακής σύνθεσης ολόκληρων ιχθύων τσιπούρας με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, τη μέθοδο του συστήματος API και την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA.

Αριθμός & ποσοστό αποικιών που ταυτοποιήθηκαν με κλασική & μοριακή (παρένθεση) προσέγγιση		Με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά & API	Με ανάλυση γονιδίου 16S rRNA	
Αριθμός	%	Κοντινότερος χαρακτηρισμένος τύπος βακτηρίου	Κοντινότερος χαρακτηρισμένος συγγενής από Blast database (κωδικός GenBank) (ομοιότητα)	
D0	13 (2)	34,2	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	<i>Pseudomonas fragi</i> strain: JCM 5477 (AB685683)(99%)
	10 (2)	26,3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain M-T-TSA_(JQ795779) (99%)
	11 (2)	28,9	<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i> strain: NBRC 101726 (AB681550) (99%)
	4 (1)	10,5	<i>Flavobacterium damsela</i>	<i>Chryseobacterium shigense</i> 706B-08 (FR872752) (98%)
	7	25,0	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	**
0°C	7 (2)	25,0	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Psychrobacter immobilis</i> strain ATCC 43116 (HQ698589)(99%)
	5 (1)	17,9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> strain HWG-A20 (JQ684243) (100%)
	5	17,9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	**
	4 (1)	14,3	<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Shewanella morhuae</i> strain U1417 (NR041299) (99%)
5°C	10 (1)	55,6	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas vranovensis</i> strain MM1-5 (JX144946) (99%)
	7	38,9	<i>Shewanella putrefaciens</i>	**
	1	5,6	<i>Pseudomonas</i> sp.	**
15°C	12 (2)	50,0	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain M-T-TSA_84 (JQ795779) (99%)
	1 (1)	4,2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fragi</i> strain: JCM 5435 (AB685646) (99%)
	10 (2)	41,7	<i>Moraxella lacunata</i>	<i>Pseudomonas migulae</i> strain P11 (AY972167) (99%)
	1		<i>Shewanella putrefaciens</i>	**

**δεν ταυτοποιήθηκαν



Σχήμα 3.1. Neighbor-joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις αλληλουχίες 16S rRNA που προέκυψαν από τους μικροοργανισμούς οι οποίοι απομονώθηκαν από φιλέτα υπό συνθήκες αέρα και MAP στους 0, 5 και 15°C και των αλληλουχιών των πλησιέστερων χαρακτηρισμένων συγγενών (850 ζ.β.). Το *Persephonella marina* χρησιμοποιήθηκε ως ρίζα. Ο έλεγχος της στατιστικής εγκυρότητας της τοπολογίας του δένδρου έγινε 1000 φορές με τη μέθοδο bootstrap.



Σχήμα 3.2. Neighbor-joining φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις αλληλουχίες 16S rRNA που προέκυψαν απευθείας από τη σάρκα ολόκληρης τσιπούρας στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής και στο χρόνο απόρριψης στον πάγο (0°C) και των αλληλουχιών των πλησιέστερων συγγενών (850 ζ.β.). Το *Fucophilus fucoidanalyticus* έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζα. Ο έλεγχος της στατιστικής εγκυρότητας της τοπολογίας του δένδρου έγινε 1000 φορές με τη μέθοδο bootstrap.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Μικροβιακή αύξηση και μεταβολική δραστηριότητα των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε διάφορες συνθήκες

4.1 Εισαγωγή

Η δράση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεταβολιτών οι οποίοι συνδέονται με την υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των ιχθύων. Οι μικροοργανισμοί αυτοί παράγουν ουσίες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία δυσάρεστων οσμών με συνέπεια την οργανοληπτική απόρριψη των αλιευτικών προϊόντων όταν ο πληθυσμός τους φθάσει σε υψηλά επίπεδα της τάξης των 7-9 log cfu/g (Dalgaard *et al.* 1993, Gram & Huss 1996, Huis in't Veld 1996). Επομένως, η οσμή αποτελεί τον κυριότερο δείκτη αξιολόγησης της φρεσκότητας (Selli *et al.* 2006, Selli & Cayhan 2009). Διάφορες ουσίες με χαρακτηριστική μυρωδιά όπως είναι η τριμεθυλαμίνη (TMA), πτητικές θειούχες ενώσεις, αλδεύδες, κετόνες, εστέρες και άλλες μικρού μοριακού βάρους ουσίες παράγονται κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης των ιχθύων (Gram & Huss 1996). Το TMAO, αμινοξέα που περιέχουν θείο (υπεύθυνα για το σχηματισμό θειούχων ενώσεων και αμμωνίας), υδατάνθρακες, νουκλεοτίδια (π.χ. ινοσίνη) και άλλες μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ενώσεις αποτελούν τις πρόδρομες ουσίες για την παραγωγή των πτητικών ουσιών στα αλιεύματα (Gram & Huss 1996).

Οι κυριότερες χημικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκτίμηση της αλλοιωγόνου δυναμικής των μικροοργανισμών είναι ο προσδιορισμός του TVB-N, του TMA αλλά και των βιογενών αμινών. Όμως, η αδυναμία του ακριβούς προσδιορισμού του σταδίου αλλοίωσης με την εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων έχει οδηγήσει στην αναζήτηση πιο αξιόπιστων μεθόδων. Ο προσδιορισμός των διάφορων πτητικών ουσιών που παράγονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης ενός αλιευτικού

προϊόντος και ευθύνονται για τις διάφορες χαρακτηριστικές οσμές, με σκοπό τη χρήση αυτών ως δείκτες αλλοίωσης αποτελεί τη νέα τάση για μελέτη (Joffraud *et al.* 2001, Jorgensen *et al.* 2001, Chung *et al.* 2002, Duflos *et al.* 2006, Edirisinghe *et al.* 2007, Jonsdottir *et al.* 2008, Soncin *et al.* 2008, Selli & Cayhan 2009, Iglesias *et al.* 2010).

Ο στόχος του κεφαλαίου αυτού είναι η μελέτη της μικροβιακής αύξησης των κύριων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, η παραγωγή μεταβολιτών όπως TVB-N, TMA, βιογενείς αμίνες καθώς και η συσχέτιση με τις οργανοληπτικές μεταβολές και το χρόνο απόρριψης φιλέτων αποθηκευμένων υπό διάφορες συνθήκες συντήρησης. Επίσης, οι πληροφορίες από αυτή την ενότητα αφορούν τη διερεύνηση νέων πιθανών χημικών δεικτών όπως είναι οι πτητικοί μεταβολίτες οι οποίοι, ως γνωστόν, έχουν άμεση σχέση με την οσμή των προϊόντων. Επιπλέον, με τη χρήση μοντέλων υποστρώματων από ζωμό ιχθύος τσιπούρας μελετήθηκε η παραγωγή πτητικών μεταβολιτών, από κάθε κατηγορία αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, με σκοπό να διερευνηθεί η συνεισφορά του καθενός στην εύρεση πιθανών χημικών δεικτών αλλοίωσης.

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1 Γενικός πειραματικός σχεδιασμός

Στο παρόν κεφάλαιο, σε φιλέτα αποθηκευμένα σε τρεις (3) θερμοκρασίες (0, 5 και 15 °C) και δύο (2) ατμόσφαιρες (αέρα και MAP), πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση των πληθυσμιακών μεταβολών των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών καθώς και του προφίλ των παραγόμενων χημικών δεικτών αλλοίωσης όπως TVB-N, TMA, βιογενείς αμίνες και πτητικές ουσίες.

Κατόπιν σε δεύτερο πείραμα πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός των κυριότερων αλλοιωγόνων σε στείρα μοντέλα υποστρώματα με σκοπό την

παρακαλούθηση των πληθυσμιακών μεταβολών καθώς και των παραγόμενων πτητικών μεταβολιτών, ώστε να προσδιοριστούν οι πτητικοί μεταβολίτες που παράγονται από μικροβιολογική δραστηριότητα των συγκεκριμένων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών.

4.2.2. Προέλευση φιλέτων

Φιλέτα τσιπούρας βάρους περίπου 100-120 γρ, συσκευάστηκαν σε δισκάκια από διογκωμένη πολυστερίνη απορροφητικά (SIRAP GEMA) με πλαστικό φιλμ BDF 8050F (SEALED AIR) σε συνθήκες αέρα και μίγματος αερίων (MAP: CO₂: 60%, O₂: 10%, N₂: 30%) από ελληνική βιομηχανία στην Αττική (ΔΙΑΣ). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε ισοθεμικά κιβώτια εντός τεσσάρων ωρών στο εργαστήριο του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο Βόλο όπου αποθηκεύθηκαν στους 0,5 και 15 °C.

4.2.3. Στερεά μοντέλα υποστρώματα από ζωμό ιχθύος τσιπούρας

4.2.3.1. Προετοιμασία μοντέλων υποστρωμάτων

Τα μοντέλα υποστρώματα από ζωμό ιχθύος τσιπούρας (Fish Juice Agar -FJA) προετοιμάστηκαν μετά από τροποποίηση της μεθόδου κατά Dalgaard (1995). Η διαδικασία ήταν η εξής: 250 g ιχθύος τσιπούρας κόβονταν σε πολύ μικρά κομμάτια, προστίθονταν σε 250 ml απιονισμένου νερού και ομογενοποιούνταν για 2 min σε συσκευή τύπου Stomacher (Bug Mixer, Interscience, London, UK). Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν διήθηση του ιχθυο-ζωμού μέσω διάτρητου υφάσματος (τούλι) σε κωνική φιάλη και ακολουθούσε βρασμός για 5 min. Ο ιχθυο-ζωμός αφήνονταν να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολουθούσε φιλτράρισμα με ηθμό Whatman No.1. Έπειτα, προστίθονταν 0.10 M ρυθμιστικού διαλύματος (0.056 M

H₂KPO₄ και 0.044 M HK₂PO₄) και ρύθμιση του pH στο 6.5 με NaOH/HCl. Ακολουθούσε βρασμός στους 100°C για 30 min. Τέλος, προστίθονταν αποστειρωμένο εναιώρημα άγαρ 3.0% στον ιχθυο-ζωμό σε αναλογία 1/1 έτσι ώστε η συγκέντρωση του άγαρ στο τελικό υλικό να είναι 1.5% και κατόπιν το περιεχόμενο μοιράζονταν (ανά 20ml περίπου) σε τρυβλία.

4.2.3.2. Προετοιμασία εμβολίου, ενοφθαλμισμός, συσκευασία και αποθήκευση μονοκαλλιιεργειών σε μοντέλων ιχθύος

Ανανεωμένες καλλιέργειες ταυτοποιημένων μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από ιχθύες τσιπούρας (βλέπε Κεφ. 3) : *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas vranovensis*, *Pseudomonas migulae*), *Shewanella* spp. (*Shewanella putrefaciens*, *Shewanella morhuae*) και οξυγαλακτικά βακτήρια (*Carnobacterium maltaromaticum*, *Lactobacillus fuchuensis*, *Carnobacterium divergens*) χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό των μοντέλων υποστρωμάτων. Ο αρχικός πληθυσμός κάθε εμβολίου ήταν περίπου 5*10³ cfu/g. Οι ενοφθαλμισμοί πραγματοποιήθηκαν σε μονοκαλλιέργειες, θεωρώντας ως μονοκαλλιέργεια την κάθε ομάδα αλλοιωγόνων όπως αναφέρεται παραπάνω. Ακολουθούσε συσκευασία και αποθήκευση των ενοφθαλμισμένων μοντέλων στις ίδιες συνθήκες με τα φιλέτα (αέρας και MAP - CO₂: 60%, O₂: 10%, N₂: 30%) στους 0, 5 και 15°C. Η συσκευασία πραγματοποιήθηκε σε συσκευαστικό τύπου Henkonac 1900 του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

4.2.3. Μικροβιολογική ανάλυση φιλέτων

Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν διπλά δείγματα σάρκας των 25g, από δύο διαφορετικές συσκευασίες (n=2x2=4), μεταφέρονταν ασηπτικά σε αποστειρωμένες σακούλες, προστίθονταν 225 ml Maximum Recovery Diluent (MRD-NACL 0,85% και 0,1% Peptone) και ακολουθούσε ομογενοποίηση για 2 λεπτά σε συσκευή τύπου Stomacher (Bug Mixer, Interscience, London, UK). Οι μικροοργανισμοί που απαριθμήθηκαν ήταν α) Ολικός Μικροβιακός Πληθυσμός καθώς και βακτήρια που παράγουν H₂S β) Enterobacteriaceae, γ) *Pseudomonas* spp., δ) Οξυγαλακτικά και ε) *B. thermosphacta* (βλέπε Κεφ. 2).

4.2.4. Μικροβιακή ανάλυση σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας

Ένα (1) g δείγματος μεταφέρονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες εις τριπλούν (n=3) που περιείχαν 9 ml αποστειρωμένο MRD (Maximum Recovery Diluent, 0.85% NaCl) και ακολουθούσε ανάδευση για 2 min σε συσκευή τύπου vortex. Οι πληθυσμοί όλων των μικροοργανισμών απαριθμήθηκαν μετά από επίστρωση (0.1 ml) σε TSA (Tryptone Soy Agar, LAB M, Lancashire, UK) και επώαση στους 25°C για 48-72 ώρες.

4.2.5. Προσδιορισμός χρόνου απόρριψης

Ο χρόνος απόρριψης προσδιορίστηκε με οργανοληπτική αξιολόγηση όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.

4.2.6. Χημική ανάλυση

4.2.6.1. Προσδιορισμός Ολικού Πτητικού Βασικού Αζώτου (TVB-N)

Ποσότητα 10 g φιλέτου ομογενοποιούνται σε συσκευή τύπου Stomacher με 90 ml διαλύματος τριχλωρο-οξικού οξέος 6% για 2 min και κατόπιν ακολουθούσε διήθηση μέσω ηθμού Whatman No.1 σε ογκομετρική φιάλη 100 ml. Στη συνέχεια, ποσότητα 40 ml εις διπλούν του διηθήματος (n=2) με 6 ml NaOH 20% οδηγούνται σε αποστακτήρα τύπου Kjeldahl για απόσταξη μεθ'υδρατμών, σύμφωνα με προσαρμογή της μεθόδου κατά Vyncke et al. (1987). Η δέσμευση των πτητικών βασικών αζωτούχων ουσιών πραγματοποιούνταν με την προσθήκη 50 ml H₂BO₃ 3% και τέλος ακολουθούσε τιτλοδότηση με 0,01 N HCl. Η διαδικασία πραγματοποιούνταν εις διπλούν (n=2x2=4). Τα υπόλοιπα 10 ml, ανά δοκιμή, χρησιμοποιούνταν για τον προσδιορισμό της τριμεθυλαμίνης.

4.2.6.2. Προσδιορισμός Αζώτου Τριμεθυλαμίνης (TMA-N) φασματοφωτομετρικά

Ποσότητα 1 ml από το υπόλοιπο διήθημα των 10 ml χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της τριμεθυλαμίνης, σύμφωνα με προσαρμογή της μεθόδου κατά Dyer (1945). Στο 1 ml του διηθήματος προστίθονταν 3 ml τουλουόλιο, 200 μl φορμόλης (φορμαλδεΰδη 40%) και 500 μl KOH 90% για την εξουδετέρωση των αζωτούχων ουσιών εκτός της τριμεθυλαμίνης. Ακολουθούσε ανάδευση του περιεχομένου σε vortex για 10 sec και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου (22 °C) για 15 min. Στη συνέχεια, στο 1 ml από το εκχύλισμα με τη δεσμευμένη τριμεθυλαμίνη προστίθονταν 0,5 g NaSO₄ και 3 ml πικρικό οξύ 0,02% σε τουλουόλιο. Ακολουθούσε ανάδευση του περιεχομένου σε vortex για 10 sec και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Η μέτρηση της απορρόφησης πραγματοποιούνταν σε φασματοφωτόμετρο στα 410nm.

Για τον υπολογισμό της τριμεθυλαμίνης στα άγνωστα δείγματα, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη για τα πέντε πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης σε τριμεθυλαμίνη 0, 0,05, 0,10, 0,15 και 0,20 mg TMA /ml TCA 6%.

4.2.6.3. Προσδιορισμός Βιογενών αμίνων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης

Προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων

Τα πρότυπα διαλύματα περιείχαν τα εξής: πουτρεσκίνη (Putrescine dihydrochloride: 182,9 mg), καδαβερίνη (cadaverine dihydrochloride: 171,4 mg), τρυπταμίνη (tryptamine hydrochloride: 122,8 mg), σπερμιδίνη (spermidine trihydrochloride: 175,3 mg), σπερμίνη (spermine tetrahydrochloride: 172,0 mg), ισταμίνη (Histamine dihydrochloride: 165,7 mg) και τυραμίνη (tyramine hydrochloride: 126,7 mg) σε 10 ml νερό HPLC, το καθένα ξεχωριστά. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος κάθε αμίνης ήταν 16 mg mL⁻¹. Ποσότητα 100 μl κάθε διαλύματος χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των βενζολικών παραγώγων (Yen & Hsieh 1991). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης ήταν 0, 0,5, 1,0, 1,5 και 2,0 mg mL⁻¹.

Προετοιμασία δειγμάτων

Δύο (2) g από κάθε φιλέτο προστίθονταν σε 5 ml διαλύτη TCA 6% (w/v). Ακολουθούσε ομογενοποίηση σε συσκευή τύπου Stomacher και φυγοκέντριση του διαλύματος στις 12.000 στροφές (g) για 20 min στους 4°C. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν διήθηση του υπερκειμένου μέσω ηθμού τύπου Whatman No 2. Το διήθημα συλλέγονταν σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml. Σε 100 μl κάθε διηθήματος

προστίθονταν 1 ml sodium hydroxide 2 M και 20 µl benzoyl chloride 2% ώστε να δημιουργηθούν τα βενζολικά παράγωγα (Yen & Hsieh 1991) και ακολουθούσε ανάδευση (vortex) για 1 min. Η αντίδραση λάμβανε μέρος σε θερμοκρασία δωματίου (22 °C) για 40 min. Η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 2 ml κεκορεσμένου άλατος νατρίου. Έπειτα, προστίθονταν 2 ml διαιθυλαιθέρα εις διπλούν και μετά την ανάδευση, συλλέγονταν η πάνω φάση που περιείχε τα βενζολικά παράγωγα και μεταγγίζονταν σε καθαρά ποτήρια ζέσεως των 10 ml. Το περιεχόμενο αφήνονταν να εξατμισθεί κάτω από απαγωγό για δύο ώρες και στη συνέχεια πραγματοποιούνταν επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 1 ml μεθανόλης.

Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης

Η ανάλυση πραγματοποιούνταν σε συσκευή HPLC (PerkinElmer, Inc., USA) η οποία αποτελούνταν από μία αντλία (Model Series 200 LC Pump) και έναν ανιχνευτή UV (Series 200 LC Diode Array detector, PerkinElmer, Inc., USA). Επίσης υπήρχε αυτόματος δειγματολήπτης (Series 200 LC Autosampler). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των ουσιών ήταν η Discovery HSC18 (25cm x 4.6mm, 5µm, SUPELCO, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

Ο διαχωρισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε με πρόγραμμα βαθμιαίας έκλυσης όπου ο ρυθμός ροής των διαλυτών (μεθανόλη – νερό HPLC) ορίστηκε σταθερά στην τιμή των 0,8 ml/min. Η αρχική αναλογία στο μείγμα των διαλυτών ήταν 50:50 (v/v) μεθανόλη/νερό για 0,5 min. Στη συνέχεια, η αναλογία μετατρέπονταν γραμμικά σε 80:20 (v/v) μεθανόλη/ νερό για 3,5 min και παρέμενε σταθερή σε αυτήν για άλλα 4 min. Τέλος, το μείγμα των διαλυτών επέστρεφε στην αρχική του αναλογία

50:50 (v/v) μεθανόλη/νερό για 5 min και παρέμενε σε αυτήν για άλλα 3 min. Η ανάλυση πραγματοποιούνταν συνολικά σε 20 min.

4.2.6.4. Προσδιορισμός Πτητικών ουσιών με αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (GC/MS)

Προετοιμασία δειγμάτων

Στα φιλέτα, σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν διπλά δείγματα σάρκας των 20g, ενώ στα μοντέλα ιχθύος λαμβάνονταν τριπλά δείγματα των πέντε (5) g και τοποθετούνταν σε ειδικούς περιέκτες τύπου falcon μετά από ομογενοποίηση των δύο ή τριών δειγμάτων σε ένα, για τα φιλέτα και τα μοντέλα αντίστοιχα και αποθηκεύονταν στους -20 °C.

Συλλογή πτητικών ουσιών με SPME (Solid Phase MicroExtraction)

Η απομόνωση των πτητικών ουσιών, σε δείγματα που είχαν ληφθεί κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών, πραγματοποιήθηκε με την τεχνική SPME. Στα φιλέτα, 5g από το ομογενοποιημένο δείγμα μεταφέρονταν σε φιαλίδιο όγκου 25 mL με βιδωτό διάτρητο πώμα (septa) και προστίθονταν 5ml NaCl 30%. Το περιεχόμενο αναμιγνυόταν με μαγνητικό αναδευτήρα επί 45 λεπτά στους 40°C. Στα μοντέλα, 2,5 g από το ομογενοποιημένο δείγμα μεταφέρονταν σε ίδιου τύπου φιαλίδιο το οποίο παρέμενε για 15 min στους 40 °C. Κατόπιν, τοποθετούνταν η ίνα (SPME Fiber Assembly, 50/30 um DVB / CarboxenTM / PDMS StableflexTM, for Manual Holder, gray) στον υπερκείμενο του υγρού χώρο για επιπλέον 15 και 30 λεπτά, για τα φιλέτα και τα μοντέλα αντίστοιχα, υπό τις ίδιες συνθήκες ανάδευσης και θερμοκρασίας. Το μήκος της ίνας στον υπερκείμενο χώρο διατηρούνταν σταθερό. Η εκρόφιση των πτητικών από την ίνα

πραγματοποιήθηκε στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου σε θερμοκρασία 250°C, σε λειτουργία splitless.

Συνθήκες ανάλυσης πτητικών

Η ανάλυση των πτητικών ουσιών πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενικής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η συσκευή GC/MS ήταν της εταιρίας *FISONS Instruments* (GC 8000series, Model: 8060, MS: MD-800). Η στήλη διαχωρισμού ήταν CP-Wax 52CB (60m X 0,32mm, DF=0,25μm) της *CHROMPACK*.

Το πρόγραμμα θερμοκρασίας του φούρνου του αέριου χρωματογράφου ήταν το ακόλουθο: 40 °C για 5 min, άνοδος στους 150 °C (4°C /min) και άνοδος στους 250 °C (30°C /min). Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και της πηγής ιόντων ήταν 250 και 200°C, αντίστοιχα. Το φέρον αέριο ήταν Ήλιο με ροή 2 mL/min. Ο τρόπος λειτουργίας του φασματογράφου μάζας ήταν *electron impact*, με την ενέργεια ορισμένη στα 70 eV και εύρος μαζών 29-400 m/z. Η ανάλυση των πτητικών ουσιών πραγματοποιούνταν για 40,833 min.

Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πτητικών ουσιών

Η ταυτοποίηση των πτητικών ουσιών διεξήχθη με τη χρήση της βάσης δεδομένων NIST (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program, data version NIST 05, software version 2.0d). Το λογισμικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Amdis software (version 2.62, <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>). Η ημι-ποσοτικοποίηση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε από το εμβαδόν της κάθε κορυφής. Τα εμβαδά των κορυφών υπολογίστηκαν από το χρωματογράφημα

ολικής σάρωσης (full scan). Τα τερπενικά παράγωγα και οι πολυκυκλικές ενώσεις δεν ελήφθησαν υπόψη, ως παράγωγα της στήλης.

4.3. Αποτελέσματα

4.3.1. Προσδιορισμός χρόνου απόρριψης

Όλα τα προϊόντα την πρώτη ημέρα (d 0) αξιολογήθηκαν οργανοληπτικά ως άριστα. Στους 0 °C, τα φιλέτα υπό αερόβιες συνθήκες και υπό συνθήκες MAP παρέμειναν σε 'άριστη' κατάσταση έως την 4^η και 6^η ημέρα αντίστοιχα, σε κατάσταση 'πολύ καλή' έως την 12^η και 16^η ημέρα και σε κατάσταση 'υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό' έως την 14^η και 18^η ημέρα αντίστοιχα (Σχ. 4.1). Στους 5 °C, τα φιλέτα υπό αερόβιες συνθήκες και υπό συνθήκες MAP παρέμειναν σε 'άριστη' κατάσταση έως την 2^η και 4^η ημέρα αντίστοιχα, σε κατάσταση 'πολύ καλή' έως την 3^η και 5^η ημέρα και σε κατάσταση 'υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό' έως την 5^η και 8^η ημέρα αντίστοιχα (Σχ. 4.2). Στους 15 °C, τα φιλέτα υπό αερόβιες συνθήκες και υπό συνθήκες MAP παρέμειναν σε 'άριστη' κατάσταση για περίπου μισή ημέρα (12 ώρες), σε κατάσταση 'πολύ καλή' έως την 1^η ημέρα και σε κατάσταση 'υποβαθμισμένο αλλά αποδεκτό' έως την 2^η (Σχ. 4.3).

Επομένως, ο χρόνος απόρριψης των προϊόντων, βάσει της οργανοληπτικής αξιολόγησης, ήταν 14, 5, 2 ημέρες για τα φιλέτα που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες και 18, 8, 2 ημέρες για τα φιλέτα σε MAP, στους 0, 5 και 15 °C αντίστοιχα.

4.3.2. Μικροβιακή αύξηση στα φιλέτα τσιπούρας

Οι μεταβολές του πληθυσμού των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών καθώς και οι κινητικές παράμετροι κατά τη διάρκεια συντήρησης των φιλέτων τσιπούρας στους 0, 5

και 15°C υπό αερόβιες συνθήκες και υπό συνθήκες MAP παρουσιάζονται στους Πίνακες 4.1 και 4.2 αντίστοιχα.

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί στην έναρξη του πειράματος ήταν στα επίπεδα των 3,73, 3,23, και 3,03 log cfu/g για τα οξυγαλακτικά βακτήρια, *Pseudomonas* spp. και βακτήρια που παράγουν H₂S, ενώ τα Enterobacteriaceae και *B. thermosphacta* βρίσκονταν σε χαμηλότερους πληθυσμούς 2,59 και <2 log cfu/g αντίστοιχα. Κατά τη συντήρηση των ιχθύων στις δύο ατμόσφαιρες στο πέρας του εμπορικού χρόνου, τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς στους 0 °C (7,69 και 7,21 log cfu/g σε αέρα και MAP αντίστοιχα) και 5 °C (8,39 και 7,31 log cfu/g, σε αέρα και MAP αντίστοιχα). Τα *Pseudomonas* spp. ακολουθούσαν από τα βακτήρια που παράγουν H₂S στους 0 °C (7,25 και 7,08 log cfu/g, σε αέρα και MAP αντίστοιχα) και από τα Enterobacteriaceae στους 5 °C (8,25 και 7,28 log cfu/g, σε αέρα και MAP αντίστοιχα). Στους 15 °C, τα Enterobacteriaceae (8,27 και 8,63 log cfu/g, σε αέρα και TA αντίστοιχα) φάνηκε να συγκυριαρχούν με τα *Pseudomonas* spp. (8,25 log cfu/g) στα φιλέτα υπό συνθήκες αέρα, ενώ ακολουθούσαν από τα *Pseudomonas* spp. (7,54 log cfu/g) στα φιλέτα σε συσκευασία MAP. Τα *B. thermosphacta* και τα οξυγαλακτικά βακτήρια αυξήθηκαν περισσότερο στα φιλέτα σε MAP σε σχέση με τα φιλέτα σε αέρα. Αρχικά, τα *B. thermosphacta* βρίσκονταν κάτω του ορίου ανίχνευσης των 2 logs ενώ παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού τους κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Ο πληθυσμός των *B. thermosphacta* αυξήθηκε 3-4 logs στα φιλέτα σε όλες τις θερμοκρασίες. Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων αυξήθηκε περίπου 1,5-2,0 και 2,0-2,5 logs στα φιλέτα υπό συνθήκες αέρα και MAP αντίστοιχα, σε όλες τις θερμοκρασίες.

Οι καμπύλες προσαρμογής της αύξησης της μικροβιακής σύνθεσης κατά τη διάρκεια της συντήρησης φιλέτων ιχθύος τσιπούρας σε αερόβιες συνθήκες και σε MAP στους 0, 5 και 15°C παρουσιάζονται στα Σχήματα 4.4-4.6.

Ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ_{max}) αυξάνονταν με την αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ η διάρκεια της φάσης προσαρμογής μειώνονταν, η οποία μηδενίζονταν στους 15°C για τα φιλέτα υπό αερόβιες συνθήκες. Στην συσκευασία αέρα, τα βακτήρια που παράγουν H₂S παρουσίασαν τον μεγαλύτερο ειδικό ρυθμό αύξησης στους 0°C, ενώ τα Enterobacteriaceae στους 5 και 15°C (Πίν. 4.1). Στην συσκευασία σε MAP, τα βακτήρια που παράγουν H₂S παρουσίασαν τον μεγαλύτερο ειδικό ρυθμό αύξησης στους 0 και 5°C, ενώ τα Enterobacteriaceae στους 15°C (Πίν. 4.2). Ο ειδικός ρυθμός αύξησης στα φιλέτα υπό αερόβιες συνθήκες ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν στα φιλέτα σε MAP. Στην συσκευασία σε MAP παρατηρήθηκε επιμήκυνση της φάσης προσαρμογής σε σχέση με τα φιλέτα υπό συνθήκες αέρα, σε όλες τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν.

Η πλειονότητα των μικροοργανισμών που αποτελούσαν την τελική μικροβιακή σύνθεση των φιλέτων που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες ήταν τα *Pseudomonas* spp. και τα βακτήρια που παράγουν H₂S στους 0 °C, ενώ τα *Pseudomonas* spp., τα βακτήρια που παράγουν H₂S και τα Enterobacteriaceae επικράτησαν στους 5 και 15 °C. Στην συσκευασία σε MAP, τα *Pseudomonas* spp. και τα βακτήρια που παράγουν H₂S επικράτησαν στους 0 °C, τα *Pseudomonas* spp. και τα Enterobacteriaceae στους 5 °C, ενώ τα *Pseudomonas* spp., τα βακτήρια που παράγουν H₂S και τα Enterobacteriaceae επικράτησαν στους 15 °C. Η αύξηση της θερμοκρασίας φάνηκε να ευνοεί την αύξηση των Enterobacteriaceae στις δύο ατμόσφαιρες, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της μικροβιακής σύνθεσης ανάλογα με τη θερμοκρασία συντήρησης.

Η εφαρμογή του MAP σε σχέση με τη συντήρηση στον αέρα κυρίως στις χαμηλές θερμοκρασίες είχε ως γενικότερο αποτέλεσμα: i) την αύξηση του ρυθμού αύξησης των θετικών κατά Gram βακτηρίων (*B. thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια), ii) τη μείωση του ρυθμού αύξησης των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, iii) την αύξηση του τελικού πληθυσμού των θετικών κατά Gram βακτηρίων και iv) τη μείωση του τελικού πληθυσμού των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.

4.3.3. Μονοκαλλιέργεια μικροοργανισμών σε στερεά μοντέλα υποστρώματα

Στα μη ενοφθαλισμένα στερεά μοντέλα ιχθύος (μάρτυρες), δεν παρατηρήθηκε μικροβιακή αύξηση κατά τη διάρκεια της συντήρησης τεκμηριώνοντας την αποτελεσματικότητα των ασηπτικών τεχνικών. Στα ενοφθαλισμένα μοντέλα, τα *Pseudomonas* spp. έφτασαν σε υψηλότερα επίπεδα πληθυσμού σε σχέση με τα *Shewanella* spp. και τα οξυγαλακτικά βακτήρια σε όλες τις περιπτώσεις (Σχ. 4.7-4.9), εκτός από την περίπτωση της αποθήκευσης σε συσκευασία MAP στους 0°C (Σχ. 4.7) όπου τα οξυγαλακτικά βακτήρια έφτασαν σε υψηλότερα επίπεδα πληθυσμού.

Σε αερόβιες συνθήκες, τα *Pseudomonas* spp. έφτασαν σε επίπεδα πληθυσμού πάνω από 9 logs περίπου τη 10^η, 5^η και 2^η ημέρα της συντήρησης στους 0, 5 και 15 °C, αντίστοιχα. Σε συνθήκες MAP, στους 0 °C, παρατηρήθηκε μικρότερη αύξηση του πληθυσμού των *Pseudomonas* spp. φθάνοντας στα επίπεδα περίπου των 7 logs την 8^η ημέρα της συντήρησης, όπου και παρέμειναν έως τη λήξη του πειράματος, ενώ στη συσκευασία αέρα έφθασαν σε παρόμοια επίπεδα 2 ημέρες νωρίτερα. Στους 5 °C, ο πληθυσμός τους έφθασε σε επίπεδα μεγαλύτερα των 8 logs την 7^η ημέρα της συντήρησης, όπου και παρέμεινε έως τη λήξη του πειράματος, ενώ στη συσκευασία αέρα έφθασαν σε παρόμοια επίπεδα 2 ημέρες νωρίτερα. Στους 15 °C, η ανάπτυξή του

ήταν παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε στη συσκευασία αέρα στην ίδια θερμοκρασία.

Οι πληθυσμοί των *Shewanella* spp. αυξήθηκαν πιο αργά στη συσκευασία MAP σε σχέση με την ανάπτυξή τους στη συσκευασία αέρα. Στη συσκευασία αέρα, οι πληθυσμοί τους έφθασαν σε επίπεδα μεγαλύτερα των 7 logs την 12^η ημέρα της συντήρησης, ενώ στη συσκευασία MAP έφθασαν σε παρόμοια επίπεδα τη 18^η ημέρα της συντήρησης στους 0 °C. Παρομοίως στους 5 °C, έφθασαν σε επίπεδα περίπου των 8 logs την 6^η και 9^η ημέρα της συντήρησης στη συσκευασία αέρα και MAP, αντίστοιχα. Στους 15 °C, η ανάπτυξή του ήταν παρόμοια στις δύο ατμόσφαιρες.

Τα *Shewanella* spp. παρουσίασαν μικρότερη αύξηση σε σχέση με τα *Pseudomonas* spp. στις χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης στη συσκευασία αέρα, φθάνοντας σε επίπεδα 2 και 1 logs χαμηλότερα σε σχέση με τα *Pseudomonas* spp. στους 0 και 5 °C, αντίστοιχα. Στους 15 °C, παρόλο που οι πληθυσμοί των *Pseudomonas* spp. ήταν αρκετά υψηλότεροι σε σχέση με τους πληθυσμούς των *Shewanella* spp. έως τη 2^η ημέρα της συντήρησης, βρέθηκαν σε παρόμοια επίπεδα μετά τη 2^η ημέρα της συντήρησης. Στη συσκευασία MAP, τα *Shewanella* spp. βρίσκονταν σε χαμηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με τα *Pseudomonas* spp. έως τη 16^η ημέρα της συντήρησης, ενώ μετά τη 16^η ημέρα βρέθηκαν σε παρόμοια επίπεδα στους 0 °C. Στους 5 °C, οι πληθυσμοί των *Shewanella* spp. ήταν 1 log χαμηλότεροι σε σχέση με τους πληθυσμούς των *Pseudomonas* spp.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια βρέθηκαν στα επίπεδα της τάξης των 7- 8 logs την 10^η και 6^η ημέρα συντήρησης στους 0 και 5 °C, αντίστοιχα, στη συσκευασία αέρα, ενώ στο MAP βρέθηκαν σε αυτούς τους πληθυσμούς 2 ημέρες αργότερα σε σχέση με τη συσκευασία αέρα.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια βρέθηκαν σε παρόμοιους πληθυσμούς με τα *Shewanella* spp. κατά όλη τη διάρκεια και μετά την 6^η ημέρα της συντήρησης στους 0 και 5 °C, αντίστοιχα, στη συσκευασία αέρα. Στους 15 °C, παρουσίασαν παρόμοιους πληθυσμούς με τα *Pseudomonas* spp. έως την 1^η ημέρα της συντήρησης, ενώ στη συνέχεια οι πληθυσμοί τους ήταν 1 log χαμηλότεροι σε σχέση με τα *Pseudomonas* spp. Στη συσκευασία MAP, οι πληθυσμοί τους ήταν υψηλότεροι από τους πληθυσμούς των άλλων δύο στους 0 °C. Στους 5°C, βρίσκονταν σε παρόμοια επίπεδα με τους πληθυσμούς των *Pseudomonas* spp. έως την 6^η ημέρα, ενώ οι τελικοί πληθυσμοί τους βρέθηκε να είναι 1 log χαμηλότεροι σε σχέση με των *Pseudomonas* spp.

4.3.4. Χημική ανάλυση

4.3.4.1. Προσδιορισμός του Ολικού Πτητικού Βασικού Αζώτου (TVB-N)

Η ποσότητα του TVB-N στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής των φιλέτων ήταν 15.29 ± 0.31 mg N/100g ιχθύος. Στα φιλέτα υπό αερόβιες συνθήκες παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές TVB-N σε σχέση με τις τιμές στα φιλέτα υπό MAP. Στους 0°C, η ποσότητα του TVB-N ήταν 24.54 ± 0.25 και 16.64 ± 0.21 στο χρόνο απόρριψης των φιλέτων υπό αερόβιες συνθήκες και MAP, αντίστοιχα. Στους 5°C, η ποσότητα του TVB-N ήταν 25.30 ± 0.19 και 19.10 ± 0.50 στο χρόνο απόρριψης των φιλέτων υπό αερόβιες συνθήκες και MAP, αντίστοιχα. Στους 15°C, η ποσότητα του TVB-N αυξάνονταν γρηγορότερα σε σχέση με τις χαμηλές θερμοκρασίες, φθάνοντας τα επίπεδα των 28.02 ± 0.34 και 18.39 ± 0.27 mg N/100g ιχθύος στο χρόνο απόρριψης των φιλέτων υπό συνθήκες αέρα και MAP, αντίστοιχα. Οι τιμές του TVB-N κατά τη διάρκεια της συντήρησης των φιλέτων υπό συνθήκες αέρα και MAP στους 0, 5 και 15 °C παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3.

4.3.4.2. Προσδιορισμός της τριμεθυλαμίνης

Το TMA-N ανιχνεύθηκε στα φιλέτα αέρα και MAP σε όλες τις θερμοκρασίες. Στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής το TMA-N ήταν $0,72\pm 0,07$ mg Kg⁻¹. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης παρουσίασε μικρή αύξηση, φθάνοντας τα επίπεδα των $1,03\pm 0,06$, $1,12\pm 0,04$, $1,12\pm 0,03$ και $0,88\pm 0,02$, $0,75\pm 0,09$, $0,80\pm 0,02$ mg Kg⁻¹ στα φιλέτα υπό συνθήκες αέρα και MAP στους 0 °C, 5 °C και 15 °C αντίστοιχα, στο χρόνο απόρριψης. Οι τιμές του TMA-N κατά τη διάρκεια της συντήρησης των φιλέτων υπό τις διάφορες συνθήκες αποθήκευσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4.

4.3.4.3. Βιογενείς αμίνες

Οι καμπύλες αναφοράς για τα πρότυπα διαλύματα των 7 αμινών που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.5. Οι εξισώσεις που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των βιογενών αμινών στα φιλέτα.

Η πουτρεσκίνη και η τρυπταμίνη ανιχνεύθηκαν μόνο στα φιλέτα υπό συνθήκες αέρα, ενώ η τυραμίνη μόνο στα φιλέτα σε MAP. Η καδαβερίνη και η σπερμίνη ανιχνεύθηκαν και στις δύο ατμόσφαιρες (Πίν. 4.6 & 4.7). Η ισταμίνη δεν ανιχνεύθηκε.

Στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής των φιλέτων ανιχνεύθηκαν η καδαβερίνη και η σπερμίνη σε ποσότητες $0,790\pm 0,003$ και $0,450\pm 0,003$ mg/100g ιχθύος αντίστοιχα. Στα φιλέτα υπό αερόβιες συνθήκες, στους 0°C, ανιχνεύθηκαν η καδαβερίνη και η σπερμίνη. Η καδαβερίνη παρουσίασε αύξηση φθάνοντας την τιμή $0,807\pm 0,005$ mg/100g ιχθύος στο χρόνο απόρριψης, ενώ η σπερμίνη παρουσίασε αυξομειώσεις κατά τη διάρκεια της συντήρησης φθάνοντας την τιμή $0,584\pm 0,002$ mg/100g ιχθύος στο χρόνο απόρριψης. Στους 5°C, ανιχνεύθηκαν η καδαβερίνη, η τρυπταμίνη και η σπερμίνη. Οι τρεις αμίνες παρουσίασαν αύξηση κατά τη διάρκεια της συντήρησης φθάνοντας τις τιμές $0,801\pm 0,001$, $0,928\pm 0,004$ και $0,500\pm 0,003$ mg/100g

ιχθύος αντίστοιχα, στο χρόνο απόρριψης των φιλέτων. Στους 15°C, ανιχνεύθηκαν η πουτρεσκίνη, η καδαβερίνη, η τρυπταμίνη και η σπερμίνη. Οι τέσσερις αμίνες παρουσίασαν αύξηση κατά τη διάρκεια της συντήρησης φθάνοντας τις τιμές 1,238±0,013, 0,912±0,002, 0,870±0,009 και 0,519±0,005 mg/100g ιχθύος αντίστοιχα, στο χρόνο απόρριψης των φιλέτων. Η σπερμιδίνη και η τυραμίνη δεν ανιχνεύθηκαν (Πίν. 4.6).

Στα φιλέτα υπό συνθήκες MAP, στους 0°C, ανιχνεύθηκαν η καδαβερίνη, η σπερμιδίνη και η σπερμίνη σε ποσότητες 0,819±0,003, 0,453±0,001 και 0,624±0,005 mg/100g ιχθύος αντίστοιχα, στο χρόνο απόρριψης των φιλέτων. Η καδαβερίνη και η σπερμιδίνη παρέμεναν σχεδόν σταθερές κατά τη διάρκεια της συντήρησης και παρουσίασαν αύξηση μόνο στο χρόνο απόρριψης των φιλέτων. Η σπερμίνη παρουσίασε αύξηση κατά όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Στους 5°C, ανιχνεύθηκαν η καδαβερίνη, η σπερμίνη και η τυραμίνη σε ποσότητες 0,788±0,003, 0,960±0,029 και 0,381±0,006 mg/100g ιχθύος αντίστοιχα, στο χρόνο απόρριψης των φιλέτων. Οι τρεις αμίνες αυξάνονταν κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Στους 15°C, ανιχνεύθηκαν οι ίδιες τρεις αμίνες σε ποσότητες 0,842±0,003, 0,724±0,027 και 0,385±0,003 mg/100g ιχθύος αντίστοιχα, στο χρόνο απόρριψης των φιλέτων. Η πουτρεσκίνη και η τρυπταμίνη δεν ανιχνεύθηκαν (Πίν. 4.7).

4.3.4.4. Παραγωγή πτητικών ουσιών

Πτητικές ουσίες που παράγονται στα φιλέτα ιχθύος τσιπούρας

Οι πτητικές ουσίες που παράγονται κατά τη διάρκεια συντήρησης των φιλέτων υπό συνθήκες αέρα και MAP στους 0, 5 και 15°C, παρουσιάζονται στους Πίνακες 4.8 και 4.9 αντίστοιχα. Στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής των φιλέτων ανιχνεύθηκαν

24 ουσίες (Πίν. 4.8). Κατά τη διάρκεια της συντήρησης, συνολικά 14 ουσίες (3-Methyl-1-butanal, 1-octen-3-ol, cis-6-Nonenal, Ethyl isobutyrate, Ethyl crotonate, Ethyl 2-methylbutyrate, Ethyl isovalerate, Ethyl acetate, 1-Penten-3-ol, 6-methyl-5-hepten-2-one, cis-4-Heptenal, Acetic acid, 2-Methyl-1-butanal, Hexanal) βρέθηκε να αυξάνονται. Πιο συγκεκριμένα, η 3-Methyl-1-butanal, 6-methyl-5-hepten-2-one, 1-octen-3-ol και η cis-6-Nonenal παρουσίασαν αύξηση στα φιλέτα αέρα στους 0°C και η Ethyl acetate, 3-Methyl-1-butanal, Ethyl isobutyrate, Ethyl-2-methylbutyrate, Ethyl isovalerate, 1-octen-3-ol και cis-6-Nonenal παρουσίασαν αύξηση στα φιλέτα αέρα στους 15°C (Πίν. 4.8). Στα φιλέτα σε συνθήκες MAP, οι ουσίες που παρουσίασαν αύξηση ήταν η 1-Penten-3-ol, cis-4-Heptenal και 1-octen-3-ol στους 0°C, η acetic acid, 3-Methyl-1-butanal, 2-Methyl-1-butanal και 1-octen-3-ol στους 5°C και η Hexanal, cis-4-Heptenal και 1-octen-3-ol στους 15°C (Πίν. 4.9). Επομένως, η 3-Methyl-1-butanal και η 1-octen-3-ol αποτέλεσαν τις ουσίες που αυξήθηκαν και στις δύο ατμόσφαιρες, ενώ η cis-6-Nonenal, Ethyl isobutyrate, Ethyl 2-methylbutyrate, Ethyl isovalerate και Ethyl acetate αποτέλεσαν τις ουσίες που αυξήθηκαν σε συνθήκες υπό αέρα και η 1-Penten-3-ol, cis-4-Heptenal, Acetic acid, 2-Methyl-1-butanal αποτέλεσαν τις ουσίες που αυξήθηκαν σε συνθήκες υπό MAP.

Επιπλέον, ορισμένες ουσίες βρέθηκε είτε να μειώνονται ή να εξαφανίζονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Ανάμεσα σε αυτές, δύο ουσίες, η Hexenal και η Nonanal, μειώνονταν κατά τη διάρκεια συντήρησης των φιλέτων υπό αερόβιες συνθήκες στους 0°C, η Hexenal και n-Eicosane στους 15°C, ενώ η 2-Penten-1-ol, Amyl alcohol, Hexenal, trans-2-hexenal, 1-Hexanol, Heptanal, 1-octen-3-ol, trans-trans 2,4-heptadienal και 1-decanol εξαφανίζονταν κατά τη διάρκεια συντήρησης των φιλέτων υπό αερόβιες συνθήκες στους 5°C (Πίν. 4.8). Στα φιλέτα σε συνθήκες MAP, οι ουσίες

που παρουσίασαν μείωση ήταν η Hexenal και trans-2-octenal, ενώ η n-Eicosane εξαφανίσθηκε κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 5°C (Πίν. 4.9).

Επιπλέον, διάφορες ουσίες οι οποίες δεν ανιχνεύθηκαν καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης, εμφανίσθηκαν στο χρόνο απόρριψης. Στα φιλέτα υπό αερόβιες συνθήκες, η 2-Methyl-1-butanal, 3-pentanone, Ethyl crotonate, Ethyl 2-methylbutyrate, Ethyl isovalerate, Ethyl tiglate και 2-Heptanone εμφανίσθηκαν στο χρόνο απόρριψης (Ημέρα 14) στους 0°C, ενώ η 3-Methyl-1-butanal, 2-Methyl-1-butanal, 3-pentanone, Isoamyl alcohol, Ethyl isobutyrate, Ethyl crotonate, Ethyl 2-methylbutyrate, Ethyl isovalerate, cis-6-Nonenal, 2-methyl-1-butanol και n-Nonane εμφανίσθηκαν στο χρόνο απόρριψης (Ημέρα 5) στους 5°C. Στα φιλέτα υπό συνθήκες MAP, η Heptyl alcohol, 1-decanol και Lauryl alcohol εμφανίσθηκαν στο χρόνο απόρριψης (Ημέρα 18) στους 0°C, ενώ η 3-Methyl-1-butanal, 2-Methyl-1-butanal, Amyl alcohol, 2-Penten-1-ol, 1-Hexanol, trans-2-octenal, n-decanal, 1-decanol και n-Hexadecane εμφανίσθηκαν στο χρόνο απόρριψης (Ημέρα 8) στους 5°C. Στους 15 °C, στο χρόνο απόρριψης (Ημέρα 2) για τις δύο ατμόσφαιρες, ανιχνεύθηκαν αρκετές ουσίες οι οποίες δεν ανιχνεύθηκαν στην αρχή του χρόνου ζωής και την πρώτη ημέρα της συντήρησης (Πίν. 4.8 & 4.9).

Πτητικές ουσίες που παράγονται σε μοντέλα ιχθύος

Οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν στα μοντέλα ιχθύος τσιπούρας παρουσίασαν ποικίλες μεταβολές (αύξηση, μείωση, αυξομείωση, εμφάνιση και εξαφάνιση ουσιών) κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Οι ουσίες που παρήχθησαν στους μάρτυρες και στις μονοκαλλιέργειες των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών παρουσιάζονται στους πίνακες 4.10-4.13.

Λαμβάνοντας υπόψη τις ουσίες που παρήχθησαν στα ενοφθαλμισμένα μοντέλα (Πίν. 4.11-4.13) σε σχέση με τα μοντέλα μάρτυρες (Πίν. 4.10) προσδιορίστηκε ποιες από αυτές φαίνεται να είναι μικροβιακοί μεταβολίτες και από ποιους μικροοργανισμούς παράγονται. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη τα μοντέλα μάρτυρες προσδιορίστηκαν πτητικές ουσίες που παρήχθησαν από μηχανισμούς διαφορετικούς της μικροβιακής δραστηριότητας.

Οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν στα μοντέλα μόνο λόγω της παρουσίας των *Pseudomonas* spp. (εννοώντας ότι αφαιρούνται οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν στα μοντέλα μάρτυρες) ήταν η 2-butenic acid, 2-Undecanone, Hexanoic acid ethyl ester, Ethyl octanoate, Ethyl-2-methylbutyrate, Ethyl tiglate, 2-Nonanol, cis-4-decenal, 2-Nonanone και Ethyl isovalerate (Πίν. 4.11). Από αυτές, ορισμένες ουσίες βρέθηκε να παράγονται αποκλειστικά στα μοντέλα που είχαν εμβολιασθεί με *Pseudomonas* spp. (2-butenic acid, Hexanoic acid ethyl ester, Ethyl-2-methylbutyrate, Ethyl tiglate και Ethyl isovalerate). Η Ethyl isovalerate και η Ethyl tiglate παρουσίασαν αύξηση στους 0 και 15 °C, ενώ η Ethyl-2-methylbutyrate παρουσίασε αύξηση στους 15°C, στα μοντέλα που αποθηκεύθηκαν σε αερόβιες συνθήκες. Η Ethyl-2-methylbutyrate και η Ethyl isovalerate παρουσίασαν αύξηση και στα φιλέτα κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 5 και 15°C σε αερόβιες συνθήκες.

Οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν στα μοντέλα μόνο λόγω της παρουσίας των *Shewanella* spp. ήταν η 2-butenic acid, 2-Undecanone, 2-Nonanone, Ethyl oleate, Ethyl octanoate, Lauryl alcohol, 2-Nonanol και cis-4-decenal (Πίν. 4.12). Η Ethyl oleate βρέθηκε να παράγεται αποκλειστικά στα μοντέλα που είχαν εμβολιασθεί με *Shewanella* spp.

Οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν στα μοντέλα μόνο λόγω της παρουσίας των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν η Isoamyl acetate, Linanol, Lauryl alcohol, Nonanoic acid, n-butyl-2-methylbutyrate, 2-methyl-1-butanal, 3-methyl-1-butanal, 3-hydroxy-1-butanone, Isoamyl alcohol και 2-ethyl-1-hexanol, ενώ από αυτές η Isoamyl acetate, Linanol, Nonanoic acid, n-butyl-2-methylbutyrate, 2-methyl-1-butanal, 3-methyl-1-butanal και 3-hydroxy-1-butanone, παρήχθησαν αποκλειστικά από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η 2-methyl-1-butanal και 3-methyl-1-butanal παρουσίασαν αύξηση στους 0°C, η 3-hydroxy-1-butanone παρουσίασε αύξηση στους 5 °C, ενώ η Isoamyl acetate, 2-methyl-1-butanal, Linanol, Nonanoic acid και η 3-hydroxy-1-butanone παρουσίασαν αύξηση στους 15°C στα μοντέλα που αποθηκεύθηκαν σε αερόβιες συνθήκες. Η 3-methyl-1-butanal παρουσίασε αύξηση και στα φιλέτα κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 0 και 15°C σε αερόβιες συνθήκες. Στα μοντέλα που αποθηκεύθηκαν σε MAP, η 2-methyl-1-butanal παρουσίασε αύξηση στους 0°C, ενώ η 3-hydroxy-1-butanone παρουσίασε αύξηση σε όλες τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν.

Ουσίες που βρέθηκαν στους μάρτυρες αλλά δεν ανιχνεύθηκαν σε καμιά περίπτωση ενοφθαλισμένου μοντέλου με μικροοργανισμούς (δηλαδή ουσίες αποκλειστικά από μηχανισμούς διαφορετικούς της μικροβιακής δραστηριότητας) ήταν η 4-methyl-2-pentanone, n-nonane, 1-butoxy-2-propanol και η Cis-6-nonen-1-ol.

Πληθώρα ουσιών ανιχνεύθηκαν στους μάρτυρες και φυσικά στα μοντέλα ενοφθαλισμένα με μικροοργανισμούς. Η Isoamyl alcohol και 2-ethyl-1-hexanol ανιχνεύθηκαν σε αρκετά υψηλότερες ποσότητες στα μοντέλα που είχαν εμβολιασθεί με οξυγαλακτικά βακτήρια μόνο σε σχέση με τους μάρτυρες (Πίν. 4.13), υπονοώντας ότι είναι 2 ουσίες οι οποίες παράγονται και από μεταβολική δραστηριότητα κυρίως από τα οξυγαλακτικά. Η Isoamyl alcohol παρουσίασε αύξηση στους 0°C σε συνθήκες MAP,

ενώ η 2-ethyl-1-hexanol παρουσίασε μεγάλη αύξηση, σε σχέση με τα υπόλοιπα μοντέλα, σε όλες τις θερμοκρασίες και στις δύο ατμόσφαιρες.

Μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με τα επίπεδα πληθυσμών των μικροοργανισμών

Οι μεταβολές των πτητικών μεταβολιτών μικροβιακής δραστηριότητας (εννοώντας ότι αφαιρούνται οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν στα μοντέλα μάρτυρες), οι οποίοι αυξάνονταν κατά τη διάρκεια της συντήρησης, καθώς και η σχέση τους με τους πληθυσμούς της OMX για τα φιλέτα και με τους πληθυσμούς των *Pseudomonas* spp., *Shewanella* spp. και των οξυγαλακτικών βακτηρίων για τα μοντέλα παρουσιάζονται στα διαγράμματα 4.13-4.24.

Στα φιλέτα υπό αερόβιες συνθήκες, στους 0°C, η 3-Methyl-1-butanal παρουσίασε αύξηση από την 4^η ημέρα της συντήρησης όπου ο πληθυσμός της OMX ήταν 4,80 log cfu/g, ενώ η cis-6-Nonenal παρουσίασαν αύξηση από την 12^η ημέρα όπου ο πληθυσμός της OMX ήταν 8,11 log cfu/g (Σχ. 4.13). Στους 15°C, η Ethyl acetate, 3-Methyl-1-butanal, Ethyl isobutyrate, Ethyl-2-methylbutyrate, Ethyl isovalerate και cis-6-Nonenal παρουσίασαν αύξηση μετά την 1^η ημέρα της συντήρησης όπου ο πληθυσμός της OMX ήταν 7,24 log cfu/g (Σχ. 4.15).

Στα φιλέτα σε συνθήκες MAP, στους 0°C, η cis-4-Heptenal παρουσίασε αύξηση από την 4^η ημέρα της συντήρησης όπου ο πληθυσμός της OMX ήταν 4,52 log cfu/g (Σχ. 4.13). Στους 5°C, το acetic acid παρουσίασε αύξηση από την αρχή της αποθήκευσης των φιλέτων σε MAP όπου ο πληθυσμός της OMX ήταν χαμηλός (3,23 log cfu/g). Η 3-Methyl-1-butanal και η 2-Methyl-1-butanal παρουσίασαν αύξηση από την 8^η ημέρα της συντήρησης όπου ο πληθυσμός της OMX ήταν 7,82 log cfu/g (Σχ. 4.11). Στους 15°C, η

cis-4-Heptenal παρουσίασε αύξηση από την αρχή της συντήρησης, ενώ η Hexanal μετά την 1^η ημέρα όπου ο πληθυσμός της OMX είχε φθάσει 7,03 log cfu/g (Σχ. 4.15).

Στα μοντέλα υποστρώματα ενοφθαλμισμένα με *Pseudomonas* spp. υπό αερόβιες συνθήκες στους 0 °C, η 2-ethyl-1-hexanol παρουσίασε αύξηση από την αρχή του χρόνου συντήρησης όπου ο πληθυσμός ήταν 3,96 log cfu/g, ενώ η Isoamyl alcohol, Ethyl isovalerate και η Ethyl tiglate παρουσίασαν αύξηση από την 8^η ημέρα της συντήρησης όπου ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp ήταν 8,36 log cfu/g (Σχ. 4.16). Στους 15 °C, η 2-pentanone παρουσίασε αύξηση από την αρχή της συντήρησης, ενώ η Ethyl-2-methylbutyrate, Ethyl isovalerate, Ethyl tiglate, 2-heptanone, 2-ethyl-1-hexanol και linanol μετά την 1^η ημέρα της συντήρησης όπου ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. ήταν 8,02 log cfu/g. Τέλος η 2-undecanone παρουσίασε αύξηση από την 2^η ημέρα όπου ο πληθυσμός ήταν 9,11 log cfu/g (Σχ. 4.18). Στα μοντέλα ενοφθαλμισμένα με *Pseudomonas* spp. αποθηκευμένα σε MAP στους 0 °C, η 1-hexanol παρατηρήθηκε να αυξάνει από την αρχή της συντήρησης, ενώ η 1-dodecene από την 16^η ημέρα όπου ο πληθυσμός τους ήταν 7,61 log cfu/g (Σχ. 4.16). Στους 5 °C, η hexanal και 1-hexanol παρουσίασαν αύξηση από την αρχή της συντήρησης, ενώ η trans-2-octenal, n-dodecane παρουσίασαν αύξηση από την 4^η ημέρα της συντήρησης όπου ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. ήταν 6,66 log cfu/g (Σχ. 4.17). Στους 15 °C, η Isoamyl alcohol, 1-dodecene και η 2-undecanone παρουσίασαν αύξηση μετά την 1^η ημέρα της συντήρησης όπου ο πληθυσμός τους ήταν 7,56 log cfu/g (Σχ. 4.18).

Από τις ουσίες που ανιχνεύθηκαν στα μοντέλα ενοφθαλμισμένα με *Shewanella* spp. αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες στους 0 °C, η n-tetracosane παρατηρήθηκε να αυξάνει από την 8^η ημέρα της συντήρησης όπου ο πληθυσμός των βακτηρίων αυτών ήταν 6,77 log cfu/g (Σχ. 4.19). Στους 5 °C, η hexenal, 1-hexanol, 2-ethyl-1-hexanol

αυξήθηκαν από την αρχή του χρόνου συντήρησης όπου ο πληθυσμός τους ήταν 3,34 log cfu/g, ενώ η 1-dodecene παρουσίασε αύξηση από την 4^η ημέρα όπου ο πληθυσμός τους ήταν 6,62 log cfu/g (Σχ. 4.20). Στους 15 °C, η 2-pentanone αυξήθηκε από την αρχή της συντήρησης, ενώ η Isoamyl alcohol, 2-heptanone, 2-nonanone, 2-nonanol, 2-undecanone και η n-octadecane μετά την 1^η ημέρα όπου ο πληθυσμός τους ήταν 5,46 log cfu/g (Σχ. 4.21). Στα μοντέλα σε MAP στους 5 °C, η heptanal αυξήθηκε από την αρχή της συντήρησης, ενώ η 1-dodecene από την 4^η ημέρα όπου ο πληθυσμός τους ήταν 5,01 log cfu/g (Σχ. 4.20).

Από τις ουσίες που ανιχνεύθηκαν στα μοντέλα με τα οξυγαλακτικά υπό αερόβιες συνθήκες στους 0 °C, η 2-ethyl-1-hexanol αυξήθηκε από την αρχή του χρόνου συντήρησης, η 3-methyl-1-butanal από την 4^η ημέρα, ενώ η 3-hydroxy-1-butanone, Isoamyl alcohol, 2-methyl-1-butanal από την 8^η ημέρα. Οι πληθυσμοί των βακτηρίων αυτών ήταν 3,63, 4,93 και 7,11 log cfu/g, αρχικά, την 4^η και 8 η ημέρα, αντίστοιχα (Σχ. 4.22). Στους 5 °C, η 2-ethyl-1-hexanol και η trans-2-octenal παρατηρήθηκε να αυξάνουν από την αρχή της συντήρησης, ενώ η 3-hydroxy-1-butanone, 1-hexanol από την 4^η ημέρα όπου ο πληθυσμός των μικροοργανισμών αυτών ήταν 7,79 log cfu/g (Σχ. 4.23). Στους 15 °C, η 2-ethyl-1-hexanol και η trans-2-octenal παρουσίασαν αύξηση από την αρχή της συντήρησης, ενώ η 2-methyl-1-butanal, 3-hydroxy-1-butanone, 1-hexanol, Isoamyl alcohol, nonanoic acid, linanol, nonanol, Lauryl alcohol μετά την 1^η ημέρα της συντήρησης όπου ο πληθυσμός των μικροοργανισμών ήταν 7,56 log cfu/g (Σχ. 4.24). Στα μοντέλα με τα οξυγαλακτικά σε MAP στους 0 °C, η 2-ethyl-1-hexanol βρέθηκε να αυξάνει από την αρχή της συντήρησης, ενώ η 3-hydroxy-1-butanone, Isoamyl alcohol, trans-2-octenal, 2-methyl-1-butanal από την 8^η ημέρα όπου ο πληθυσμός των βακτηρίων ήταν 6,52 log cfu/g (Σχ. 4.22). Στους 5 °C, η 2-ethyl-1-hexanol και η trans-2-

octenal παρουσίασαν αύξηση από την αρχή της συντήρησης, ενώ η 3-hydroxy-1-butanone, 1-hexanol, n-hexadecane από την 4^η ημέρα όπου ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών ήταν 7,03 log cfu/g (Σχ. 4.23). Στους 15 °C, η n-hexadecane βρέθηκε να αυξάνει από την αρχή της συντήρησης, η 2-methyl-1-butanal, 2-ethyl-1-hexanol, 3-hydroxy-1-butanone, 1-hexanol και η isoamyl alcohol μετά την 1^η ημέρα όπου τα οξυγαλακτικά βρίσκονταν στα επίπεδα των 7,81 log cfu/g, ενώ η linanol παρουσίασε αύξηση την 2^η ημέρα της συντήρησης όπου τα βακτήρια αυτά ξεπέρασαν τους 8 log (8,14 log cfu/g) (Σχ. 4.24).

4.4. Συζήτηση

Είναι κοινά αποδεκτό από τη βιβλιογραφία αλλά και από την παρούσα διατριβή, ότι οι μικροοργανισμοί *Pseudomonas* spp. και τα υδροθειούχα βακτήρια (κυρίως *S. putrefaciens*) αποτελούν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς στους ιχθύες που συντηρούνται σε αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες, με τα *Pseudomonas* spp. να αποτελούν τους ΕΑΜ στην τσιπούρα (Alvarez et al., 2008; Koutsoumanis et al. 1999, Koutsoumanis & Nychas 2000, Tryfinopoulou et al. 2002 Tryfinopoulou et al. 2007). Πράγματι, τα *Pseudomonas* spp. είναι οι μικροοργανισμοί που φθάνουν στους υψηλότερους πληθυσμούς από περίπου τα μέσα του χρόνου συντήρησης και επικρατούν μέχρι το χρόνο απόρριψης, ενώ τα υδροθειούχα βακτήρια αποτελούν τους επόμενους πιο επικρατέστερους μικροοργανισμούς στους 0°C και 5°C (Koutsoumanis & Nychas 2000) ή άλλοι μικροοργανισμοί όπως τα Enterobacteriaceae επικρατούν σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Επιπλέον, οι ουσίες που δίνουν τις χαρακτηριστικές οσμές στην τσιπούρα που αποθηκεύεται αερόβια, είναι αμμωνιακής φύσης, κυρίως προϊόντα μεταβολισμού των *Pseudomonas* spp. (Dainty 1996). Πράγματι, το TVB-N αυξάνεται από τα μέσα της διάρκειας της συντήρησης αλλά τις

περισσότερες φορές δεν φθάνει πάνω από τα 30-35 mg N/100g σάρκας (Kyraia *et al.* 1997, Koutsoumanis & Nychas 2000, Kyraia & Lougonois 2002, Goulas & Kontominas 2007), όπου είναι και το Νομοθετικό όριο ((EC) No 2074/2005). Τα υδροθειούχα βακτήρια ενώ αποτελούν τους ΕΑΜ για τους ιχθύες που προέρχονται από τις βόρειες θάλασσες και αποθηκεύονται στους 0°C (Gram *et al.* 1987), είναι οι δεύτεροι πιο επικρατέστεροι μικροοργανισμοί στα αλιεύματα που προέρχονται από τη Μεσόγειο (Koutsoumanis & Nychas 1999, Koutsoumanis & Nychas 2000, Tryfinopoulou *et al.* 2007), ενώ αποτελούνται κυρίως από *Shewanella* spp. και στους ιχθύες των βόρειων θαλασσών (Gram *et al.* 1987, Jorgensen & Huss 1989, Dalgaard *et al.* 1993, Dalgaard 1995) αλλά και στα μεσογειακά αλιεύματα όπως η τσιπούρα (Tryfinopoulou *et al.* 2007). Ο κύριος χημικός δείκτης αλλοίωσης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τα αλιεύματα που αλλοιώνονται από *Shewanella* είναι η ΤΜΑ η οποία στην περίπτωσή μας δεν έφθασε σε σημαντικά επίπεδα. Η αδυναμία των *Shewanella* να επικρατήσουν στα μεσογειακά αλιεύματα και να παράγουν ικανή ποσότητα ΤΜΑ έχει σχολιαστεί στην βιβλιογραφία, με επικρατέστερη άποψη αυτή που υποστηρίζει ότι οι ιχθύες της Μεσογείου δεν διαθέτουν ΤΜΑΟ, το οποίο είναι η πρόδρομη ουσία για την παραγωγή του ΤΜΑ (Koutsoumanis *et al.* 1999, Koutsoumanis & Nychas 1999,2000). Οι Kyraia & Lougonois (2002) αναφέρουν ότι όταν η τιμή του ΤΜΑΟ στο λαβράκι είναι περίπου 22 και 12,5 mg N ανά 100 g ιχθύος την πρώτη ημέρα και την 22^η ημέρα της συντήρησης αντίστοιχα, στον πάγο, η τιμή του ΤΜΑ είναι 0,20 και 1,25 mg N ανά 100 g ιχθύος, αντίστοιχα.

Οι υπόλοιποι αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια, *B. thermosphacta* και τα Enterobacteriaceae τα οποία δεν ευνοούνται τόσο όσο τα *Pseudomonas* και τα *Shewanella* στους 0°C, αλλά σε υψηλότερες θερμοκρασίες ψύξης

όπως οι 5°C, είναι δυνατό να συνεισφέρουν περισσότερο στην αλλοίωση φθάνοντας σε υψηλότερους πληθυσμούς ακόμη και από τα *Shewanella*. Σε περιπτώσεις σημαντικής διατάραξης στην ψυκτική αλυσίδα αυτοί οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται ακόμη ταχύτερα και φθάνουν σε υψηλότερους πληθυσμούς. Πράγματι, τα Enterobacteriaceae αποτέλεσαν την κυρίαρχη ομάδα μικροοργανισμών στους 15 °C. Η κυριαρχία των μικροοργανισμών κατά την αλλοίωση είναι στενά συνδεδεμένη με τις μεταβολές της θερμοκρασίας. Στους ιχθύες της Β. Ευρώπης για παράδειγμα, το *Shewanella* αποτελεί τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό στους 0°C, ενώ τα Enterobacteriaceae και τα Vibrionaceae αποτελούν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς με την αύξηση της θερμοκρασίας στους 20°C (Gram *et al.* 1987,1992).

Το *B. thermosphacta* παρουσίασε μεγάλη αύξηση κατά τη διάρκεια συντήρησης, ιδιαίτερα σε συνθήκες MAP. Ο μικροοργανισμός αυτός μπορεί να παρουσιάσει μεγάλη αύξηση σε οικοσυστήματα τα οποία είναι εμπλουτισμένα με CO₂ και χαμηλό O₂ κυρίως σε χαμηλές θερμοκρασίες (Drosinos & Nychas 1996, Koutsoumanis *et al.* 2000). Σε ιχθύες που προέρχονται από ελληνικά ύδατα, τα *B. thermosphacta* και τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αναφερθεί ως ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε MAP και αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες (Drosinos & Nychas 1996 Drosinos *et al.* 1997 Koutsoumanis & Nychas, 1999, Taoukis *et al.* 1999a,b, Koutsoumanis *et al.* 2000). Στην παρούσα διατριβή, τα οξυγαλακτικά βακτήρια απαριθμήθηκαν σχετικά σε χαμηλούς πληθυσμούς (περίπου 6-6,5 log cfu/g) σε συνθήκες MAP, παρόλο που η αύξηση της συγκέντρωσης του CO₂, κατά Koutsoumanis *et al.* (2000), ευνοεί την ανάπτυξή τους. Οι Koutsoumanis *et al.* (2000) παρατήρησαν να προκύπτει συγκυριαρχία μεταξύ των *B. thermosphacta* και *S. putrefaciens* και αναχαίτιση της αύξησης του *Pseudomonas* spp., στο μπαρμπούνι

(*Mullus barbatus*) σε συνθήκες MAP με 50 και 80% CO₂ σε χαμηλές θερμοκρασίες (4°C). Παρομοίως, οι Drosinos & Nychas (1996) αναφέρουν παρόμοια μεταβολή στη μικροβιακή σύνθεση τσιπούρας σε συνθήκες MAP στους 0 °C. Η διαφορετική σύσταση αερίων στη συσκευασία MAP που χρησιμοποιήθηκε στην δική μας περίπτωση καθώς και οι συνθήκες υπό τις οποίες προετοιμάστηκε, συσκευάστηκε και αποθηκεύθηκε το προϊόν της παρούσας διατριβής, φαίνεται να οδήγησε στην επιλογή διαφορετικών μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα η κυρίαρχη μικροβιακή σύνθεση τουλάχιστων σε επίπεδο πληθυσμών, των φιλέτων τσιπούρας σε συνθήκες MAP στους 0 και 5 °C, να είναι διαφορετική σε σχέση με τους παραπάνω ερευνητές. Κατά τη συντήρηση, όπως είναι γνωστό, η αρχική μικροβιακή σύνθεση μεταβάλλεται, εξαρτώμενη κυρίως από τις επικρατούσες συνθήκες της αποθήκευσης όπως είναι η θερμοκρασία, η ατμόσφαιρα, κ.ά. (Dalgaard 2003), με αποτέλεσμα οι μικροοργανισμοί οι οποίοι επικρατούν στο προϊόν στο τέλος της συντήρησης να είναι διαφορετικοί υπό διαφορετικές συνθήκες (Leisner & Gram 1999). Οι Pournis *et al.* (2006), οι οποίοι χρησιμοποίησαν την ίδια σύσταση αερίων με της παρούσας διατριβής, αναφέρουν ότι τα *Pseudomonas* spp. και τα βακτήρια που παράγουν H₂S (κυρίως *S. putrefaciens*) αποτέλεσαν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς σε κοτσομούρα (*Mullus surmuletus*) που αποθηκεύθηκε στους 4°C. Επιπλέον, τα *B. thermosphacta* (περίπου 5 log cfu/g) και τα οξυγαλακτικά βακτήρια (περίπου 4,5 log cfu/g) αποτέλεσαν χαμηλούς πληθυσμούς της τελικής μικροβιακής σύνθεσης στην κοτσομούρα σε ατμόσφαιρα αέρα και MAP στους 4°C. Παρόλο που τα *Pseudomonas* spp. παρουσιάζουν γενικά χαμηλότερη ανθεκτικότητα στο CO₂ σε σχέση με τα *B. thermosphacta*, *S. putrefaciens* και οξυγαλακτικά βακτήρια (Gill & Mollin 1991), αποτέλεσαν τον κυρίαρχο μικροοργανισμό στους 0 και 5°C σε συνθήκες MAP. Ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. στο χρόνο απόρριψης των φιλέτων σε MAP στις

θερμοκρασίες ψύξης ήταν χαμηλότερος σε σχέση με τον πληθυσμό που απαριθμήθηκε σε αερόβιες συνθήκες. Η επιβράδυνση της αύξησης του *Pseudomonas* spp. φαίνεται να οφείλεται στην προαναφερθείσα χαμηλή ανθεκτικότητά του στο CO₂ (Gill & Mollin 1991), αλλά η επικράτησή του ως κυρίαρχος φαίνεται να οφείλεται στα υψηλά ποσά οξυγόνου (10%) (Pournis *et al.* 2005) που χρησιμοποιήθηκαν στη συσκευασία MAP της παρούσας διατριβής.

Ένας εναλλακτικός τρόπος προσδιορισμού της μικροβιακής αλλοίωσης είναι η εκτίμηση της αλλοιωγόνου δράσης των μικροοργανισμών μέσω του προσδιορισμού της μεταβολικής τους δραστηριότητας και περαιτέρω η χρήση του μεταβολίτη ή ομάδας μεταβολιτών ως χημικού δείκτη αλλοίωσης. Το TVB-N (Olafsdottir *et al.* 1997), TMA-N (Malle *et al.* 1989), και διάφοροι άλλοι πτητικοί μεταβολίτες μικροβιακής δραστηριότητας (Joffraud *et al.* 2001, Jorgensen *et al.* 2001, Duflos *et al.* 2006, Jonsdottir *et al.* 2008, Soncin *et al.* 2008) και οι βιογενείς αμίνες (Mietz & Karmas 1977, Fernandez-Salguero & Mackie 1987) έχουν προταθεί ως χημικοί δείκτες αλλοίωσης στους ιχθύες.

Η μέτρηση του TVB-N περιλαμβάνει ουσίες όπως είναι το TMA-N, η διμεθυλαμίνη, η αμμωνία και διάφορες άλλες πτητικές αζωτούχες ενώσεις που έχουν παραχθεί εξαιτίας της βακτηριακής αποικοδόμησης των πρωτεϊνών και των αμινοξέων (Gram & Huss 1996, Olafsdottir *et al.* 1997). Οι Goulas & Kontominas (2007) αναφέρουν ότι η τιμή του TVB-N στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής των φιλέτων τσιπούρας ήταν 15,9 mg N/100 g. Οι Koutsoumanis & Nychas (2000) αναφέρουν τιμές χαμηλότερες από αυτές που αναφέρουν οι παραπάνω ερευνητές. Η τιμή του TVB-N την ημέρα 0 (15,29±0,31 mg N/100 g) που προέκυψε στην παρούσα διατριβή ήταν λίγο χαμηλότερη από αυτή που αναφέρουν οι Goulas & Kontominas (2007). Κατά Etienne

(2005), η ποσότητα του TVB-N στους φρέσκους ιχθύες κυμαίνεται κυρίως μεταξύ 10-15 mg/100g ιχθύος με εξαίρεση τα πελαγικά ψάρια, μεταξύ 16-18 mg/100g στις σαρδέλες (El Marrakchi *et al.* 1990), 18-20 mg/100g στο σκουμπρί (Malle *et al.* 1983) και περίπου 30 mg/100 g στον μακρύπτερο τόνο (Pérez-Villarreal & Pozo 1990). Ωστόσο, διάφοροι παράγοντες όπως είναι η ηλικία του ιχθύος, η τοποθεσία και ο τρόπος σύλληψης επηρεάζουν την παραγωγή των χημικών αυτών ουσιών (Morishita *et al.* 1989). Κατά Connell (1995), η περιεκτικότητα του TVB-N σε φρέσκους ιχθύες μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 5 και 20 mg/100g ιχθύος. Στο χρόνο απόρριψης της τσιπούρας, οι Goulas & Kontominas (2007) αναφέρουν τιμές TVB-N 35 mg/100g ιχθύος (τιμή που έχει ορισθεί ως ανώτατο όριο από την (EC) No 2074/2005) μετά από 15-16 ημέρες συντήρησης των φιλέτων σε αερόβιες συνθήκες στους 4°C. Στην παρούσα διατριβή, στα φιλέτα υπό αερόβιες συνθήκες, σε όλες τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν, τη στιγμή της οργανοληπτικής απόρριψης, τα ποσά του TVB-N δεν ξεπέρασαν τα 26 mg/100g ιχθύος. Παρόμοιες τιμές TVB-N αναφέρουν οι Koutsoumanis & Nychas (2000) για ιχθύες τσιπούρας που συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15 °C. Η αύξηση του TVB-N εξαρτάται από τη δράση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών κυρίως όμως στο χρόνο απόρριψης (Koutsoumanis & Nychas 2000). Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με την παραγωγή πτητικών αζωτούχων ενώσεων από τη δράση των *Pseudomonas* spp., *S. putrefaciens* και Enterobacteriaceae όταν αποτελούν την κυρίαρχη αλλοιωγόνο μικροβιακή σύνθεση (Gram *et al.* 1987, Edwards *et al.* 1987, Dainty *et al.* 1989, Gram & Huss 1996 Leisner & Gram 1999, Koutsoumanis & Nychas 2000). Στην παρούσα διατριβή, οι μικροοργανισμοί αυτοί αποτελούσαν την κυρίαρχη αλλοιωγόνο μικροβιακή σύνθεση στα φιλέτα υπό συνθήκες αέρα και στις τρεις θερμοκρασίες. Στα

φιλέτα σε MAP, όπου ο ρυθμός αύξησης των μικροοργανισμών αυτών ήταν χαμηλότερος σε σχέση με τον αέρα, το TVB-N αυξήθηκε πιο αργά. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού των *B. thermosphacta* και οξυγαλακτικών βακτηρίων σε MAP, τα οποία παράγουν οργανικά οξέα (Nychas & Arkoudelos 1991 Drosinos & Board 1995, Drosinos & Nychas 1997). Η αύξηση που παρατηρείται κατά τις πρώτες ημέρες της αποθήκευσης οφείλεται κυρίως στην παραγωγή αμινών εξαιτίας του φαινομένου της αυτόλυσης (Huss 1995). Κατά Oehlerschläger (1992, 1997a,b), η ανάλυση του TVB-N αντικατοπτρίζει μόνο τα στάδια της προχωρημένης αλλοίωσης των ιχθύων και δεν θεωρείται αξιόπιστη ουσία για την αξιολόγηση της φρεσκάδας των ψαριών στο αρχικό στάδιο της αποθήκευσης. Η παραπάνω διαπίστωση υποστηρίζεται και από άλλους ερευνητές, όπως οι Castro et al. (2006) οι οποίοι αναφέρουν ότι δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στις τιμές του TVB-N πριν την απόρριψη λαβρακιού στον πάγο.

Οι βιογενείς αμίνες έχουν προταθεί ως δείκτες για τον προσδιορισμό της ποιότητας των ιχθύων (Fernandez-Salguero & Mackie 1987, Koutsoumanis et al. 1999). Η παραγωγή των βιογενών αμινών οφείλεται στην ικανότητα των μικροοργανισμών να αποκαρβοξυλιώνουν τα αμινοξέα (Gale 1946). Η кадаβερίνη και η πουτρεσκίνη χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της μικροβιακής αλλοίωσης στους ιχθύες (Mietz & Karmas 1977, Fernandez-Salguero & Mackie 1987, Koutsoumanis et al. 1999). Οι Koutsoumanis et al. (1999) αναφέρουν ότι τα επίπεδα της кадаβερίνης και της πουτρεσκίνης αυξήθηκαν σε ιχθύες τσιπούρας κατά τη συντήρησή τους σε θερμοκρασία 0, 8 και 15°C, όταν τα *Pseudomonas* spp. και τα βακτήρια που παράγουν H₂S αποτελούσαν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς στη μικροβιακή σύνθεση. Η παραγωγή кадаβερίνης στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε στα φιλέτα ιχθύος σε

όλες τις συνθήκες συντήρησης όπου τα *Pseudomonas* spp. αποτελούσαν σημαντικό μέρος στην κυρίαρχη μικροβιακή σύνθεση. Η παραγωγή πουτρεσκίνης, παρατηρήθηκε στα φιλέτα ιχθύος σε αερόβιες συνθήκες στους 15 °C, όπου τα Enterobacteriaceae και τα *Pseudomonas* spp. αποτελούσαν την κυρίαρχη μικροβιακή σύνθεση. Η παραγωγή πουτρεσκίνης έχει συνδεθεί στο παρελθόν με την παρουσία των Enterobacteriaceae, όταν αυτά αποτελούσαν πολύ σημαντικό ποσοστό (>90%) της μικροβιακής σύνθεσης σε “ready to eat” λαχανικά (Halasz *et al.* 1994). Έχουν αναφερθεί διακυμάνσεις των ουσιών αυτών σε διαφορετικά είδη ιχθύων. Οι Mietz & Karmas (1978) αναφέρουν ότι οι τιμές της καδαβερίνης κυμαίνονταν από 1,16 – 10,36 ppm (0,116-1,036 mg/100g) σε υψηλής ποιότητας ιχθύες όπως το πετρόψαρο (rockfish), τα φιλέτα σολομού (salmon steaks) και οι γαρίδες (shrimp), ενώ τα επίπεδα της πουτρεσκίνης κυμαίνονταν από 1,36 – 6,30 ppm (0,136-0,630 mg/100g) σε υψηλής ποιότητας ιχθύες όπως οι ουρές αστακού (lobster tails), τα φιλέτα σολομού και οι γαρίδες. Οι ίδιοι ερευνητές, σε άλλη μελέτη (Mietz & Karmas 1977) αναφέρουν ότι τα επίπεδα της καδαβερίνης κυμαίνονταν από 0.24 - 5.32 ppm (0,024-0,532 mg/100g), ενώ τα επίπεδα πουτρεσκίνης από 0 - 1.84 ppm (0-0,184 mg/100g) σε υψηλής ποιότητας τόνο. Στην παρούσα μελέτη, οι ποσότητες της καδαβερίνης δεν ξεπέρασαν την τιμή των 0,91 mg/100g σε συνθήκες αέρα και των 0,84 mg/100g σε MAP, σε καλής ποιότητας φιλέτα τσιπούρας. Οι τιμές αυξάνονταν περαιτέρω στο αλλοιωμένο προϊόν. Οι Koutsoumanis *et al.* (1999) αναφέρουν ότι η πουτρεσκίνη και η καδαβερίνη βρέθηκαν στα επίπεδα των 0,34 και 0,39 mg/100g, αντίστοιχα, στους 0°C, 0,24 και 0,35 mg/100g, αντίστοιχα, στους 8°C, ενώ 0,42 και 3,42 mg/100g, αντίστοιχα, στους 15°C, σε καλής ποιότητας ιχθύες τσιπούρας. Επιπλέον, η τυραμίνη δεν ανιχνεύθηκε σε αερόβιες συνθήκες, ενώ ανιχνεύθηκε στα φιλέτα σε MAP στους 5 και 15°C όταν ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων

ήταν περίπου 6 log cfu/g. Οι Edwards *et al.* (1987) αναφέρουν ότι η τυραμίνη παράγεται από τα *Lactobacilli* (*L. divergens* και *L. carnis*). Η τυραμίνη απαντάται σε καλής ποιότητας τρόφιμα σε επίπεδα από 10–80 mg/100g (Ten Brink *et al.* 1990). Επιπρόσθετα, η σπερμίνη αυξήθηκε σχεδόν σε όλες τις συνθήκες συντήρησης. Αντίθετα, μείωση της ουσίας αυτής έχει αναφερθεί στο παρελθόν κατά τη διάρκεια συντήρησης χοιρινού κρέατος σε διάφορες θερμοκρασίες (Halasz *et al.* 1994). Παρομοίως, οι Koutsoumanis *et al.* (1999) αναφέρουν μείωση της σπερμίνης στην τσιπούρα στους 15°C, ενώ αυξομειώσεις παρατηρήθηκαν στους 0 και 8°C.

Η παραγωγή της πουτρεσκίνης, της τρυπταμίνης και της τυραμίνης επηρεάστηκε από τις συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία και ατμόσφαιρα) των ιχθύων, αφού η καθεμία ανιχνεύθηκε σε συγκεκριμένες συνθήκες. Η καδαβερίνη, η σπερμίνη και η πουτρεσκίνη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ποιότητας των ιχθύων τσιπούρας, ενώ η τυραμίνη θα μπορούσε να μελετηθεί περαιτέρω ώστε να διαπιστωθεί εάν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ποιότητας των ιχθύων μεσογειακής προέλευσης.

Το TMA-N χρησιμοποιείται ως δείκτης για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης. Έχουν παρατηρηθεί μεγάλες διακυμάνσεις της τιμής της τριμεθυλαμίνης ανάλογα με το είδος του ιχθύος, την εποχή της αλιείας του, τον πληθυσμό των μικροοργανισμών που παράγουν TMA, τις συνθήκες αποθήκευσης και συντήρησής του καθώς και το στάδιο της αλλοίωσής του (Debevere & Boskou 1996, Sivertsvik *et al.* 2002). Σε ιχθύες τσιπούρας που έχουν αλιευθεί από ελληνικά ύδατα, η τιμή του TMA-N είναι χαμηλή (Drosinos & Nychas 1996, Drosinos *et al.* 1997, Koutsoumanis & Nychas 1999, 2000). Οι Drosinos & Nychas (1997) αναφέρουν ότι δεν παράχθηκε TMA κατά τη διάρκεια συντήρησης φιλέτων τσιπούρας σε MAP στους 0±1°C. Χαμηλές συγκεντρώσεις του

TMA-N έχουν αναφερθεί σε διάφορα άλλα είδη ιχθύων, όπως στην τιλάπια, στο τέλος της συντήρησης σε χαμηλές θερμοκρασίες (Reddy *et al.* 1994, 1996). Έχουν αναφερθεί διαφορετικές τιμές TMA – N ως αποδεκτά όρια για το ίδιο είδος ιχθύος. Τα όρια που έχουν αναφερθεί για ιχθύες τσιπούρας είναι: 1 mg N/100 g (Kyra *et al.* 1997), 5–10 mg N/100 g (Ozogul *et al.* 2004), 2–3 mg N/100 g (Goulas & Kontominas, 2007), 2.0–8.87 mg N/100 g (Chouliara *et al.* 2004). Στην παρούσα διατριβή, η παραγωγή του TMA-N στα φιλέτα δεν ξεπέρασε το 1 mg N/100 g και 0,74 mg N/100 g ιχθύος στο χρόνο απόρριψης σε αερόβιες συνθήκες και MAP, αντίστοιχα. Η μικρή συγκέντρωση της τριμεθυλαμίνης στα φιλέτα ιχθύος τσιπούρας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ουσία αυτή δεν είναι σημαντική για χρήση ως χημικός δείκτης στους ιχθύες της Μεσογείου.

Η χρήση του TVB-N στα μεσογειακά αλιεύματα και των άλλων αζωτούχων μεταβολιτών (TMA, βιογενείς αμίνες κτλ) στα αλιεύματα άλλης προέλευσης ή είδους από την τσιπούρα, ενώ αποτελούν έναν καλό δείκτη για την αποδοχή ή όχι αυτών των προϊόντων, ωστόσο δεν επαρκούν για να χαρακτηρίσουν την ‘φρεσκότητα’ του προϊόντος και να βοηθήσουν στην αξιολόγησή της. Αυτό κυρίως οφείλεται στο γεγονός ότι οι τιμές τους δεν μεταβάλλονται κατά το πρώτο ήμισυ ή ακόμη και τα 2/3 του εμπορικού χρόνου ζωής, με αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο ως δείκτες απόρριψης και όχι φρεσκότητας. Είναι λοιπόν προφανές ότι για τον γρήγορο προσδιορισμό της φρεσκότητας θα πρέπει να ανατρέξουμε στη μελέτη άλλων μικροβιακών μεταβολιτών. Αρκετή έρευνα έχει πραγματοποιηθεί στην παραγωγή οργανικών οξέων αλλά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να θεωρηθούν ικανοποιητικά μόνο στις περιπτώσεις συντήρησης σε MAP, όπου επικρατούν μικροοργανισμοί με μεταβολισμό προς παραγωγή οξέων, όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Drosinos &

Nychas 1996, Drosinos *et al.* 1997, Koutsoumanis & Nychas 1999, Taoukis *et al.* 1999a, Taoukis *et al.* 1999b, Koutsoumanis *et al.* 2000).

Οι πτητικές ουσίες έχουν αρχίσει να μελετούνται για να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης διότι μεταβάλλονται σημαντικά μεταξύ της ημέρας 0 και της ημέρας απόρριψης κατά τη διάρκεια συντήρησης των αλιευμάτων (Joffraud *et al.* 2001 Jorgensen *et al.* 2001 Chung *et al.* 2002 Duflos *et al.* 2006 Edirisinghe *et al.* 2007 Soncin *et al.* 2008 Selli & Cayhan 2009 Iglesias *et al.* 2010). Πράγματι, στην παρούσα διατριβή, καθ'όλη τη διάρκεια της συντήρησης, η 3-Methyl-1-butanal, 1-octen-3-ol και cis-6-Nonenal παρουσίασαν αύξηση στα φιλέτα αέρα στους 0°C, η Ethyl isobutyrate, Ethyl 2-methylbutyrate, Ethyl isovalerate παρουσίασαν αύξηση στα φιλέτα αέρα στους 5°C και η Ethyl acetate, 3-Methyl-1-butanal, Ethyl isobutyrate, Ethyl-2-methylbutyrate, Ethyl isovalerate, 1-octen-3-ol και cis-6-Nonenal παρουσίασαν αύξηση στα φιλέτα αέρα στους 15°C. Στα φιλέτα σε συνθήκες MAP, η 1-Penten-3-ol, cis-4-Heptenal και 1-octen-3-ol παρουσίασαν αύξηση στους 0°C, η acetic acid, 3-Methyl-1-butanal, 2-Methyl-1-butanal και η 1-octen-3-ol στους 5°C και η Hexanal, cis-4-Heptenal και 1-octen-3-ol στους 15°C. Από όλες τις παραπάνω ουσίες, άλλες ουσίες όπως είναι η 1-Penten-3-ol, 2-Methyl-1-butanal, 3-Methyl-1-butanal, Ethyl acetate και το acetic acid έχουν αναφερθεί ως προϊόντα μικροβιακής δραστηριότητας (Joffraud *et al.* 2001, Jorgensen *et al.* 2001, Duflos *et al.* 2006, Jonsdottir *et al.* 2008, Soncin *et al.* 2008), ενώ άλλες όπως είναι η Hexanal, η cis-4-heptenal και η 1-octen-3-ol έχουν αναφερθεί ως προϊόντα χημικής δραστηριότητας (Duflos *et al.* 2006). Η Hexanal παράγεται εξαιτίας ενός ενζυματικού μηχανισμού (Josephson *et al.* 1984). Η 1-octen-3-ol παράγεται εξαιτίας της οξείδωσης των n-6 Πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Η χημική

δραστηριότητα αποτελεί τη δεύτερη πιο σημαντική αιτία που επιδρά στην ποιότητα των ιχθύων.

Η παρουσία της 1-Penten-3-ol έχει αναφερθεί σε μοντέλα ιχθύος ενοφθαλμισμένα με *Pseudomonas perolens* (Miller *et al.* 1973). Παρόλα αυτά, στην παρούσα διατριβή δεν παρατηρήθηκε αύξηση της ουσίας αυτής στα μοντέλα με *Pseudomonas* spp. σε σχέση με τους μάρτυρες, πράγμα που δείχνει ότι η ύπαρξή της δεν οφείλεται σε μικροβιακή δράση αλλά σε άλλο μηχανισμό.

Η παραγωγή του acetic acid οφείλεται στη δράση του *B. thermosphacta* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Edwards *et al.* 1987, Dainty *et al.* 1989). Πράγματι, στην παρούσα διατριβή, παρατηρήθηκε αύξηση του acetic acid στα φιλέτα που συντηρήθηκαν σε MAP στους 5°C, όπου οι πληθυσμοί των *B. thermosphacta* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν υψηλότεροι σε σχέση με την συσκευασία σε αέρα.

Η παραγωγή αλκοολών, αλδευδών και κετονών, κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης των ιχθύων, οφείλεται κυρίως σε μικροβιακή δράση (Josephson *et al.* 1983, Gram & Huss 1996, Jorgensen *et al.* 2001). Οι αζωτούχες αλδεύδες, κετόνες, εστέρες και τα σουλφίδια συνδέονται με τη δράση των *Pseudomonas* spp. (Edwards *et al.* 1987, Dainty *et al.* 1989). Στην παρούσα διατριβή, οι εστέρες όπως ο 2-butenoic acid ethyl ester, Hexanoic acid ethyl ester, Ethyl-2-methylbutyrate, Ethyl tiglate και Ethyl isovalerate ανιχνεύθηκαν αποκλειστικά στα μοντέλα με *Pseudomonas* spp. Η Ethyl-2-methylbutyrate και η Ethyl isovalerate παρουσίασαν αύξηση κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό τις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και ατμόσφαιρας στα μοντέλα υποστρώματα και στα φιλέτα. Οι ουσίες αυτές α) δεν ανιχνεύθηκαν στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής, β) αυξάνονταν κατά τη διάρκεια της συντήρησης, γ) παράγονταν στα μοντέλα με *Pseudomonas* spp., δ) τα *Pseudomonas* spp. αποτελούσαν

σημαντικό μέρος της κυρίαρχης αλλοιωγόνου μικροβιακής σύνθεσης (σε συγκυριαρχία με τα Enterobacteriaceae) στα φιλέτα και στ) αυξάνονταν ενώ παράλληλα παρατηρούνταν υποβάθμιση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φιλέτων και αύξηση του πληθυσμού των *Pseudomonas* spp. στα μοντέλα. Κατά Fields *et al.* (1986), μία ουσία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ποιότητας όταν ισχύουν οι παραπάνω προϋποθέσεις. Επομένως, η Ethyl-2-methylbutyrate και η Ethyl isovalerate θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως χημικοί δείκτες αλλοίωσης μικροβιακής προέλευσης για τους ιχθύες της Μεσογείου.

Η 3-hydroxy-1-butanone έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως μικροβιακός μεταβολίτης. Οι Borch & Molin (1989) αναφέρουν ότι η ουσία αυτή προέρχεται κυρίως από τα *C. maltaromaticum* και από τα *C. divergens*. Πράγματι, στην παρούσα μελέτη, η 3-hydroxy-1-butanone ανιχνεύθηκε αποκλειστικά στα μοντέλα με οξυγαλακτικά βακτήρια (*C. maltaromaticum*, *L. fuchuensis*, *C. divergens*) σε όλες τις θερμοκρασίες στις δύο ατμόσφαιρες. Οι Jonsdottir *et al.* (2008) αναφέρουν ότι τα υψηλά επίπεδα της ουσίας αυτής σε καπνιστό σολομό παρουσιάζονται όταν τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό. Η ουσία αυτή παρουσίασε αύξηση κατά τη διάρκεια συντήρησης των μοντέλων αυτών με εξαίρεση τα μοντέλα που αποθηκεύθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 0°C. Στα μοντέλα με οξυγαλακτικά βακτήρια που αποθηκεύθηκαν σε MAP, η 3-hydroxy-1-butanone παρουσίασε αύξηση σε όλες τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν. Η ουσία αυτή α) δεν ανιχνεύθηκε στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής, β) αυξάνονταν κατά τη διάρκεια της συντήρησης και γ) παράγονταν στα μοντέλα με οξυγαλακτικά βακτήρια. Παρομοίως, οι παραπάνω προϋποθέσεις ισχύουν για την Ethyl tiglate η οποία παρουσίασε αύξηση στους 0 και 15°C στα μοντέλα με *Pseudomonas* spp. που αποθηκεύθηκαν σε αερόβιες συνθήκες.

Επομένως, εάν οι ίδιες προϋποθέσεις για την 3-hydroxy-1-butanone και την Ethyl tiglate προσδιορισθεί ότι ισχύουν και σε φιλέτα τσιπούρας ή/και σε άλλα αλιευτικά προϊόντα (εννοώντας ότι δεν ανιχνευθούν στην αρχή του εμπορικού χρόνου ζωής, να αυξάνονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης, να αυξάνονται ενώ παράλληλα παρατηρείται υποβάθμιση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά), σε παρόμοιες συνθήκες αποθήκευσης με τα μοντέλα της παρούσας διατριβής, σε μελλοντικές μελέτες, ενώ ταυτόχρονα είναι γνωστός ο κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός (οξυγαλακτικά βακτήρια ή *Pseudomonas* spp., αντίστοιχα), θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χημικοί δείκτες αλλοίωσης μικροβιακής προέλευσης των ιχθύων.

Η 3-methyl-1-butanal παρουσίασε αύξηση στα μοντέλα που είχαν εμβολιασθεί με οξυγαλακτικά βακτήρια στους 0 °C και στα φιλέτα σε αερόβιες συνθήκες στους 0, 5 και 15 °C. Επιπλέον, η 2-methyl-1-butanal παρουσίασε αύξηση στα μοντέλα που είχαν εμβολιασθεί με οξυγαλακτικά βακτήρια και αποθηκεύθηκαν σε MAP στους 0°C. Οι δύο ουσίες παράγονταν μόνο στα μοντέλα με οξυγαλακτικά βακτήρια και η συγκέντρωσή τους αυξήθηκε κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Οι Joffraud *et al.* (2001) αναφέρουν μεγάλες ποσότητες των ουσιών αυτών κατά τη διάρκεια συντήρησης ενοφθαλμισμένων μοντέλων καπνιστού σολομού στους 6 °C, όπου τα *Lactobacillus* spp. αποτέλεσαν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί αύξηση των ουσιών αυτών κατά την αλλοίωση ιχθύων τσιπούρας και προ-ψημένων γαρίδων που συντηρήθηκαν στον πάγο (Soncin *et al.* 2008), σε καπνιστό σολομό σε κενό στους 5°C (Jorgensen *et al.* 2001), καθώς και σε νταούκι Ατλαντικού, σκουμπρί και μπακαλιάρo στους 4°C (Duflos *et al.* 2006). Οι δύο ουσίες έχει αναφερθεί ότι παράγονται από την ικανότητα ορισμένων μικροοργανισμών να αποικοδομούν τα αμινοξέα λευκίνη και ισολευκίνη σε άλλες οργανικές ενώσεις (Soncin *et al.* 2008). Η λευκίνη και η

ισολευκίνη αποικοδομούνται από τη δράση των βακτηρίων όπως για παράδειγμα από βακτήρια του υδάτινου περιβάλλοντος (Kirchman *et al.* 1985), καθώς και από βακτήρια που απαντώνται σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια (κυρίως τα *S. diacetilactis* DRC1 και *Lactobacillus* No.138) (Nakae & Elliott 1965). Επομένως, η 3-methyl-1-butanol και η 2-methyl-1-butanol θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως χημικοί δείκτες αλλοίωσης μικροβιακής προέλευσης των ιχθύων της Μεσογείου.

Οι αλκοόλες Isoamyl alcohol και η 2-ethyl-1-hexanol ανιχνεύθηκαν σε αρκετά υψηλές ποσότητες στα μοντέλα με οξυγαλακτικά βακτήρια. Η Isoamyl alcohol παρουσίασε αύξηση στους 0°C σε συνθήκες MAP, ενώ η 2-ethyl-1-hexanol παρουσίασε μεγάλη αύξηση, σε σχέση με τα υπόλοιπα μοντέλα, σε όλες τις θερμοκρασίες και στις δύο ατμόσφαιρες. Η παραγωγή αλκοολών οφείλεται γενικά σε μικροβιακή δράση. Η Isoamyl alcohol παράγεται κυρίως από ζύμες (Lampitt 1919, Thorne 1937,1941, Yamada 1962a,b,c). Οι Romano *et al.* (1992) αναφέρουν ότι η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων Isoamyl alcohol οφείλεται στη δράση των ζυμών *Hanseniaspora guilliermondii* και *Kloeckera apiculata* κατά τη ζύμωση του κρασιού. Παρόλα αυτά, οι Lee *et al.* (2009) ανίχνευσαν μεγάλες ποσότητες της Isoamyl alcohol και της 2-ethyl-1-hexanol σε κρασιά Meoru, στα οποία η ζύμωση πραγματοποιήθηκε από οξυγαλακτικά βακτήρια (κυρίως *Oenococcus oeni*). Η πρόδρομη ουσία για την παραγωγή της Isoamyl alcohol είναι η λευκίνη (Neubauer & Fromherz 1911). Οι Dickinson *et al.* (1997), αναφέρουν ότι το πιο πιθανό μεταβολικό μονοπάτι της μετατροπής της λευκίνης σε Isoamyl alcohol είναι μέσω της αναγωγής α-ketoisocaproate. Δεν έχει αναφερθεί παρουσία του ενζύμου αυτού σε ζύμες. Οι ζύμες χωρίς αυτό το ένζυμο δεν μπορούν να μετατρέψουν την α-hydroxyisocaproate σε Isoamyl alcohol. Πιστεύεται ότι την

ικανότητα που έχουν οι ζύμες να παράγουν Isoamyl alcohol την απέκτησαν από τα οξυγαλακτικά βακτήρια κατά την εξελικτική ιστορία (Dickinson *et al.* 1997). Αντίθετα, το ένζυμο αυτό είναι παρόν σε οξυγαλακτικά βακτήρια όπως είναι τα *L. casei*. Επιπρόσθετα, έχουν αναφερθεί διάφοροι άλλοι μηχανισμοί όπως είναι η ενζυματική δραστηριότητα (Klingshirn *et al.* 1987) και η οξειδωση πρόδρομων ουσιών εξαιτίας του παγιδευμένου αέρα στα τρόφιμα π.χ. στα σταφύλλια (Guymon *et al.* 1961), οι οποίοι ευθύνονται για την αύξηση της ουσίας αυτής. Επιπλέον, κατά Schreier (1979), η παρουσία μεγάλων ποσοτήτων πρόδρομων ενώσεων όπως τα αμινοξέα και άλλες πηγές άνθρακα, έχει αναφερθεί, μεταξύ άλλων, ως αιτία αύξησης της Isoamyl alcohol σε κρασιά. Οι δύο ουσίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως χημικοί δείκτες αλλοίωσης κυρίως μικροβιακής προέλευσης των ιχθύων της Μεσογείου.

Οι ουσίες που έχουν αναφερθεί ως πιθανοί χρήσιμοι χημικοί δείκτες κατά την αλλοίωση των αλιευμάτων στην βιβλιογραφία είναι η ethanol, 2-methyl-butanal, 1-Penten-3ol, 1-Propanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 3-hydroxy-1-butanone, 2-butanone και το acetic acid σε καπνιστό σολομό σε κενό στους 5 και 10°C (Jorgensen *et al.* 2001, Jonsdottir *et al.* 2008), η 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-butanal, 3-methyl-butanal και η 3-hydroxy-1-butanone σε ιχθύες τσιπούρας και σε προ-ψημμένες γαρίδες στον πάγο (Soncin *et al.* 2008), η 3-methyl-1-butanol και η Pentadecane σε τόνο στους 30 °C και στον πάγο (Edirisinghe *et al.* 2007). Πράγματι, αρκετές από τις ουσίες αυτές προέκυψε από την παρούσα διδακτορική διατριβή ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χημικοί δείκτες αλλοίωσης, κυρίως μικροβιακής προέλευσης, των ιχθύων, με σημαντικότερη ουσία την 3-methyl-butanal. Εξαιτίας της αποτελεσματικότητας των μοντέρνων τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, μελλοντική προτεραιότητα αποτελεί η συνέχεια των ερευνών σχετικά με το

δυναμικό και την ικανότητα αλλοίωσης (spoilage potential and spoilage activity) και άλλων μικροοργανισμών στους ιχθύες Μεσογειακής προέλευσης. Νέοι τύποι μικροοργανισμών που πιθανόν να συνεισφέρουν στην αλλοίωση των ιχθύων Μεσογειακής προέλευσης 'φανερώνονται' συνεχώς με την εφαρμογή των μοντέρνων τεχνικών (μοριακών) που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Η ικανότητα των νεοεμφανιζόμενων μικροοργανισμών να παράγουν ουσίες οι οποίες οδηγούν στην οργανοληπτική απόρριψη, αποτελεί μια νέα μελλοντική προτεραιότητα για βαθύτερη κατανόηση της διαδικασίας της αλλοίωσης, με τις μοντέρνες τεχνικές χημικής ανάλυσης (GC-MS) που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη διατριβή.

Πίνακας 4.1. Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας κατά τη συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες στους 0, 5 και 15°C. Οι τιμές (μέσοι όροι ± τυπ. απόκλιση, 4 επαναλήψεων) εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

T °C	Μικροοργανισμοί	Αρχικός	Τελικός πληθυσμός	Πληθυσμός στην	lag± τυπ.απ. (d)	μmax±τυπ.απ. (d ⁻¹)
		πληθυσμός (log cfu/g±τυπ.απ.)	Nmax (log cfu/g±τυπ.απ.)	απόρριψη (log cfu/g±τυπ.απ.)		
0°C	Ολικός μικροβιακός πληθυσμός	4,02±0,19	8,37±0,14 (8,32±0,12)	8,26±0,13 (8,28±0,14)	2,52±0,73	0,484±0,03
	<i>Pseudomonas</i> spp.	3,23±0,08	7,81±0,12 (7,61±0,12)	7,69±0,11 (7,72±0,11)	1,88±0,81	0,447±0,02
	Βακτήρια που παράγουν H ₂ S	3,03±0,08	7,55±0,04 (7,33±0,09)	7,25±0,12 (7,33±0,09)	0	0,496±0,04
	Enterobacteriaceae	2,59±0,16	6,27±0,18 (6,21±0,18)	6,19±0,18 (6,21±0,05)	0	0,390±0,01
	Οξυγαλακτικά βακτήρια	3,73±0,21	5,30±0,14 (5,26±0,18)	5,24±0,20 (5,23±0,18)	2,63±0,68	0,160±0,01
	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<2	5,22±0,14 (>5,32)	4,78±0,13 (4,59±0,17)	0	0,210±0,04
5°C	Ολικός μικροβιακός πληθυσμός	4,02±0,19	8,67±0,03 (8,61±0,03)	8,48±0,07 (8,58±0,04)	0,40±0,06	1,325±0,04
	<i>Pseudomonas</i> spp.	3,23±0,08	8,68±0,05 (8,63±0,05)	8,39±0,24 (8,42±0,13)	0	1,219±0,06
	Βακτήρια που παράγουν H ₂ S	3,03±0,08	7,49±0,11 (7,47±0,11)	7,30±0,15 (7,32±0,16)	0	1,060±0,04
	Enterobacteriaceae	2,59±0,16	8,60±0,05 (8,40±0,16)	8,25±0,36 (8,41±0,16)	0	2,107±0,07
	Οξυγαλακτικά βακτήρια	3,73±0,21	5,59±0,19 (5,50±0,07)	5,35±0,13 (5,44±0,05)	1,13±0,28	0,539±0,07
	<i>Brochothrix</i>	<2	5,91±0,05 (5,89±0,04)	5,25±0,31 (5,24±0,26)	0	0,705±0,07

<i>thermosphacta</i>						
15 °C	Ολικός μικροβιακός πληθυσμός	4,02±0,19	9,28±0,14 (9,11±0,04)	8,76±0,15 (8,99±0,04)	0	2,970±0,11
	<i>Pseudomonas</i> spp.	3,23±0,08	8,78±0,15 (8,58±0,07)	8,25±0,13 (8,51±0,03)	0	3,216±0,14
	Βακτήρια που παράγουν H ₂ S	3,03±0,08	8,23±0,07 (8,19±0,07)	7,89±0,10 (7,81±0,17)	0	2,581±0,07
	Enterobacteriaceae	2,59±0,16	8,41±0,09 (8,30±0,12)	8,27±0,12 (8,29±0,12)	0	4,408±0,38
	Οξυγαλακτικά βακτήρια	3,73±0,21	6,10±0,05 (6,09±0,08)	5,33±0,21 (5,17±0,20)	0,68	1,154±0,04
	<i>Brochothrix</i> <i>thermosphacta</i>	<2	6,59±0,06 (6,58±0,08)	6,15±0,09 (6,05±0,15)	0	2,231±0,04

μmax: μέγιστος ρυθμός αύξησης, lag phase: φάση προσαρμογής, Nmax: μέγιστος τελικός πληθυσμός

Πίνακας 4.2. Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας κατά τη συντήρηση υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 0, 5 και 15°C. Οι τιμές (μέσοι όροι ± τυπ. απόκλιση, 4 επαναλήψεων) εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

T °C	Μικροοργανισμοί	MAP			
		Τελικός πληθυσμός N _{max} (log cfu/g±τυπ.απ.)	Πληθυσμός στην απόρριψη (log cfu/g±τυπ.απ.)	lag±τυπ.απ. (d)	μ _{max} ±τυπ.απ. (d ⁻¹)
0°C	Ολικός μικροβιακός πληθυσμός	7,96±0,15 (7,96±0,11)	7,74±0,10 (7,63±0,12)	2,73±1,37	0,247±0,02
	<i>Pseudomonas</i> spp.	7,43±0,20 (7,41±0,20)	7,21±0,12 (7,13±0,09)	2,41±0,48	0,273±0,01
	Βακτήρια που παράγουν H ₂ S	7,55±0,18 (7,35±0,13)	7,08±0,09 (7,18±0,07)	2,47±0,47	0,306±0,01
	Enterobacteriaceae	5,74±0,14 (5,49±0,15)	5,37±0,15 (5,47±0,15)	0,80±0,93	0,228±0,01
	Οξυγαλακτικά βακτήρια	6,27±0,14 (5,99±0,15)	5,84±0,12 (5,97±0,13)	8,02±0,49	0,299±0,04
	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	6,00±0,33 (6,02±0,39)	5,74±0,30 (5,65±0,14)	2,42±0,90	0,246±0,02
5°C	Ολικός μικροβιακός πληθυσμός	7,95±0,08 (7,89±0,09)	7,82±0,12 (7,80±0,08)	1,13±0,28	0,778±0,26
	<i>Pseudomonas</i> spp.	7,44±0,09 (7,40±0,12)	7,31±0,13 (7,29±0,10)	0,56±0,70	0,761±0,25
	Βακτήρια που παράγουν H ₂ S	6,67±0,10 (6,58±0,11)	6,54±0,14 (6,52±0,07)	1,83±0,52	0,989±0,49
	Enterobacteriaceae	7,42±0,07 (7,38±0,08)	7,28±0,13 (7,31±0,08)	0	0,731±0,04
	Οξυγαλακτικά βακτήρια	6,00±0,06 (5,95±0,08)	5,93±0,02 (5,95±0,07)	1,75±0,47	0,624±0,26
	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	6,11±0,09 (6,04±0,07)	5,89±0,13 (5,98±0,07)	1,33±0,18	0,718±0,03

15 °C	Ολικός μικροβιακός πληθυσμός	8,92±0,18 (8,90±0,18)	8,48±0,05 (8,68±0,07)	0	2,611±0,25
	<i>Pseudomonas</i> spp.	8,84±0,06 (8,75±0,04)	8,04±0,11 (8,37±0,10)	0	2,728±0,11
	Βακτήρια που παράγουν H ₂ S	8,65±0,17 (8,67±0,17)	7,29±0,18 (7,32±0,12)	0	2,063±0,07
	Enterobacteriaceae	8,72±0,04 (8,62±0,06)	8,22±0,15 (8,46±0,07)	0	3,499±0,23
	Οξυγαλακτικά βακτήρια	6,39±0,11 (6,48±0,10)	5,52±0,09 (5,44±0,14)	0,05±0,09	0,931±0,04
	<i>Brochothrix</i> <i>thermosphacta</i>	6,82±0,05 (6,87±0,03)	5,28±0,25 (5,15±0,24)	0,36±0,11	2,007±0,05

μ_{max}: μέγιστος ρυθμός αύξησης, lag phase: φάση προσαρμογής, N_{max}: μέγιστος τελικός πληθυσμός

Πίνακας 4.3. Μεταβολές στο TVB-N (μ.ο. ± τυπ.αποκλ., mg /100g σάρκας ιχθύος, n=2x2=4) κατά τη διάρκεια της συντήρησης των φιλέτων υπό συνθήκες αέρα και MAP στους 0, 5 και 15 °C. Οι τιμές με έντονο μαύρο χρώμα αντιστοιχούν στο χρόνο απόρριψης.

Θερμοκρασία	Χρόνος (Ημέρες)	Αέρας	MAP
		TVB-N	TVB-N
0°C	0	15,29±0,31	15,29±0,31
	4	15,91±0,20	15,33±0,18
	8	16,85±0,51	15,49±0,18
	12	19,89±0,52	15,68±0,23
	14	24,54±0,25	
	16	25,42±0,55	15,93±0,34
	18	29,16±0,43	16,64±0,21
	20		17,56±0,86
	22		19,28±0,79
5°C	2	17,91±0,36	
	4	20,89±0,13	16,55±0,61
	5	25,30±0,19	
	6	28,33±0,51	
	8		19,10±0,50
15°C	12		23,25±1,13
	1	20,33±0,18	18,31±1,17
	2	28,02±0,34	18,39±0,27
	3	41,28±0,80	21,37±0,25
	4	50,76±0,52	24,00±0,75

Πίνακας 4.4. Μεταβολές του TMA-N (μ.ο. ± τυπ.απ., mg /100g σάρκας ιχθύος, n=2x2=4) κατά τη διάρκεια της συντήρησης των φιλέτων υπό συνθήκες αέρα και MAP στους 0, 5 και 15 °C. Οι τιμές με έντονο μαύρο χρώμα αντιστοιχούν στο χρόνο απόρριψης.

Θερμοκρασία	Χρόνος (Ημέρες)	Αέρας	MAP
		TMA-N	TMA-N
0°C	0	0,72±0,07	0,72±0,07
	4	0,91±0,01	0,73±0,08
	8	0,91±0,02	0,74±0,07
	12	0,98±0,04	0,75±0,05
	14	1,03±0,06	
	16	1,40±0,09	0,77±0,05
	18	2,35±0,09	0,88±0,02
	20		0,89±0,01
5°C	22		0,92±0,04
	2	0,92±0,04	
	4	1,00±0,03	0,74±0,09
	5	1,12±0,04	
	6	1,41±0,09	
15°C	8		0,75±0,09
	12		0,89±0,01
	1	1,01±0,04	0,76±0,03
	2	1,12±0,03	0,80±0,02
	3	1,53±0,04	1,04±0,11
	4	1,73±0,151	1,51±0,08

Πίνακας 4.5. Καμπύλες αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης (X) στα πρότυπα διαλύματα των 7 βιογενών αμινών.

	R.T. (min)	Γραμμική εξίσωση $Y=aX+b$		Συντελεστής συσχέτισης (R^2)
		a	b	
Πουτρεσκίνη	4,729	94924,4	-3500,99	0,972
Καδαβερίνη	5,126	998796,7	-30856,70	0,971
Τρυπταμίνη	5,903	1352486,0	-46404,40	0,967
Σπερμιδίνη	6,378	2009661,0	-34887,50	0,980
Σπερμίνη	7,768	479238,6	-7066,47	0,995
Τυραμίνη	10,166	782760,4	-11534,60	0,992
Ισταμίνη	8,985	2380138,5	-67116,95	0,977

Y=εμβαδόν

X=συγκέντρωση σε mg/100ml πρότυπου διαλύματος

Πίνακας 4.6. Μεταβολές στις συγκεντρώσεις των βιογενών αμινών κατά τη διάρκεια της συντήρησης των φιλέτων σε συνθήκες αέρα στους 0, 5 και 15 °C. Οι τιμές με έντονο μαύρο χρώμα αντιστοιχούν στο χρόνο απόρριψης.

Θερμοκρασία	Χρόνος (Ημέρες)	Βιογενείς αμίνες στα φιλέτα (mg/100g υγθύος)					
		Πουτρεσκίνη	Καδαβερίνη	Τρυπταμίνη	Σπερμιδίνη	Σπερμίνη	Τυραμίνη
0°C	0	-	0,690±0,011	-	-	0,450±0,003	-
	4	-	0,722±0,013	-	-	0,662±0,003	-
	8	-	0,793±0,027	-	-	0,480±0,002	-
	12	-	0,797±0,014	-	-	0,577±0,002	-
	14	-	0,807±0,005	-	-	0,584±0,002	-
5°C	2	-	0,794±0,003	0,812±0,004	-	0,464±0,003	-
	4	-	0,797±0,002	0,926±0,009	-	0,493±0,004	-
	5	-	0,801±0,001	0,928±0,004	-	0,500±0,003	-
	6	-	0,827±0,002	1,116±0,011	-	0,763±0,024	-
15°C	1	1,112±0,019	0,813±0,012	0,729±0,011	-	0,489±0,021	-
	2	1,238±0,013	0,912±0,002	0,870±0,009	-	0,519±0,005	-
	3	1,326±0,014	1,161±0,014	1,172±0,006	-	0,523±0,003	-
	4	5,400±0,135	1,272±0,012	1,226±0,007	-	1,524±0,040	-

Πίνακας 4.7. Μεταβολές στις συγκεντρώσεις των βιογενών αμινών κατά τη διάρκεια της συντήρησης των φιλέτων σε MAP στους 0, 5 και 15 °C. Οι τιμές με έντονο μαύρο χρώμα αντιστοιχούν στο χρόνο απόρριψης.

Θερμοκρασία	Χρόνος (Ημέρες)	Βιογενείς αμίνες στα φιλέτα (mg/100g υχθύος)					
		Πουτρεσκίνη	Καδαβερίνη	Τρυπταμίνη	Σπερμιδίνη	Σπερμίνη	Τυραμίνη
0°C	0	-	0,690±0,011	-	-	0,450±0,003	-
	4	-	0,788±0,003	-	0,438±0,003	0,504±0,003	-
	8	-	0,788±0,002	-	0,438±0,002	0,558±0,006	-
	12	-	0,788±0,002	-	0,439±0,001	0,569±0,006	-
	16	-	0,788±0,004	-	0,439±0,002	0,575±0,004	-
	18	-	0,819±0,003	-	0,453±0,001	0,624±0,005	-
5°C	4	-	0,786±0,003	-	-	0,615±0,009	0,380±0,005
	8	-	0,788±0,003	-	-	0,960±0,029	0,381±0,006
	12	-	0,801±0,004	-	-	1,051±0,023	0,382±0,006
15°C	1	-	0,812±0,005	-	-	0,634±0,030	0,366±0,011
	2	-	0,842±0,003	-	-	0,724±0,027	0,385±0,003
	3	-	0,889±0,004	-	-	0,917±0,028	0,394±0,004
	4	-	0,905±0,003	-	-	0,970±0,020	0,395±0,007

Πίνακας 4.8. Πτητικές ουσίες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν $\times 10^{-6}$ της κάθε κορυφής) σε φιλέτα τσιπούρας αποθηκευμένα υπό συνθήκες αέρα κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) στους 0, 5 και 15°C. R.T.: Retention Time (NIST library).

	Αέρας (εμβαδόν $\times 10^{-6}$)											
	R.T.	0°C					5°C			15°C		
		0	4	8	12	14	2	4	5	6	1	2
Ethyl acetate	2,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,65	3,90
acetic acid	2,73	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19
3-Methyl-1-butanal ³	2,94	-	0,10	0,15	0,20	0,63	-	-	1,30	0,43	1,64	2,31
2-Methyl-1-butanal	3,07	-	-	-	-	0,31	-	-	0,39	-	-	0,70
1-Penten-3-ol ⁴	3,38	-	13,3	3,73	1,04	6,40	19,5	3,39	5,24	0,66	-	1,23
2-pentanone	3,45	0,14	-	0,18	-	0,72	-	0,20	-	0,19	-	0,31
3-pentanone ⁴	3,67	-	-	-	-	4,48	-	-	0,77	-	-	-
Ethyl propionate	4,08	-	-	-	-	-	-	-	-	0,36	-	0,93
Acetyl propionyl	3,65	1,21	-	0,68	1,21	-	-	1,69	-	0,38	-	0,33
Isoamyl alcohol	4,69	-	0,19	-	-	0,60	-	-	1,22	0,17	-	4,07
Ethyl Isobutyrate	5,59	-	-	-	-	-	-	-	0,05	0,22	0,12	0,35
Ethyl butyrate	7,21	-	-	-	-	-	-	-	-	0,21	-	-
Amyl alcohol	5,89	0,07	0,13	0,14	0,14	0,14	0,71	0,16	-	-	-	-
2-Penten-1-ol (Z)	6,00	0,26	0,73	0,30	0,22	0,19	1,59	0,35	0,20	-	-	0,16
Cis-6 Nonen-1-ol	6,69	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexenal ⁴	7,04	5,42	5,13	1,85	1,80	1,10	34,4	2,45	0,34	-	0,68	0,40
Hexanal	7,12	-	-	-	-	-	-	-	-	0,70	-	-
Ethylcrotonate ³	9,07	-	-	-	-	0,18	-	-	0,04	0,19	-	-
Ethyl 2-methylbutyrate ³	9,30	-	-	-	-	0,39	-	-	0,05	0,44	0,14	0,20
Ethyl isovalerate ³	9,45	-	-	-	-	0,65	-	-	0,10	0,63	0,09	0,25
trans-2-Hexenal	9,38	-	0,08	-	0,15	-	0,55	0,08	-	-	-	-
2-nonanone	19,51	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-
1-Hexanol	10,18	0,11	-	-	-	-	0,16	0,13	-	-	-	-
2-heptanone	11,04	-	-	-	-	0,45	-	-	-	-	-	-
cis-4-Heptenal	11,40	0,25	0,91	0,52	0,31	0,36	2,02	0,38	-	0,14	-	-

Heptanal	11,48	0,36		0,16	0,09	0,13	0,73	0,14	-	-	-	-
Trans-2-octenal	14,64	1,20	1,49	1,89	0,99	1,59	0,13	-	-	0,30	-	0,44
Ethyl tiglate	13,22	-	-	-	-	0,48	-	-	-	0,27	-	-
1-octen-3-ol ³	14,91	-	0,74	0,75	0,77	0,79	1,35	0,54	0,29	0,14	0,11	0,17
6 methyl 5 hepten 2 one ³	15,17	-	-	-	0,21	0,22	-	-	-	-	-	-
2,3 octanedione	15,14	0,27	-	0,16	-	-	-	0,18	-	-	-	-
trans,trans-2,4-Heptadienal	15,62	0,17	0,13	0,06	0,48	-	0,44	0,20	-	-	-	-
2-Ethyl-1-hexanol	16,97	1,78	1,92	1,20	0,40	1,52	1,76	5,00	3,3	1,05	-	0,58
cis-6-nonenal ³	19,46	-	-	-	0,15	0,55	-	-	0,14	-	0,06	0,12
Hexanoic acid, ethyl ester	15,80	0,20	-	-	0,05	0,15	-	-	-	0,27	-	0,13
2 methyl 1 butanol	16,98	-	2,06	-	0,44	-	-	-	-	-	-	0,37
Nonanal	19,97	0,34	0,18	0,14	0,12	0,10	0,37	0,13	0,14	0,07	-	-
n-dodecane	22,65	0,04	-	-	0,97	0,07	0,12	0,20	0,04	0,12	-	-
Trans 2 nonenal	22,67	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14	-	0,15
n-decanal	22,75	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-decenal	23,45	0,05	-	0,05	0,05	-	-	0,02	-	-	-	-
1,4 heptadiene	23,52	-	-	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-
n-undecane	23,81	0,21	0,05	0,11	0,11	-	-	-	-	0,16	0,23	0,10
n-tetradecane	24,57	0,17	0,05	0,11	0,10	0,09	0,10	0,19	0,07	0,14	1,54	1,35
n-eicosane	29,94	-	0,49	0,03	0,13	0,53	0,05	0,23	0,04	-	0,29	0,13
Lauryl alcohol	25,11	-	-	0,04	0,04	-	-	-	-	-	-	-
1-decanol	25,11	0,05	-	0,04	0,03	-	0,02	-	-	0,04	-	0,04
pentadecane	25,14	1,24	0,45	0,64	0,74	0,46	0,76	1,57	0,32	1,20	1,42	0,97
n-hexadecane	26,04	-	-	-	0,13	0,04	0,08	0,22	-	0,18	-	-
n-tetracosane	26,07	1,16	-	0,78	1,10	0,54	0,88	1,18	0,32	1,45	0,88	0,75

Πίνακας 4.9. Πτητικές ουσίες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν X 10⁻⁶ της κάθε κορυφής) σε φιλέτα τσιπούρας αποθηκευμένα υπό συνθήκες MAP κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) στους 0, 5 και 15°C. R.T.: Retention Time (NIST library).

	MAP (εμβαδόν X 10 ⁻⁶)											
	R.T.	0°C						5°C			15°C	
		0	4	8	12	16	18	4	8	12	1	2
acetic acid ³	3,11	0,13	0,90	0,30	0,28	0,31	-	0,18	0,28	0,47	-	-
3-Methyl-1-butanal ³	2,86	-	-	-	-	0,89	-	-	0,29	1,68	-	0,18
2-Methyl-1-butanal ³	3,01	-	-	-	-	0,40	-	-	0,22	1,04	-	-
1-Penten-3-ol ^{3,4}	3,38	-	0,63	1,08	2,16	2,36	2,54	1,17	1,00	1,03	-	1,67
Acetyl propionyl	3,65	1,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,66
Isoamyl alcohol	4,70	-	-	-	-	-	-	-	-	0,61	-	-
Amyl alcohol	5,89	0,07	-	-	-	-	-	-	0,12	-	-	0,34
2-Penten-1-ol (Z)	6,00	0,26	-	-	0,27	0,36	-	-	0,32	0,35	-	-
3-hydroxy-1-butanone	3,54	-	-	-	-	-	-	-	-	0,26	-	-
Hexenal ⁴	7,06	5,42	1,00	1,54	3,18	1,18	2,21	2,49	1,87	0,93	-	-
Hexenal ^{3,4}	7,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,80	4,12
trans-2-Hexenal	9,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19
1-Hexanol	10,18	0,11	-	-	-	-	-	-	0,14	0,20	-	-
cis-4-Heptenal ³	11,36	0,25	0,40	0,72	0,98	1,37	1,39	0,63	0,67	0,54	0,26	1,01
Heptyl alcohol	14,66	-	-	-	-	-	0,38	-	-	-	-	-
1-octen-3-ol ³	14,93	-	0,34	0,81	1,05	1,20	1,23	0,75	0,95	0,96	0,35	1,00
trans,trans-2,4-Heptadienal	15,60	0,17	0,33	0,29	0,17	-	0,20	0,23	0,14	-	-	0,23
2-Ethyl-1-hexanol	16,94	1,78	-	0,23	0,54	0,15	0,30	0,39	0,27	0,54	0,14	0,15
trans-2-octenal	14,62	-	-	-	-	-	-	-	0,13	0,11	-	-
Nonanal	20,00	0,34	0,44	0,37	0,41	0,35	0,27	0,25	0,20	0,24	-	0,20
trans-2-Nonenal	27,52	-	-	-	-	-	-	-	-	0,12	-	-
n-decanal	22,71	0,04	0,08	0,06	0,05	0,04	-	-	0,03	-	-	-
2(E)-Decenal	23,39	0,05	0,44	0,27	0,15	0,14	0,11	0,09	0,10	0,07	0,06	-
n-nonane	22,61	-	-	-	0,16	0,12	-	-	-	-	-	-
1-Decanol	25,10	-	-	-	-	-	0,06	-	0,05	0,04	-	1,26

Lauryl alcohol	25,10	-	-	-	-	-	0,07	0,05	-	-	-	-
n-undecane	23,79	0,21	-	0,17	-	-	0,12	0,14	-	0,10	0,07	-
n-dodecane	22,62	0,04	-	0,04	0,05	0,07	-	0,04	0,07	0,06	0,05	0,05
n-tetradecane	24,53	0,17	0,15	1,28	0,16	0,11	0,14	0,19	0,15	0,11	0,07	0,11
pentadecane	25,12	1,24	0,78	0,90	1,00	0,85	0,87	1,32	0,79	0,68	0,51	0,70
n-hexadecane	26,00	-	0,17	0,26	-	0,19	0,14	-	0,13	0,13	-	-
n-eicosane	26,07	-	-	-	0,22	-	-	0,19	0,11	-	-	-
n-tetracosane ⁴	26,14	1,16	1,28	0,19	1,22	0,74	1,22	1,17	1,43	1,56	0,81	0,79

Πίνακας 4.10. Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν X 10⁻⁶ της κάθε κορυφής) σε μάρτυρες - στείρα μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP στους 0, 5 και 15°C.

	Air (εμβαδόν X 10 ⁻⁶)									MAP (εμβαδόν X 10 ⁻⁶)									
	RT	0°C			5°C			15°C			0°C			5°C			15°C		
		0	4	8	12	14	4	5	1	2	8	16	18	4	6	8	1	2	
Butylalcohol ³	2,82	-	-	-	-	-	-	-	-	1,87	2,77	5,83	0,55	0,79	1,02	0,69	1,63		
1-penten-3-ol ³	3,03	0,35	0,55	0,62	0,72	0,76	-	-	0,38	-	-	-	-	-	-	-	-		
2-pentanone	3,11	0,58	0,33	-	-	-	0,41	-	0,14	1,09	0,23	0,34	0,36	-	-	-	-		
Isoamyl alcohol	4,12	-	-	-	-	-	-	-	-	0,53	-	-	-	-	-	-	0,73		
4-methyl-2-pentanone	4,19	0,20	-	-	-	-	-	-	-	0,53	-	-	-	-	-	-	-		
Amyl alcohol	5,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,66	-		
Hexenal	6,10	4,22	1,34	0,88	0,54	-	4,09	2,05	1,13	1,34	-	0,68	0,50	1,35	3,99	5,70	0,50		
1-hexanol	9,00	0,42	-	-	-	-	1,08	0,49	-	0,48	-	-	0,78	-	-	-	-		
n-nonane	10,22	-	0,31	0,20	-	-	-	-	0,22	-	-	-	0,16	-	-	-	-		
Heptanal	10,29	3,51	1,46	1,29	0,89	0,45	2,15	1,81	1,02	1,32	0,88	1,51	1,21	2,23	1,80	4,66	0,70		
1-butoxy-2-propanol	10,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-	-	-		
2-octanone	11,93	0,80	0,27	-	-	-	-	-	-	1,62	-	-	-	-	-	-	-		
Trans-2-heptenal	12,68	-	-	-	-	-	0,17	0,19	-	-	0,49	-	-	-	-	-	-		
Heptyl alcohol ³	13,33	0,22	-	-	-	-	-	-	-	0,27	0,24	0,38	0,50	-	-	-	-		
1-octen-3-ol	13,69	0,30	-	-	-	-	-	-	0,39	0,60	0,39	0,39	1,37	-	-	-	-		
6-methyl-5-hepten-2-one ³	14,01	0,49	0,46	0,67	0,76	-	0,88	0,76	0,85	1,00	0,53	0,66	0,89	0,56	0,74	0,94	0,29		
n-decane ³	14,51	0,24	0,64	0,68	-	-	0,45	0,55	0,55	0,68	0,30	0,41	0,70	0,62	0,65	0,69	0,20		
n-undecane ³	14,51	0,45	0,48	0,51	-	-	0,84	0,53	-	-	-	-	0,64	0,64	0,72	0,75	-		
octanal	14,65	3,02	1,51	-	-	-	1,98	-	1,80	1,99	-	1,11	0,90	2,45	2,69	3,71	-		
2-ethyl-1-	15,74	3,94	0,80	-	-	-	12,2	12,5	7,92	24,8	-	-	6,09	4,09	5,82	10,70	-		

hexanol ³							1	9		8								
Trans-2-octenal	16,90	0,70	-	-	-	-	-	0,69	0,40	-	-	-	-	-	-	0,78	-	-
Acetophenone ³	17,17	0,53	-	0,49	-	-	-	-	0,41	0,57	-	0,19	0,60	0,69	0,74	0,80	0,20	-
1-octanol	17,46	1,79	-	-	-	-	2,33	-	1,45	3,57	0,65	0,33	1,25	0,57	0,96	1,24	0,37	0,33
Nonanal ³	18,75	8,70	15,4 5	13,3	9,89	7,86	9,30	16,2 6	18,2 0	14,5 0	8,85	8,90	17,5 2	21,9 5	22,00	38,00	7,00	4,86
nonanol	19,89	0,41	-	-	-	-	0,44	-	0,46	1,84	-	0,17	0,22	-	0,28	0,36	-	-
n-dodecane	22,34	0,75	0,46	0,90	0,67	0,76	2,44	0,70	0,66	0,53	0,22	0,66	0,87	0,84	0,69	0,63	1,26	0,91
n-decanal ³	22,55	3,43	2,80	3,76	3,00	3,25	3,71	3,90	3,96	6,60	2,04	1,23	4,20	4,00	4,68	7,55	1,84	1,65
2-decenal (E)	24,53	1,55	0,35	-	-	-	1,51	0,82	0,52	0,51	-	0,16	0,28	0,53	0,94	0,60	-	0,20
1-decanol	24,91	0,22	1,90	-	-	-	0,43	0,51	-	-	-	-	1,09	1,19		0,66	0,77	0,46
Cis-6-nonen-1-ol	26,11	4,17	-	-	-	-	-	1,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trans-2-nonenal	27,98	1,32	-	-	-	-	1,32	0,72	-	-	-	-	-	-	0,90	-	-	-
Isobutyl isobutyrate	28,34	-	-	-	-	-	1,52	0,86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-dodecene	28,88	0,77	1,77	2,82	-	-	-	-	-	-	-	9,89	1,58	-	-	0,41	-	-
n-tetradecane	29,14	3,27	2,6	3,02	2,88	3,05	-	2,77	3,50	2,36	0,54	2,41	3,90	3,63	3,13	3,71	1,90	1,65
pentadecane	32,24	0,63	0,52	0,59	0,64	0,51	0,85	0,58	0,87	0,71	0,28	0,73	1,09	1,21	0,80	0,80	0,42	0,31
n-eicosane	33,43	0,51	0,46	0,44	0,36	0,52	-	-	-	-	0,52	0,32	0,25	0,34	-	-	0,23	-
1-undecene	33,78	0,88	-	-	-	-	-	0,82	-	-	-	0,45	0,45	-	-	0,37	-	-
n-hexadecane	34,07	3,89	1,45	1,46	1,22	1,38	2,23	1,38	2,37	2,95	1,10	1,12	1,93	2,22	1,72	1,88	1,26	0,80
n-octadecane	35,65	2,16	-	-	-	-	1,37	-	0,71	0,81	0,88	0,55	0,59	-	-	-	-	-
n-tetracosane	36,18	1,13	0,36	0,52	-	-	3,42	0,46	0,28	-	0,78	0,56	0,48	0,36	0,70	-	-	-

Πίνακας 4.11. Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν X 10⁻⁶ της κάθε κορυφής) από τη δράση των *Pseudomonas* spp. μετά από ενοφθαλμισμό σε στείρα μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP στους 0, 5 και 15°C.

	Air (εμβαδόν X 10 ⁻⁶)									MAP (εμβαδόν X 10 ⁻⁶)								
	R.T.	0°C			5°C			15°C			0°C	5°C			15°C			
		0	4	8	12	14	4	5	1	2		8	16	18	4	6	8	1
Butylalcohol ^{2,3}	2,82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,08	4,22	6,00	0,57	0,79	0,80	1,85	-
1-penten-3-ol ²	3,06	0,39	0,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-pentanone ^{2,3}	3,14	0,23	0,33	0,56	-	-	0,60	0,22	0,53	0,69	0,59	0,43	0,48	-	-	-	1,13	0,46
Dimethyl disulfide ²	4,31	-	-	1,03	-	-	-	0,56	0,91	0,86	-	-	-	-	-	-	-	2,25
2-methyl-1-butanol ²	4,20	-	-	-	-	-	-	-	-	0,51	-	-	-	-	-	-	-	3,09
Acetic acid ²	2,51	-	-	-	-	-	-	-	-	2,53	-	-	-	-	-	-	-	-
Isoamyl alcohol ^{2,3}	4,10	-	-	0,77	0,96	1,15	-	0,61	3,87	1,63	-	-	1,18	-	-	-	7,12	21,6
Amyl alcohol ²	5,05	-	-	-	-	-	-	-	3,90	-	-	-	0,52	-	-	0,68	-	-
1-penten-3-one ²	5,76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,28	-	-
Hexenal ^{2,3}	6,13	1,18	1,13	0,38	-	-	6,11	0,70	0,28	0,55	0,35	0,69	0,80	1,84	2,84	2,97	0,67	1,52
Ethyl-2-methylbutyrate ^{1,3}	8,20	-	-	-	-	-	-	-	0,56	0,94	-	-	-	-	-	-	0,86	-
Ethyl isovalerate ^{1,3}	8,34	-	-	0,64	0,67	0,82	-	0,43	1,03	1,89	-	-	-	-	-	-	-	1,05
1-hexanol ^{2,3}	9,02	0,44	-	-	-	-	3,17	0,42	-	0,37	0,45	0,45	0,59	0,39	0,57	2,92	1,17	-
2-heptanone ²	9,87	-	-	0,55	-	-	0,44	0,24	0,59	2,64	-	-	-	-	-	-	1,59	0,68
Heptanal ²	10,31	1,79	1,47	1,29	0,88	-	3,15	1,30	0,96	2,28	0,98	1,84	1,34	3,96	2,06	2,83	1,40	1,28
2-butenic acid ¹	11,33	-	-	-	-	-	-	-	0,30	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
2-octanone ²	11,94	-	0,36	-	-	-	-	-	-	0,51	0,93	-	-	-	-	-	1,13	-
Ethyl tiglate ^{1,3}	12,01	-	-	1,28	1,36	1,44	-	1,18	1,59	2,76	-	-	-	-	-	-	0,91	0,36
Trans-2-heptenal ²	12,67	-	-	-	-	-	0,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heptyl alcohol ^{2,3}	13,32	-	-	0,37	-	-	1,03	0,88	0,48	0,68	0,20	0,29	0,30	0,84	-	-	0,39	0,51
1-octen-3-ol ²	13,70	-	-	-	-	-	-	-	-	0,74	0,68	1,04	1,38	-	-	-	-	-
6-methyl-5-hepten-	14,01	0,73	0,74	0,74	0,86	0,89	0,78	0,85	0,70	0,70	0,54	0,74	0,75	0,49	0,56	1,12	0,48	0,58

2-one ^{2,3}																		
n-decane ^{2,3}	14,51	0,39	0,74	0,87	0,22	-	0,52	0,28	0,85	1,10	-	0,51	0,31	-	0,65	0,39	-	0,42
Hexanoic acid, ethyl ester ¹	14,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,62	-	-
Octanal ²	14,64	1,42	2,02	-	-	-	4,28	0,97	1,22	1,62	0,93	-	1,23	2,82	2,00	2,54	0,89	-
2-ethyl-1-hexanol ^{2,3}	15,76	0,72	0,84	1,48	1,65	1,78	17,7	14,9	8,87	12,3	5,80	-	-	5,14	6,36	8,36	-	2,30
n-undecane ²	16,89	-	0,62	0,75	-	-	-	-	0,75	-	-	0,30	-	-	-	0,96	-	0,90
Trans-2-octenal ^{2,3}	16,90	-	-	-	-	-	2,22	0,74	0,89	-	-	1,16	1,18	0,33	0,58	1,09	-	0,63
Acetophenone ^{2,3}	17,16	-	-	0,57	-	-	-	0,54	0,32	0,26	0,27	0,24	0,61	0,56	0,62	0,80	0,57	0,28
1-octanol ^{2,3}	17,46	-	0,77	-	-	-	2,61	-	-	1,31	1,48	-	1,20	0,71	0,71	0,94	1,34	0,62
2-nonanol ¹	18,62	-	-	-	-	-	-	1,11	-	5,88	-	-	-	-	-	-	-	-
Nonanal ^{2,3}	18,74	18,3	18,0	10,9	8,89	10,0	24,6	12,5	10,8	15,3	7,33	8,31	14,8	18,5	22,4	28,7	2,29	12,4
2-nonanone ^{1,3}	18,28	-	-	1,34	-	-	1,00	0,87	3,22	27,7	0,28	0,33	-	-	-	-	3,65	2,62
Nonanol ²	21,31	-	0,48	1,00	-	-	-	-	1,20	0,42	0,22	-	-	0,60	-	-	-	0,80
2-decenal (E) ²	24,52	0,56	0,35	-	-	-	3,18	0,53	0,28	0,41	0,16	0,29	-	1,05	0,65	0,81	0,42	0,51
1-dodecene ²	22,03	-	2,79	2,88	1,76	1,22	4,19	-	1,96	1,54	-	2,38	3,34	-	-	2,52	0,78	2,58
Ethyl octanoate ¹	22,27	-	-	-	-	-	0,69	-	-	0,33	0,35	-	-	-	-	0,90	0,38	
n-dodecane ^{2,3}	22,34	-	0,71	0,97	-	-	1,17	0,46	0,87	0,73	0,20	1,07	0,62	0,20	0,60	0,76	0,76	0,77
n-decanal ^{2,3}	22,54	-	3,84	3,63	2,12	1,88	3,96	3,41	2,52	2,00	1,06	3,35	-	1,86	3,85	5,76	1,50	3,24
2-undecanone ^{1,3}	25,65	-	-	-	-	-	-	-	-	3,85	-	-	-	-	-	-	1,58	2,16
Trans-2-nonenal ²	27,98	0,51	-	-	-	-	5,80	-	-	-	-	-	1,36	0,63	-	-	-	0,57
n-tetradecane ^{2,4}	29,14	2,65	3,22	3,68	3,66	3,68	4,22	2,21	3,33	1,08	0,84	3,83	2,84	1,03	3,11	3,34	1,80	2,90
Pentadecane ²	32,24	0,67	0,74	0,74	0,63	-	1,06	0,90	0,80	0,53	0,26	0,83	0,64	0,40	0,81	0,71	0,53	0,74
n-eicosane ²	26,74	-	-	0,76	-	-	0,78	-	0,66	0,26	0,55	0,55	-	-	-	0,47	0,81	-
1-undecene ²	26,64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,59	0,43	-	-	-	-	0,63
Isobutyl isobutyrate ²	28,30	0,45	-	-	-	-	0,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heptyl butyrate ²	28,31	-	-	-	-	-	1,22	-	-	1,10	-	-	-	-	-	-	-	-
1-decanol ²	28,88	0,45	3,08	-	-	-	1,44	0,81	-	0,60	0,43	-	-	-	-	-	-	-
n-hexadecane ²	34,07	1,67	-	1,54	-	-	2,70	1,80	1,67	1,19	1,46	1,56	1,54	1,50	1,45	2,07	2,63	2,48
n-octadecane ²	35,65	0,73	-	0,63	-	-	0,89	0,75	0,47	0,68	1,04	0,72	0,52	1,10	-	-	2,82	1,28
n-tetracosane ²	35,00	0,46	0,46	0,65	-	-	-	-	-	0,37	-	0,22	0,31	0,70	-	0,32	1,15	-

Πίνακας 4.12. Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν X 10⁻⁶ της κάθε κορυφής) από τη δράση των *Shewanella* spp. μετά από ενοφθαλμισμό σε στείρα μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP στους 0, 5 και 15°C.

	Air (εμβαδόν X 10 ⁻⁶)									MAP (εμβαδόν X 10 ⁻⁶)									
	R.T.	0°C			5°C			15°C			0°C			5°C			15°C		
		0	4	8	12	14	4	5	1	2	8	16	18	4	6	8	1	2	
Acetic acid ²	2,49	-	-	-	-	-	-	1,97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Butylalcohol ^{2,3}	2,82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,01	4,25	6,98	0,64	0,67	0,69	1,00	1,51	
1-penten-3-ol ²	3,07	0,51	0,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2-pentanone ^{2,3}	3,15	0,32	-	0,86	-	-	-	-	0,38	0,89	0,59	0,36	-	-	-	-	-	-	
Acetyl propionyl ²	3,27	-	-	-	-	-	-	0,47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Isoamyl alcohol ^{2,3}	4,10	-	-	-	-	-	-	-	2,15	2,48	-	-	-	-	-	-	-	0,63	
Dimethyl disulfide ²	4,32	-	-	-	-	-	-	-	-	0,88	-	-	-	-	-	-	-	-	
2-methyl-1-butanol ¹	4,36	-	-	-	-	-	-	-	-	0,93	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hexenal ^{2,3}	6,12	7,21	1,26	1,00	1,56	0,78	7,28	11,22	-	1,03	1,45	1,13	0,76	1,95	1,96	4,63	0,84	1,18	
1-hexanol ²	9,01	0,49	-	-	-	-	1,10	1,41	-	0,56	0,33	-	-	0,55	0,76	-	-	-	
2-heptanone ^{2,3}	9,88	-	-	-	-	-	-	-	0,29	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	
Heptanal ²	10,31	2,98	1,93	1,66	2,13	1,79	1,35	1,51	0,88	1,36	2,03	2,22	1,46	2,84	3,54	4,64	1,17	1,88	
Heptyl alcohol ^{2,3}	13,34	0,36	-	-	-	-	0,63	0,75	0,38	0,62	-	-	0,43	-	0,54	0,88	-	-	
1-octen-3-ol ²	13,71	0,36	-	-	-	-	-	0,34	-	-	0,88	0,76	1,19	-	-	-	-	-	
6-methyl-5-hepten-2-one ²	14,01	0,85	0,50	0,59	0,32	-	0,67	0,79	0,69	0,76	0,47	0,63	0,79	1,14	0,67	1,45	0,61	0,56	
n-decane ^{2,3}	14,52	-	0,60	-	-	-	0,35	0,48	0,33	0,66	-	0,61	0,66	0,66	0,62	0,54	0,29	0,37	
Octanal ²	14,66	2,98	2,44	0,99	1,56	2,15	1,79	-	0,90	-	2,90	1,45	1,56	2,96	3,74	3,84	1,34	1,87	
2-ethyl-1-hexanol ^{2,3}	15,75	6,49	0,91	1,02	0,87	1,46	17,52	17,90	4,42	5,12	0,42	-	-	5,97	6,43	8,33	-	-	
Trans-2-octenal ²	16,91	0,75	-	-	-	-	1,12	0,56	-	-	1,32	0,77	1,43	-	1,16	0,89	-	-	
Acetophenone ²	17,00	-	-	0,72	-	-	0,42	-	0,53	0,90	0,25	1,94	0,64	0,58	0,52	0,69	0,33	0,50	

1-octanol ²	17,47	2,20	-	-	-	-	2,67	-	0,49	1,08	-	1,21	1,82	0,93	0,44	1,49	0,46	0,74
2-nonanone ^{1,3}	18,27		-	1,21	-	-	-	-	2,69	7,83	-	-	-	-	-	-	-	-
n-undecane ^{2,3}	18,56	-	0,63	0,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,80	0,38	0,84
2-nonanol ^{1,3}	18,63	-	-	-	-	-	-	-	0,45	3,05	-	-	-	-	-	-	-	-
Nonanal ²	18,75	25,0 7	18,89	6,00	3,24	5,67	14,21	10,47	11,19	8,81	7,00	11,97	18,91	8,67	26,00	36,21	11,9	17,7 5
Nonanol ^{2,3}	21,30	-	6,41	0,68	-	1,16	-	-	0,97	1,55	-	-	-	0,81	0,38	0,04	-	-
Ethyl octanoate ¹	22,28	-	-	-	-	-	-	-	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-dodecene ^{2,3}	22,34	-	5,71	2,15	1,89	0,37	0,36	1,53	1,25	0,49	0,85	1,14	1,07		0,88	2,83	3,85	2,62
n-dodecane ²	22,34	0,80	1,10	0,62	0,88	1,17	0,58	0,91	0,47	1,14	0,53	0,48	0,67	1,29	0,93	0,94	0,78	0,68
n-decanal ²	22,55	7,22	3,28	3,27	3,14	3,01	3,09	4,26	2,57	3,70	2,16	2,92	3,86	4,87	5,56	6,44	2,99	3,24
2-decenal (E) ²	24,53	1,75	0,32	-	-	-	0,93	0,93	0,28	1,14	0,51	-	0,46	1,24	0,83	0,98	0,26	0,36
1-decanol ²	24,91	-	-	-	-	-	0,37	-	2,91	-	-	-	0,64	-	-	-	-	-
Cis-4-decenal ¹	25,37	-	-	-	-	-	-	-	-	0,84	-	-	-	-	-	-	-	-
2-undecanone ¹	25,65	-	-	-	-	-	-	-	1,94	3,62	-	-	-	-	-	-	-	-
Trans-2-nonenal ²	27,98	1,58	-	-	-	-	1,00	-	-	1,03	-	-	1,37	0,93	-	0,76	-	-
n-tetradecane ²	29,14	4,53	3,89	3,17	3,56	3,88	2,94	3,65	2,56	3,76	2,13	2,54	3,52	3,07	3,65	4,34	2,91	3,12
Lauryl alcohol ¹	31,47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,04
Pentadecane ²	32,24	1,34	1,13	0,86	0,74	1,02	0,57	2,42	0,62	0,86	0,42	0,62	0,92	1,11	0,78	0,90	0,63	0,80
n-eicosane ²	35,00	2,18	-	0,62	-	-	-	0,89	-	0,65	0,47	0,23	-	0,36	-	-	-	-
1-undecene ²	33,91	-	-	-	-	-	-	-	-	0,55	-	0,28	0,65	-	-	-	-	0,64
n-hexadecane ²	34,07	2,43	2,24	2,17	2,42	2,88	1,92	1,14	1,54	1,99	1,87	1,53	2,00	2,45	-	2,08	1,32	1,57
n-octadecane ²	35,65	-	-	1,00	-	-	-	-	0,70	1,5	1,64	-	0,76	1,60	-	-	-	0,98
n-tetracosane ²	35,00	-	-	0,37	0,55	0,88	-	6,68	-	-	-	-	-	-	-	0,40	0,38	0,62
Ethyl oleate ¹	37,67	-	-	-	-	-	-	-	-	2,77	-	-	-	-	-	-	-	0,86

Πίνακας 4.13. Πτητικοί μεταβολίτες και ποσοτική εκτίμηση τους (εμβαδόν X 10⁻⁶ της κάθε κορυφής) από τη δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων μετά από ενοφθαλμισμό σε στείρα μοντέλα υποστρώματα FJA (Fish Juice Agar) κατά τη συντήρησή τους (σε ημέρες) υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP στους 0, 5 και 15°C.

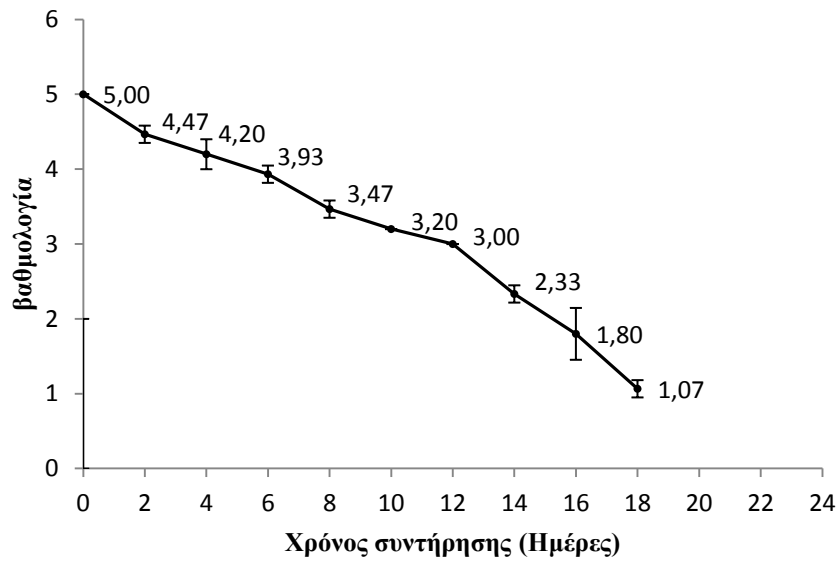
	Air (εμβαδόν X 10 ⁻⁶)									MAP (εμβαδόν X 10 ⁻⁶)								
	0°C			5°C			15°C			0°C			5°C			15°C		
	R.T.	0	4	8	12	14	4	5	1	2	8	16	18	4	6	8	1	2
3-methyl-1-butanol ^{1,3}	2,69	0,59	7,56	13,78	16,8	18,4	16,7	11,23	4,49	3,45	9,88	11,82	4,83	7,91	5,47	1,45	9,13	8,67
2- methyl-1-butanol ^{1,3}	2,80	-	5,43	6,59	6,00	6,11	8,23	4,89	4,02	5,13	8,96	9,68	9,00	7,27	3,22	-	4,22	4,65
Butylalcohol ^{2,3}	2,81	1,10	-	-	-	-	-	-	3,13	4,85	-	-	7,56	-	1,87	2,54	-	-
3-hydroxy-1-butanone ^{1,3,4}	3,54	-	-	4,50	3,20	4,87	9,74	15,6	6,12	9,13	9,40	9,78	9,89	11,43	13,89	17,36	8,88	9,72
Isoamyl alcohol ^{1,3}	4,08	-	0,31	8,82	8,32	8,27	4,63	2,92	3,64	3,03	6,88	8,08	8,15	3,66	-	2,87	1,79	1,56
Hexenal ²	6,12	0,28	2,65	1,15	0,44	-	0,40	-	-	-	-	-	-	-	-	0,53	-	-
1-hexanol ^{2,3}	9,01	-	0,71	1,46	-	-	1,28	1,90	0,44	0,83	3,06	-	0,65	0,49	0,54	0,66	1,00	1,05
Isoamyl acetate ^{1,3}	9,33	-	-	1,14	-	-	0,43	0,18	0,22	0,24	1,26	0,34	0,22	-	-	0,39	-	0,88
Heptanal ²	10,30	0,11	1,18	0,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,52	-	-
2-octanone ²	11,94	0,25	0,96	1,13	-	-	1,09	0,35	-	-	0,91	0,92	-	0,59	0,47	0,39	0,97	0,86
Heptyl alcohol ^{2,3}	13,34	-	0,55	1,23	-	-	0,67	0,51	0,16	0,23	2,73	2,76	0,35	0,27	0,31	0,37	0,52	0,53
6-methyl-5-hepten-2-one ^{2,3}	14,01	0,42	1,64	1,75	-	-	0,58	0,67	0,63	0,82	0,76	-	-	1,09	-	-	-	-
2-ethyl-1-hexanol ^{1,2,3}	15,74	12,5	37,47	47,13	52,09	64,78	12,84	16,11	18,97	22,7	24,00	33,6	76,02	38,8	44,23	50,78	139,86	147,54
Nonanoic acid ^{1,3}	16,09	-	-	-	-	-	-	-	0,23	0,26	-	-	0,59	-	-	-	-	-
Trans-2-octenal ^{2,3}	17,47	0,41	2,40	-	-	-	1,87	1,99	1,56	1,65	0,62	1,55	1,99	1,00	1,56	2,08	-	-
Acetophenone ²	17,16	-	-	-	-	-	-	-	-	0,36	9,42	4,04	0,68	0,39	0,39	0,35	-	-
1-octanol ²	17,47	-	3,08	3,63	-	-	-	1,20	1,12	1,15	-	-	2,35	1,00	-	-	-	2,11
Linanol ¹	18,56	-	-	-	-	-	-	-	0,31	0,34	-	-	-	-	-	-	-	0,32
Nonanal ^{2,3}	18,73	0,14	5,58	3,12	2,67	2,07	0,67	0,98	1,09	1,17	1,13	1,32	1,83	1,41	2,34	3,11	1,09	1,17
Nonanol ^{2,3}	21,30	-	1,79	11,2	-	-	1,91	2,76	1,86	2,08	24,0	2,44	1,93	2,03	3,26	4,16	1,08	1,19
n-undecane ²	25,82	-	-	0,71	0,39	-	0,28	-	-	0,52	-	-	-	-	-	-	-	-
n-dodecane ²	25,83	-	0,90	0,68	0,23	-	0,17	-	-	0,23	-	-	1,98	-	-	0,15	-	-

n-decanal ^{2,3}	22,54	0,64	1,95	1,08	0,90	-	0,31	0,49	0,79	0,81	0,87	0,97	1,22	1,01	1,94	2,77	0,32	0,39
n-butyl-2-methylbutyrate ¹	23,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,35	-	-	-	-	-
n-tetradecane ^{2,3}	29,12	-	1,07	0,69	0,35	-	0,25	0,17	0,44	0,31	0,47	0,47	0,49	0,20	-	-	0,31	0,27
Pentadecane ²	35,0	-	0,92	0,64	0,24	-	0,18	-	0,33	0,27	0,43	0,40	0,29	0,16	-	-	-	0,29
n-eicosane ²	28,65	-	-	0,46	-	-	0,45	0,19	-	-	-	0,56	0,22	-	-	0,21	-	1,00
Heptyl butyrate ²	28,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	-	0,86
Lauryl alcohol ¹	31,44	-	-	-	-	-	-	-	0,52	0,55	-	-	-	-	-	-	-	-
n-hexadecane ^{2,3}	35,00	0,05	1,58	0,86	-	-	-	-	-	0,59	0,31	0,54	0,76	0,22	0,87	1,63	0,45	0,48
n-tetracosane ²	35,03	0,09	0,59	0,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,57	0,48	0,41	-	-

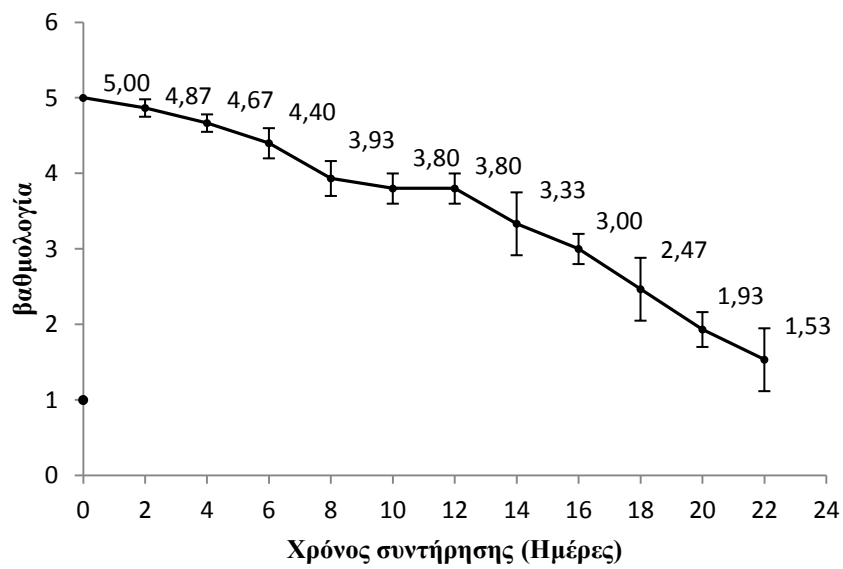
¹ ουσίες που παράχθηκαν μόνο στα ενοφθαλμισμένα μοντέλα

² ουσίες που παράχθηκαν στους μάρτυρες αλλά και στα ενοφθαλμισμένα μοντέλα

³ ουσίες που αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της συντήρησης

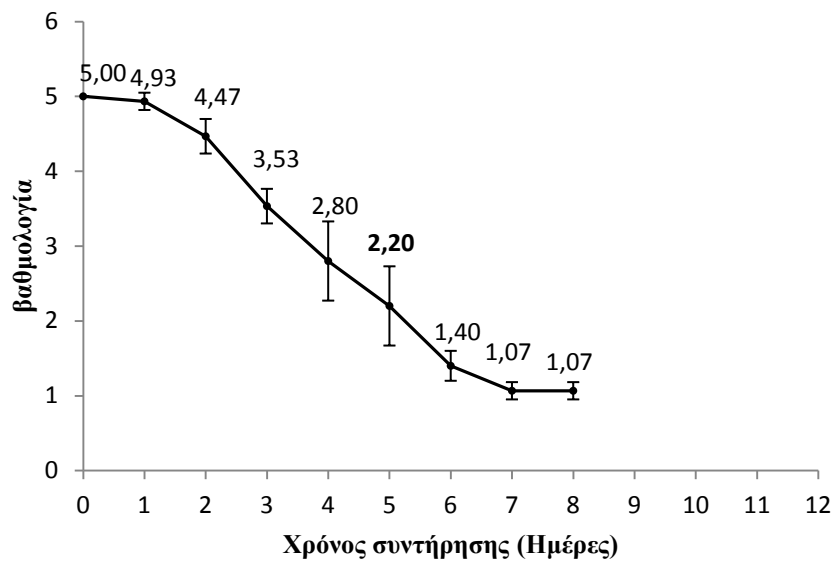


(α)

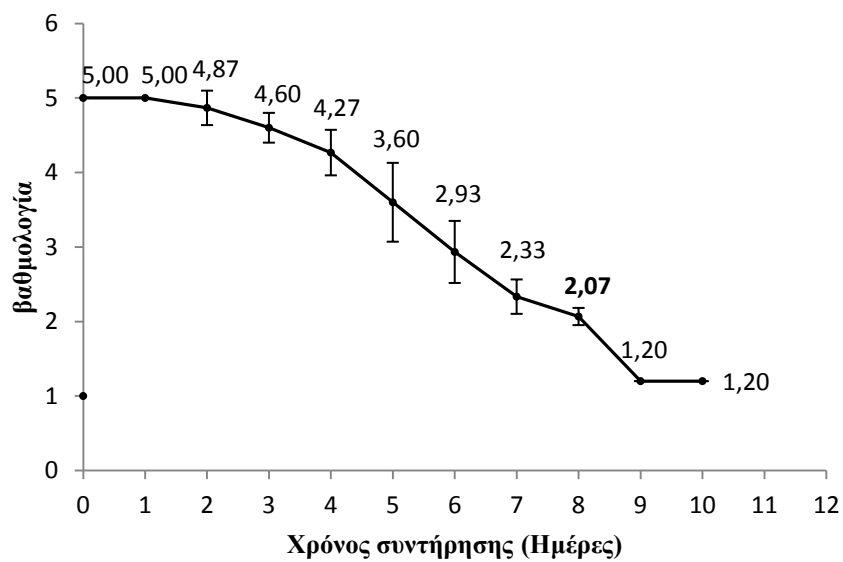


(β)

Σχήμα 4.1. Μεταβολές στη γενική εμφάνιση των φιλέτων κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό συνθήκες αέρα (α) και MAP (β) στους 0 °C.

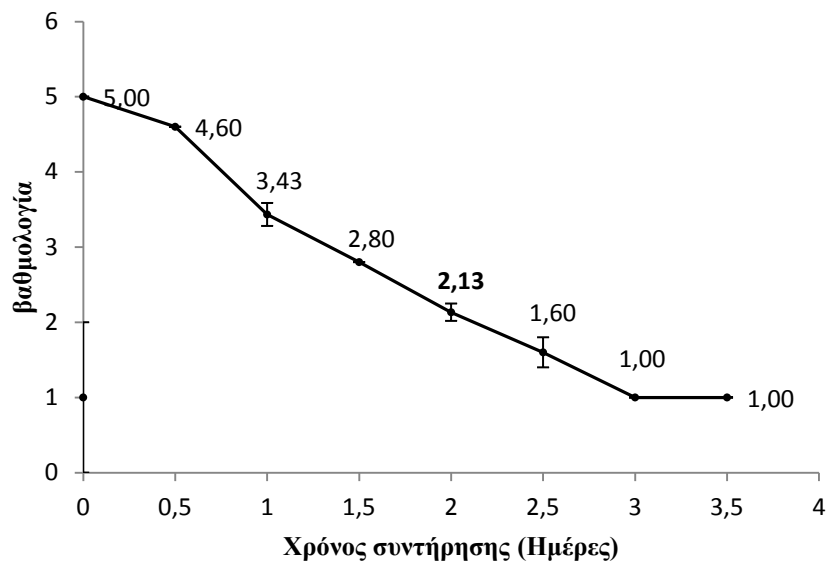


(α)

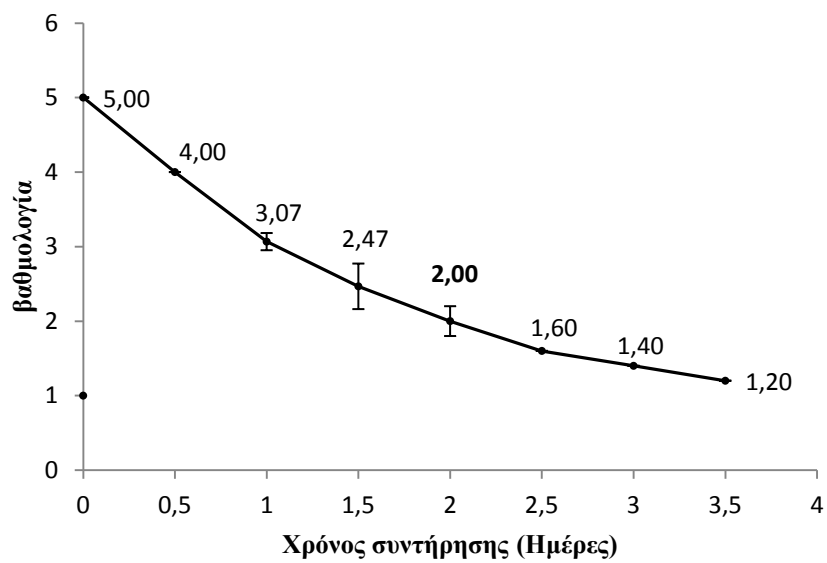


(β)

Σχήμα 4.2. Μεταβολές στη γενική εμφάνιση των φιλέτων κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό συνθήκες αέρα (α) και MAP (β) στους 5°C.

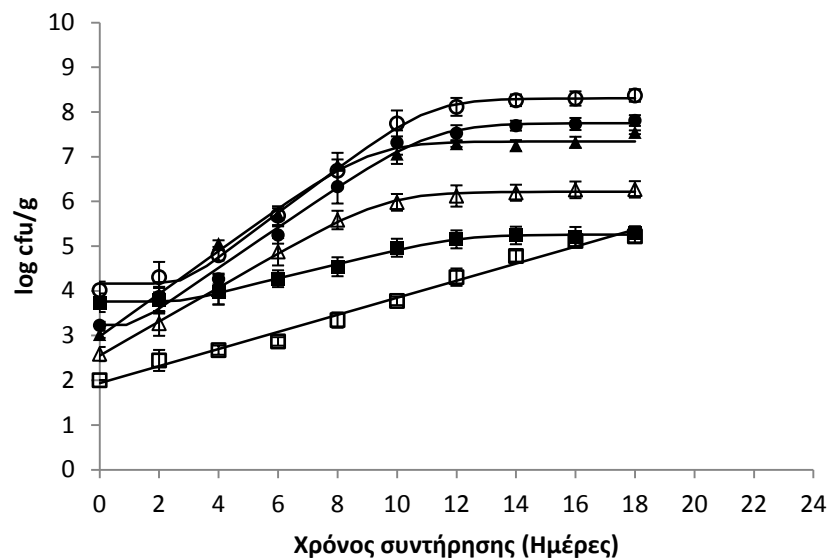


(α)

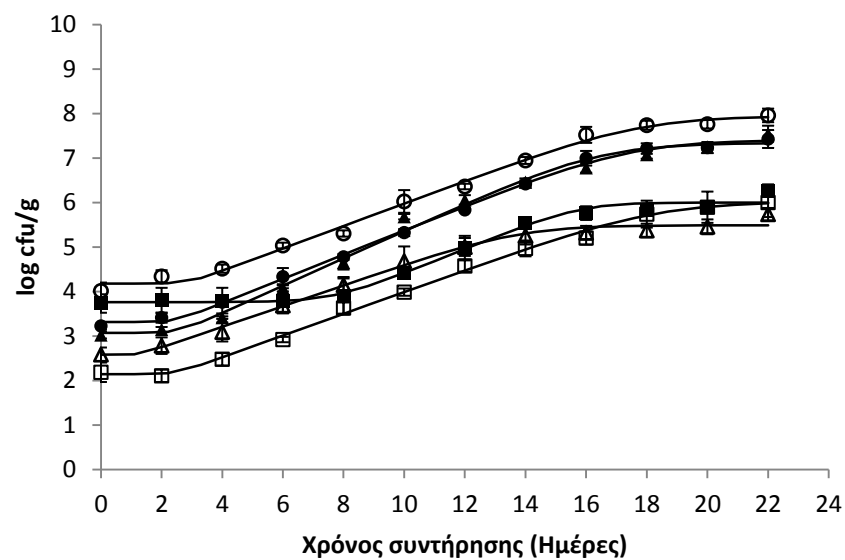


(β)

Σχήμα 4.3. Μεταβολές στη γενική εμφάνιση των φιλέτων κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό συνθήκες αέρα (α) και MAP (β) στους 15°C.

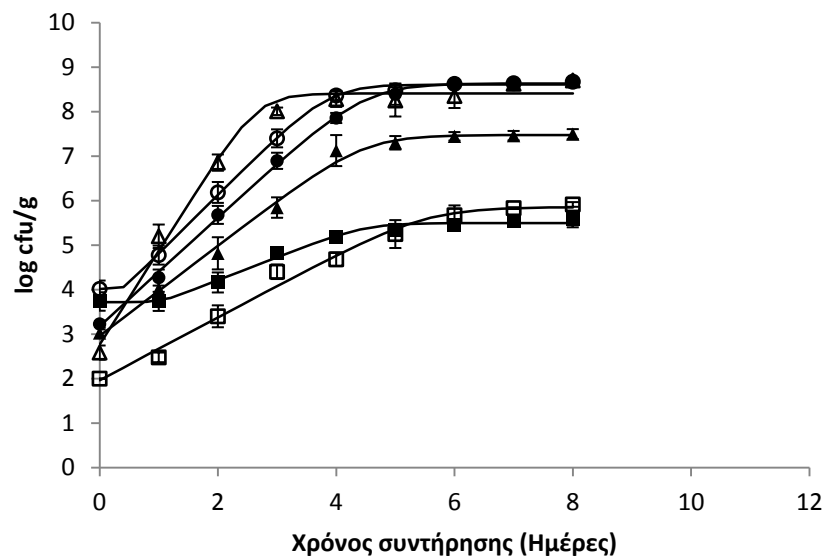


(α)

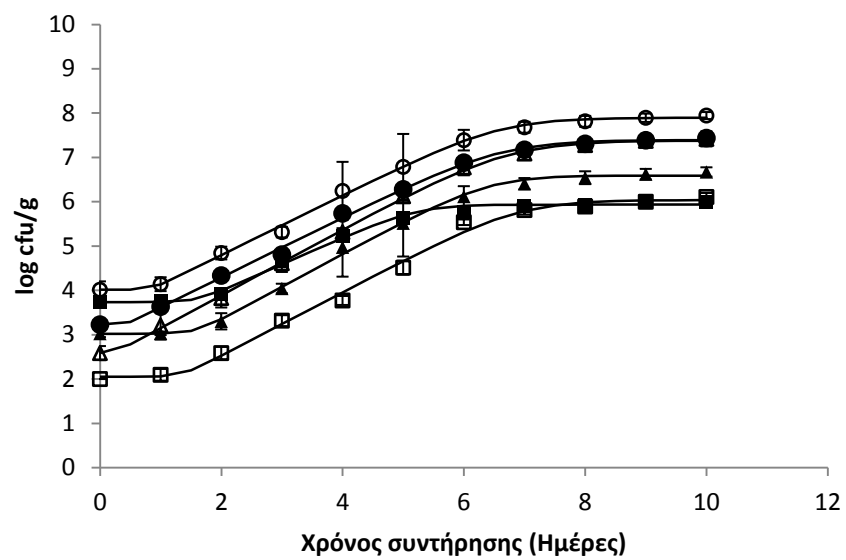


(β)

Σχήμα 4.4. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε MAP (β) στους 0°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στους μέσους όρους 4 επαναλήψεων (2X2) που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι καμπύλες προσαρμογή με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi (Baranyi & Roberts 1994). Ολικός μικροβιακός πληθυσμός (○), *Pseudomonas* spp. (●), βακτήρια που παράγουν H₂S (▲), *Brochothrix thermosphacta* (□), οξυγαλακτικά βακτήρια (■) και Enterobacteriaceae (★).

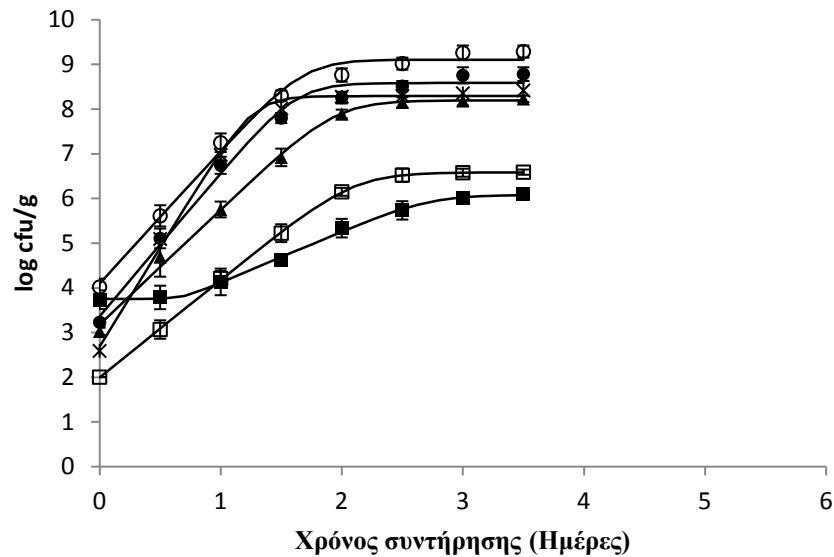


(α)

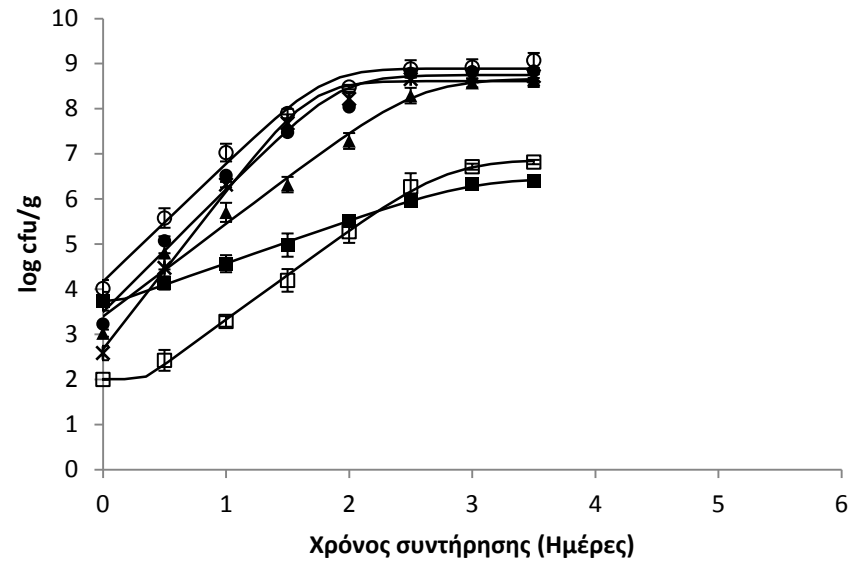


(β)

Σχήμα 4.5. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε MAP (β) στους 5°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στα δεδομένα που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι καμπύλες στην προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi (Baranyi and Roberts 1994). Ολικός μικροβιακός πληθυσμός (○), *Pseudomonas* spp. (●), βακτήρια που παράγουν H₂S (▲), *Brochothrix thermosphacta* (□), οξυγαλακτικά βακτήρια (■) και Enterobacteriaceae (★).

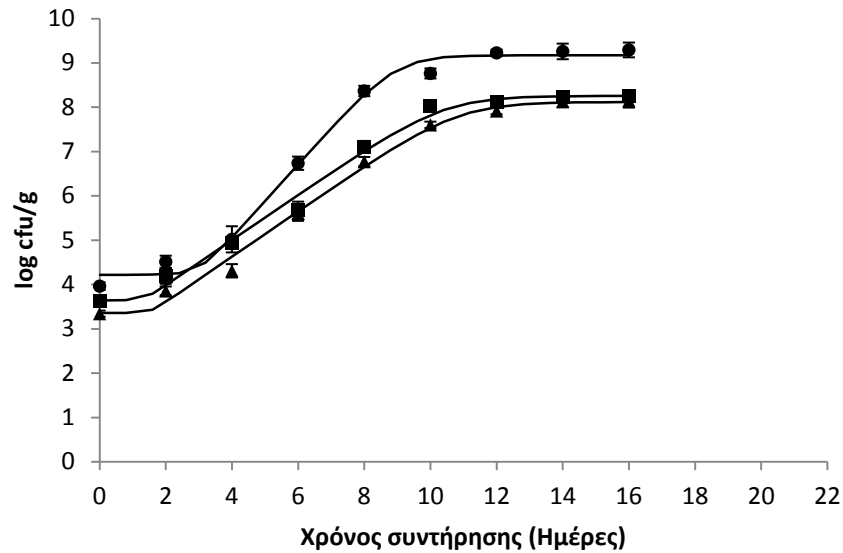


(α)

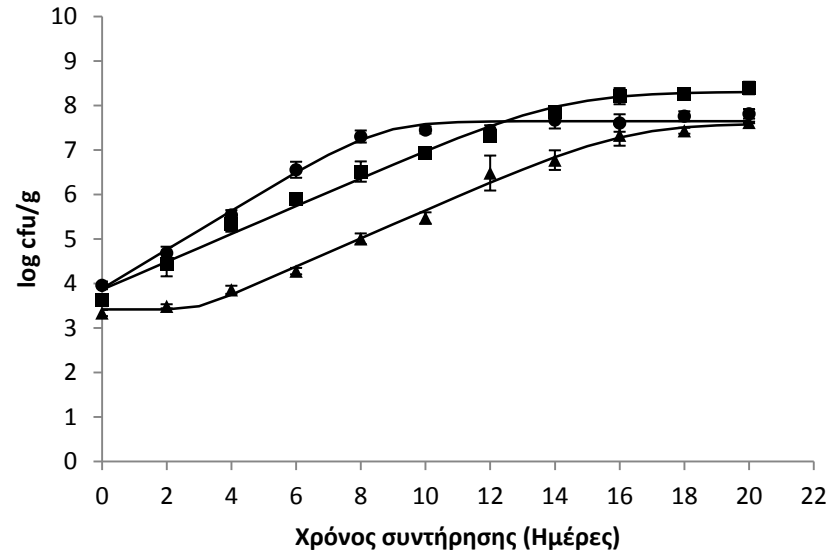


(β)

Σχήμα 4.6. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (β) στους 15°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στα δεδομένα που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι καμπύλες στην προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994). Ολικός μικροβιακός πληθυσμός (○), *Pseudomonas* spp. (●), βακτήρια που παράγουν H₂S (▲), *Brochothrix thermosphacta* (□), οξυγαλακτικά βακτήρια (■) και Enterobacteriaceae (★).

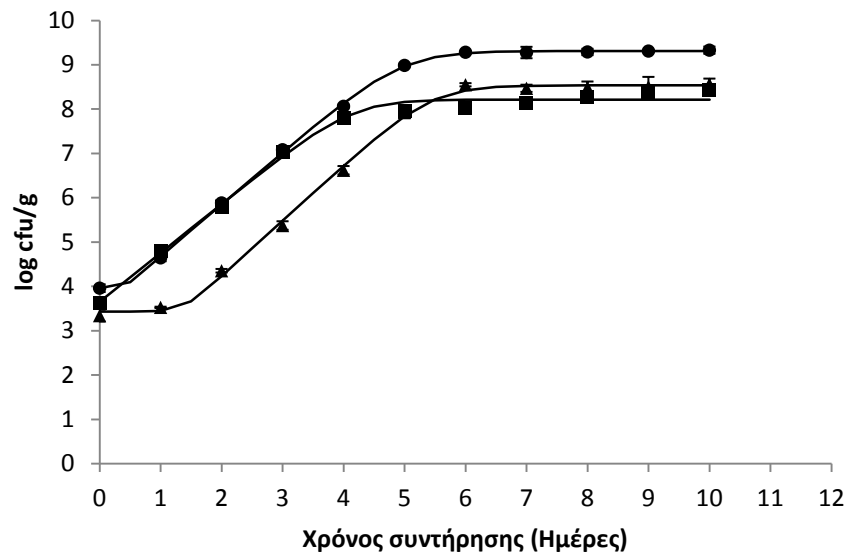


(α)

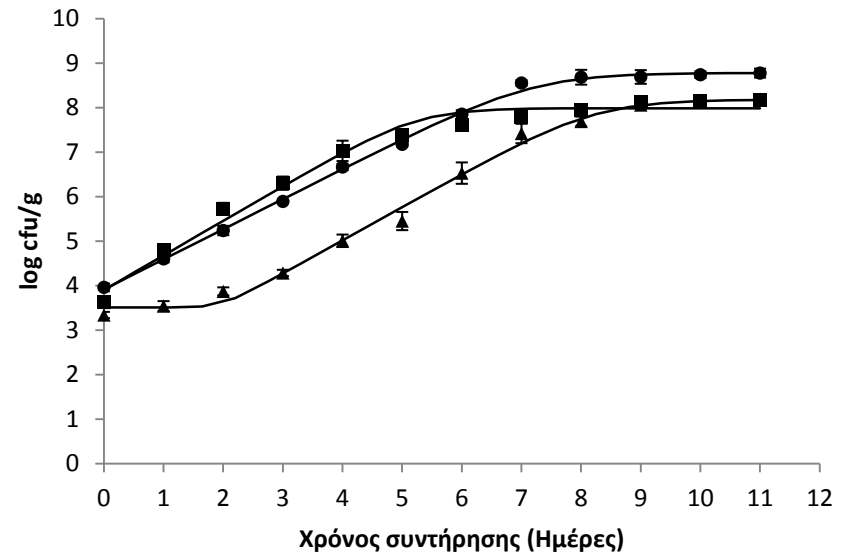


(β)

Σχήμα 4.7. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε MAP (β) στους 0°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στα δεδομένα που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι καμπύλες στην προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994). *Pseudomonas* spp. (●), *Shewanella* spp. (▲), οξύγαλακτικά βακτήρια (■).

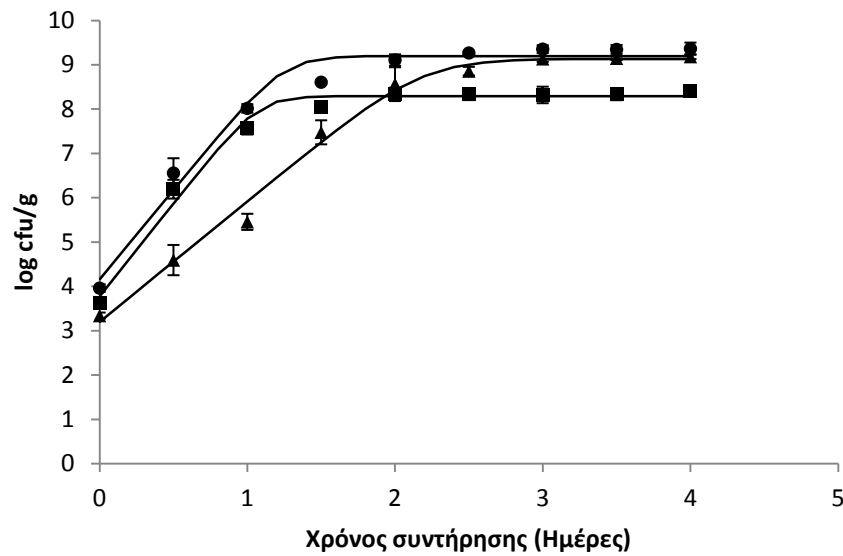


(α)

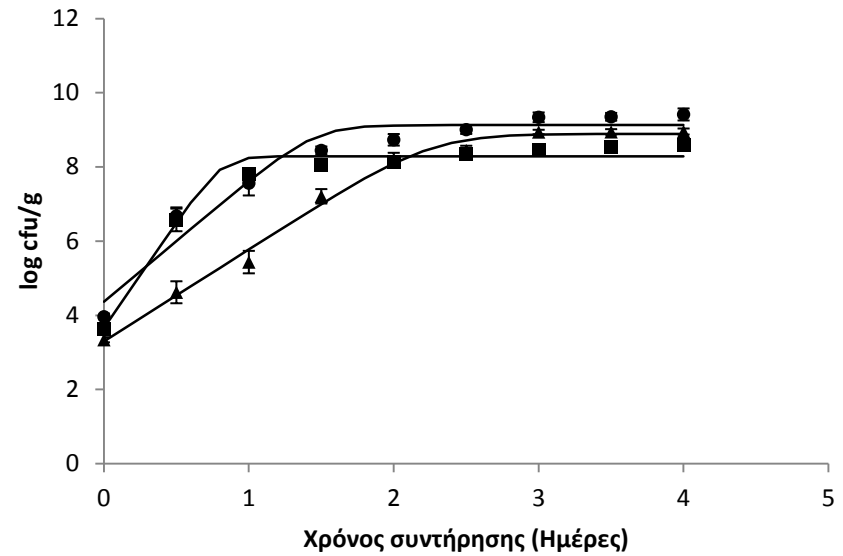


(β)

Σχήμα 4.8. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε MAP (β) στους 5°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στα δεδομένα που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι καμπύλες στην προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994). *Pseudomonas* spp. (●), *Shewanella* spp. (▲), οξυγαλακτικά βακτήρια (■).

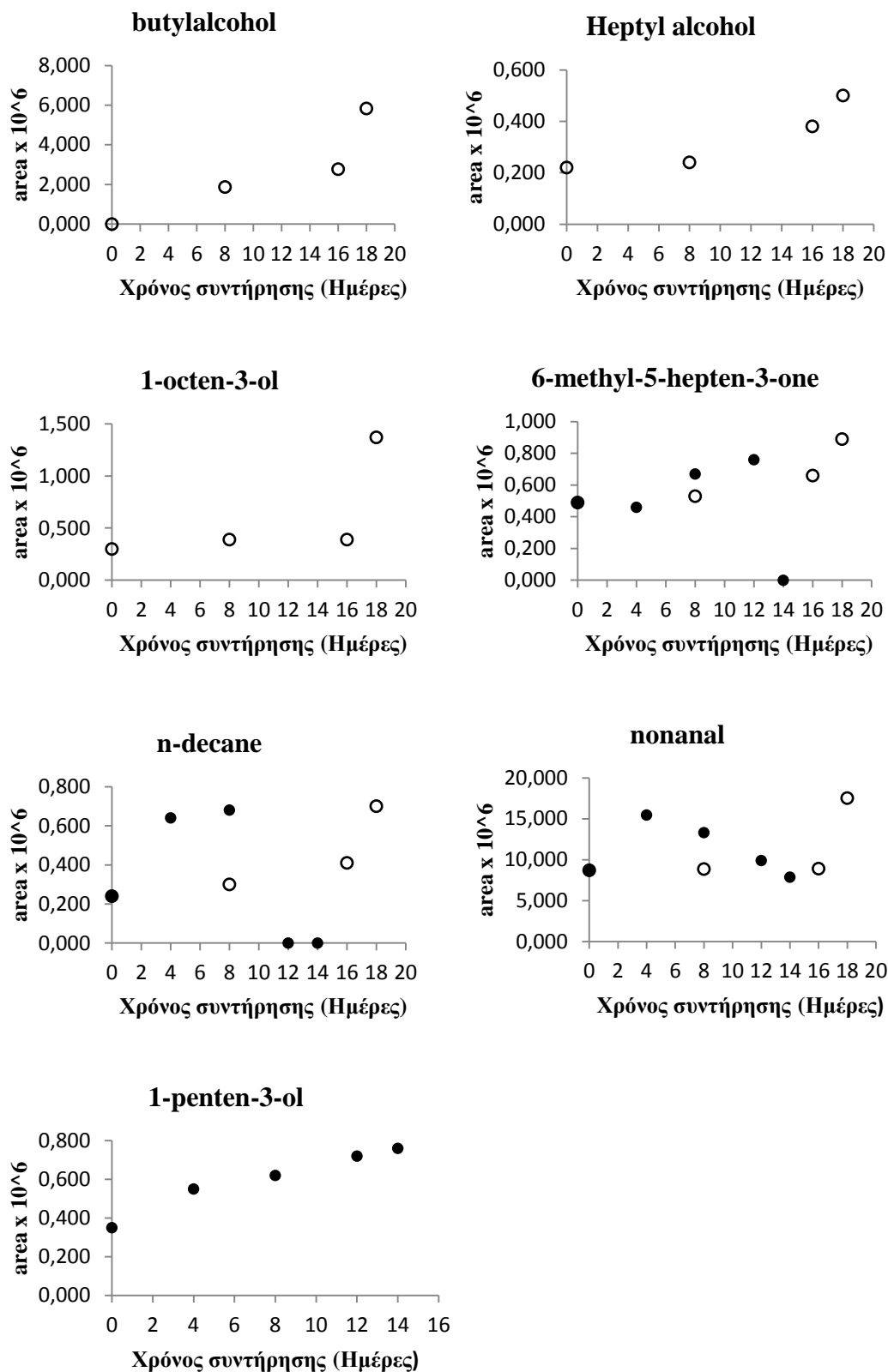


(α)

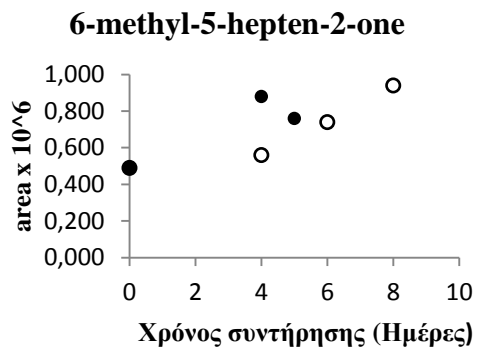
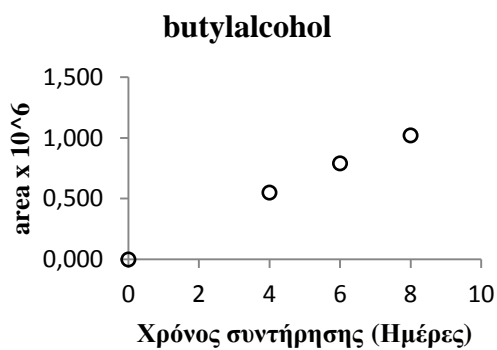
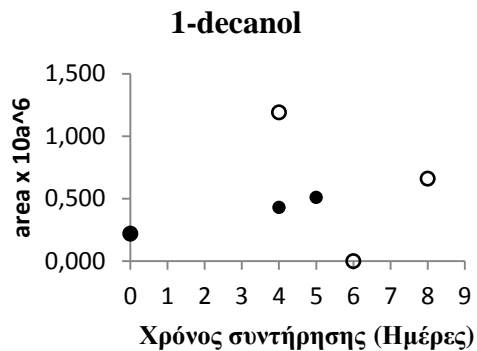
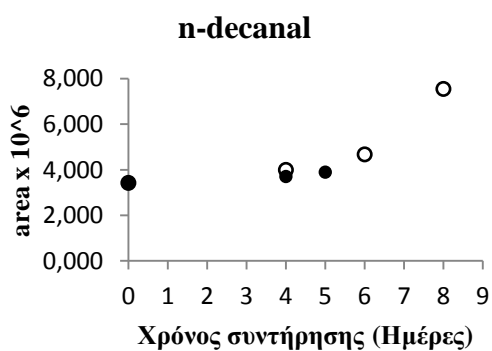
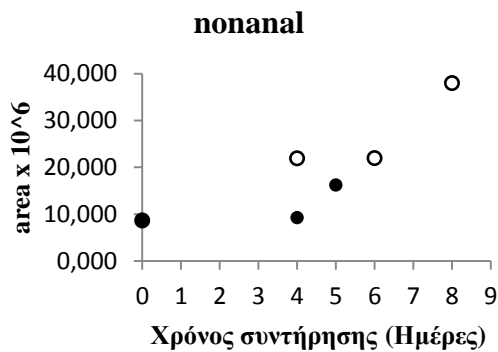
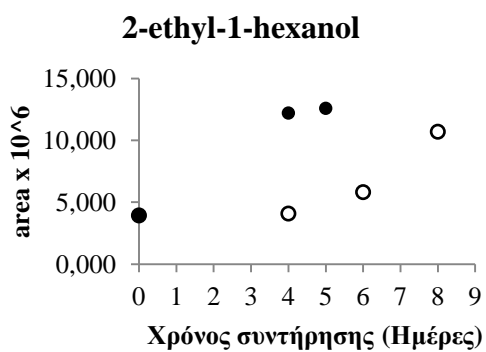
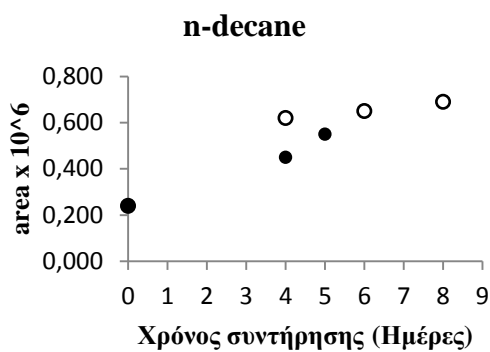
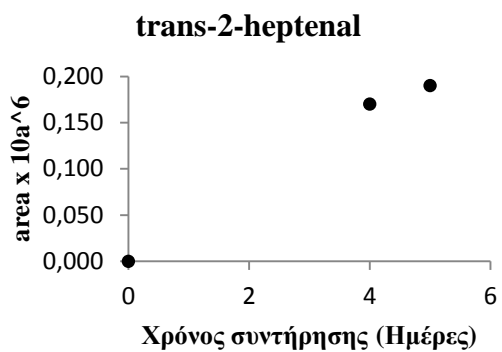


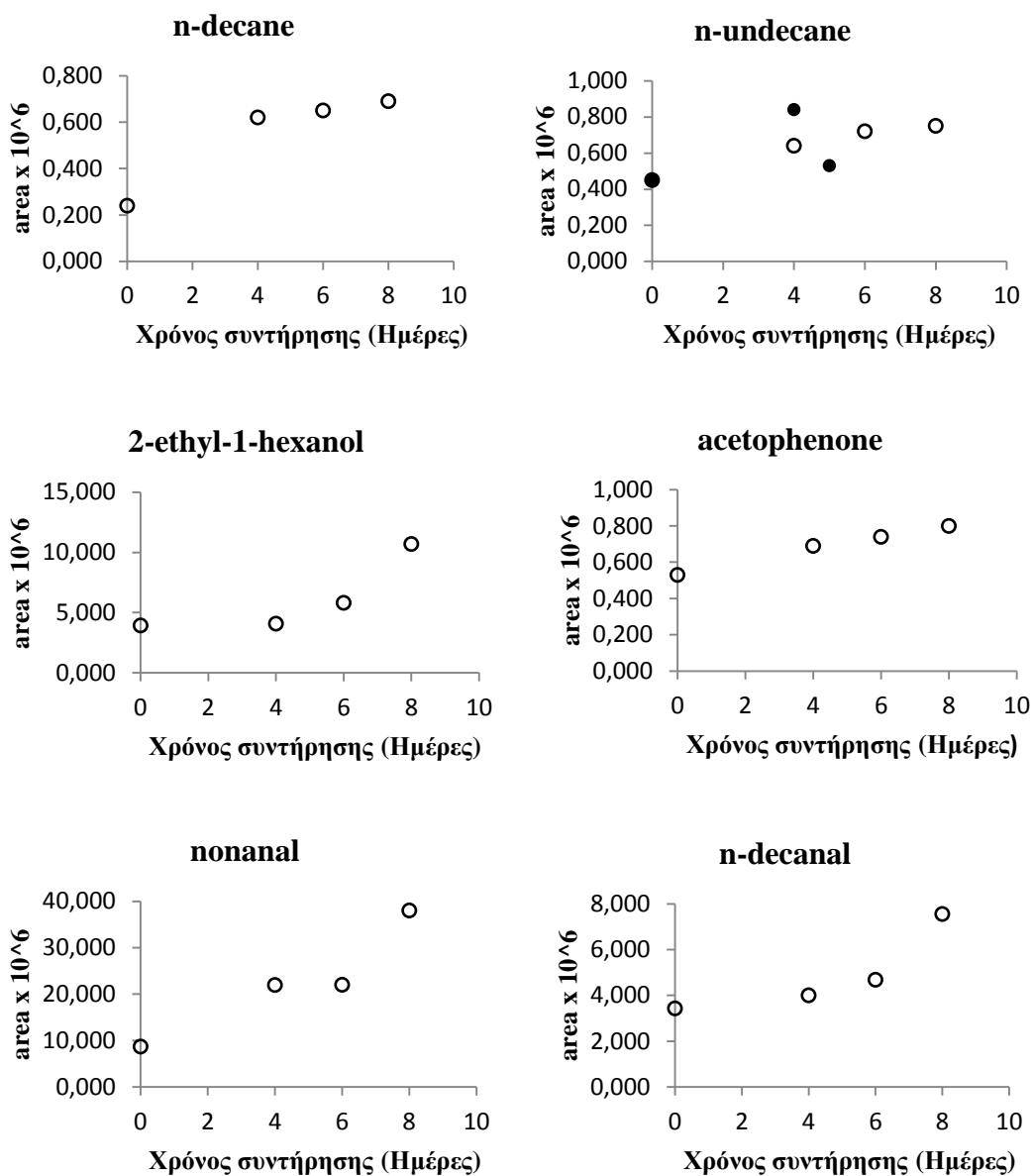
(β)

Σχήμα 4.9. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (β) στους 15°C. Τα σημεία αντιστοιχούν στα δεδομένα που προέκυψαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι καμπύλες στην προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Baranyi (Baranyi & Roberts 1994). *Pseudomonas* spp. (●), *Shewanella* spp. (▲), οξυγαλακτικά βακτήρια (■).

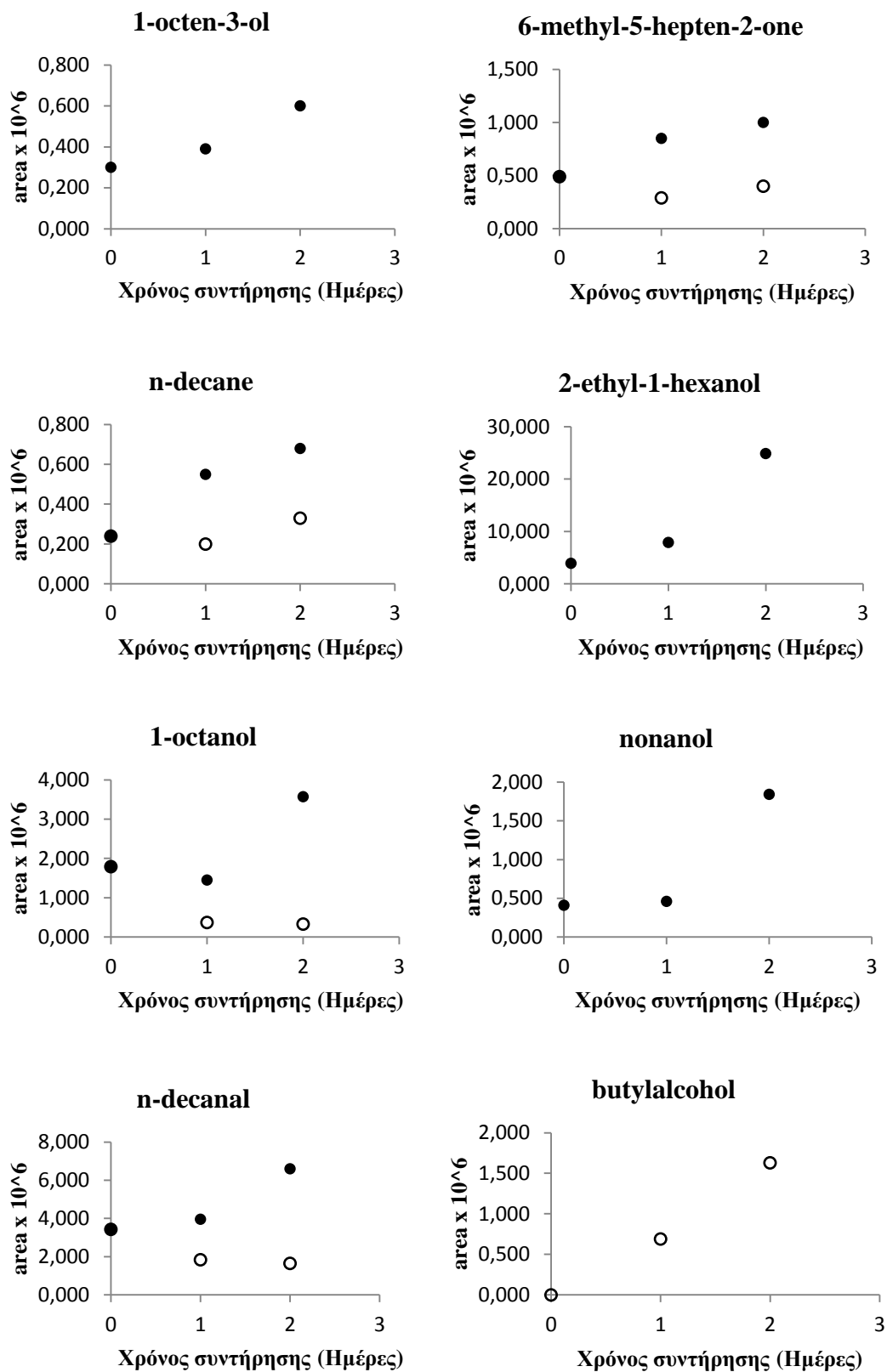


Σχήμα 4.10. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε μάρτυρες μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 0°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (o).

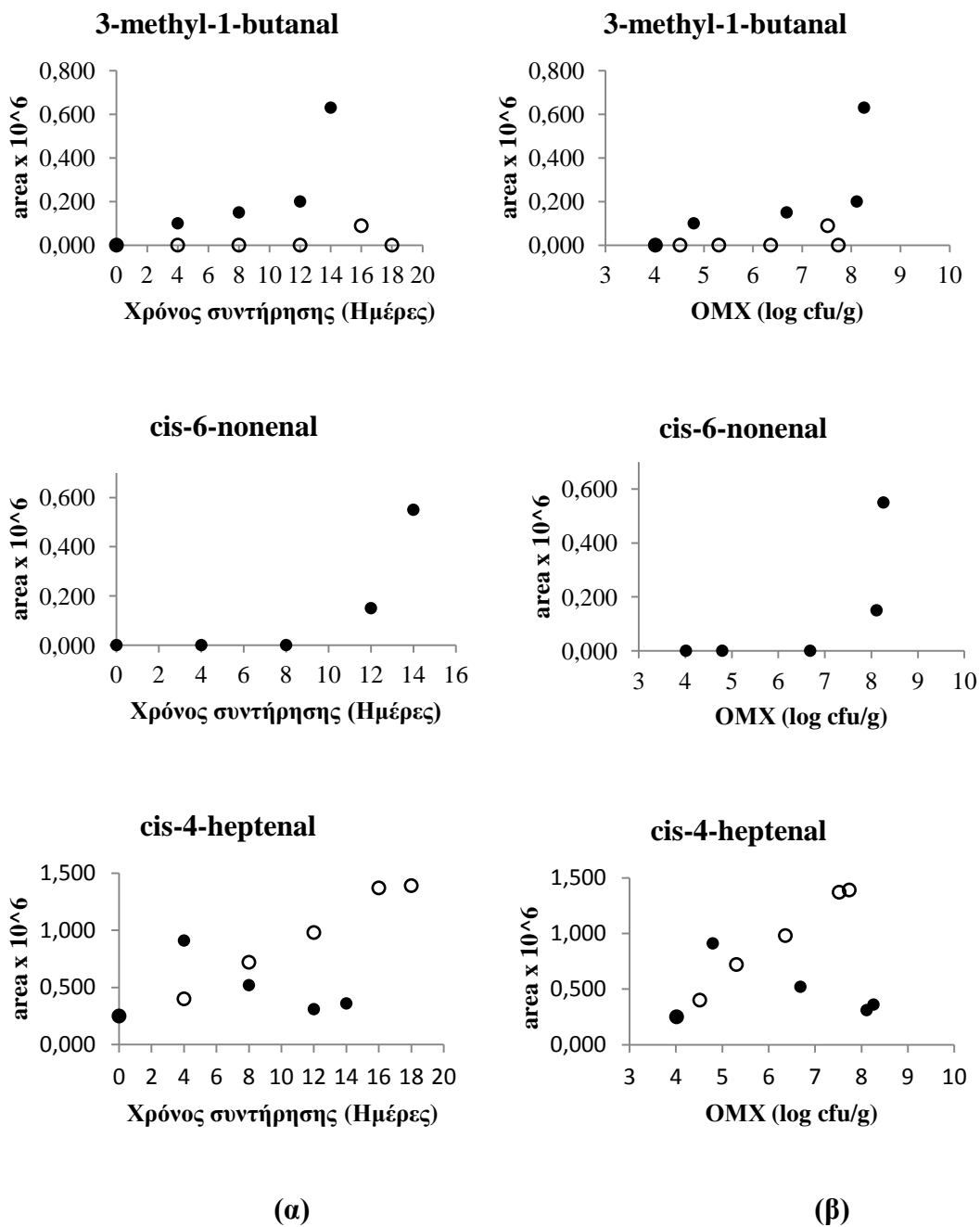




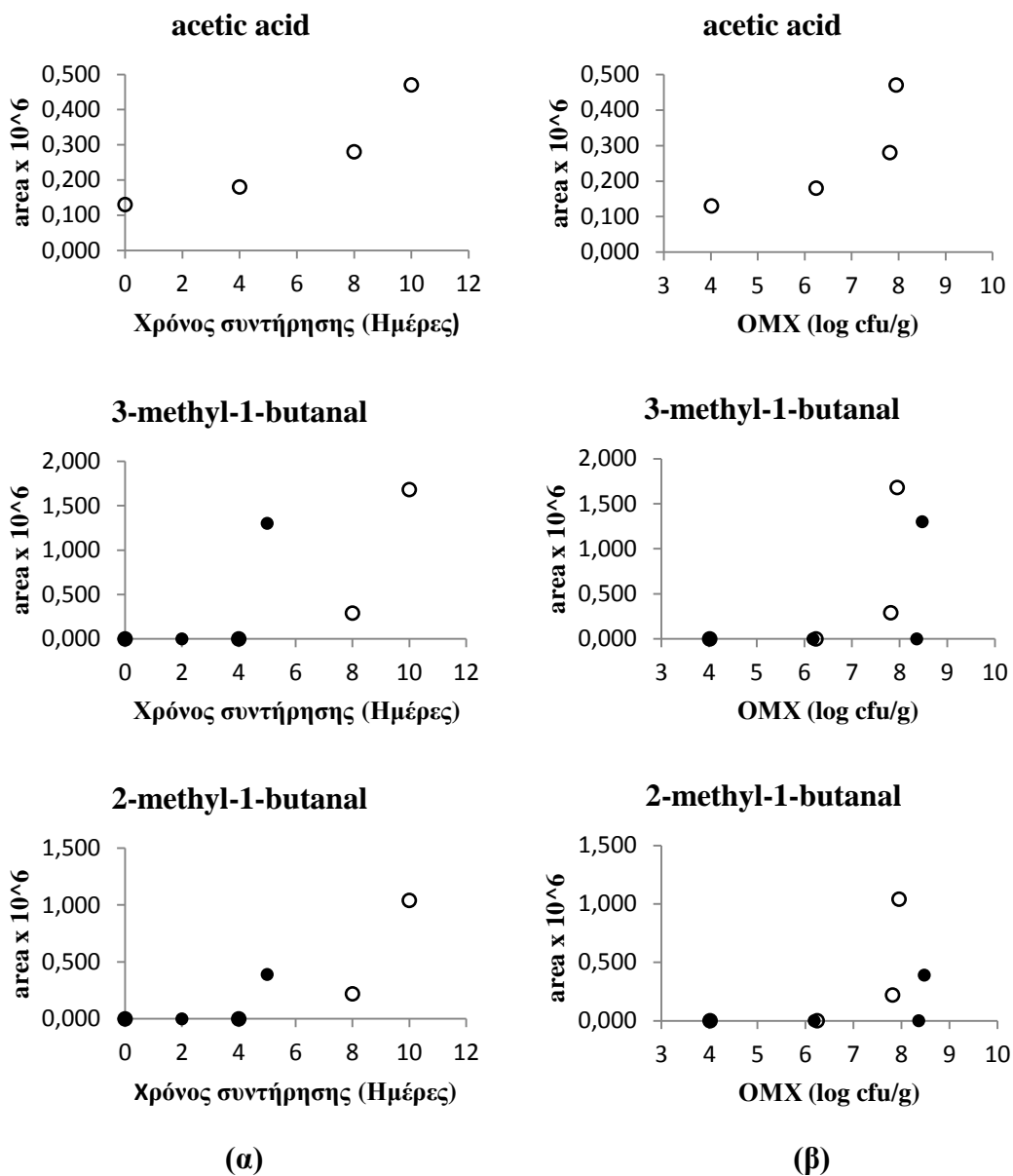
Σχήμα 4.11. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε μάρτυρες μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 5°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (○).



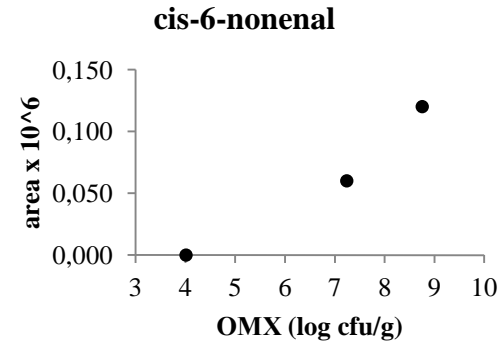
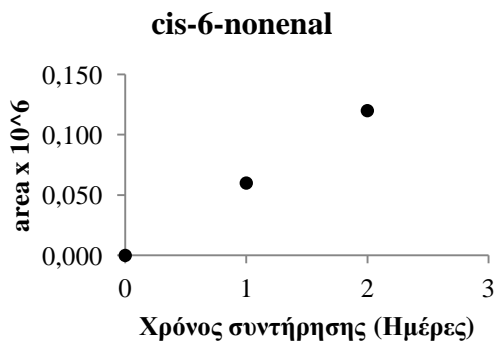
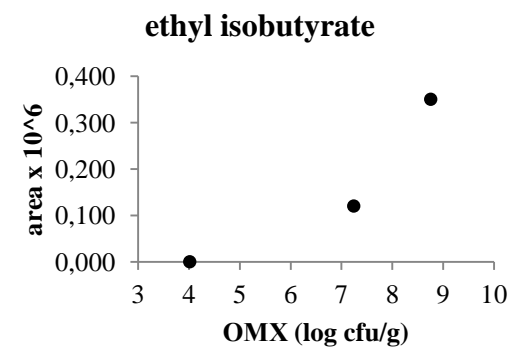
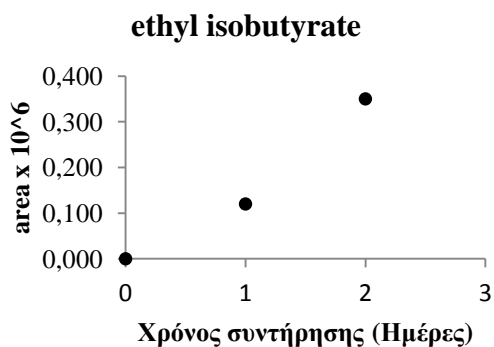
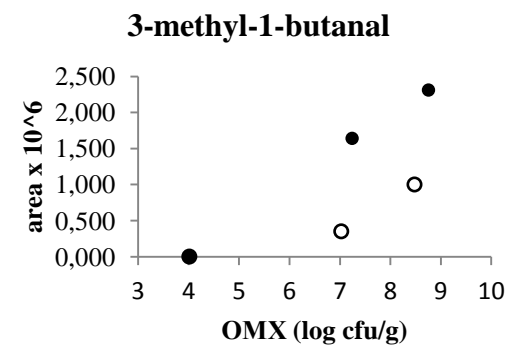
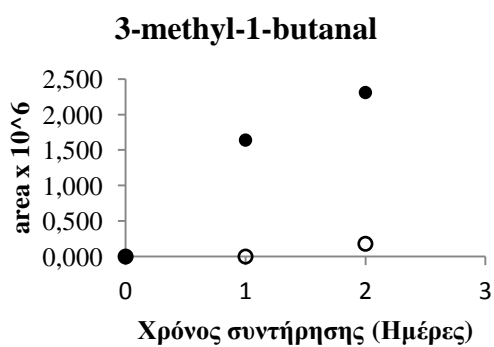
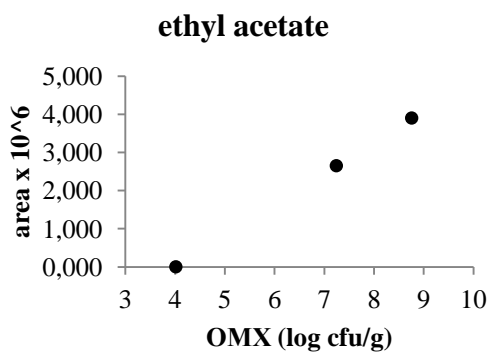
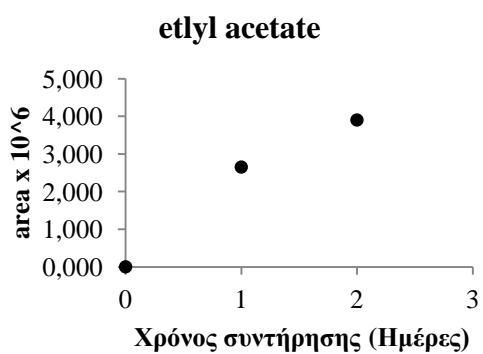
Σχήμα 4.12. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε μάρτυρες μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 15°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (○).

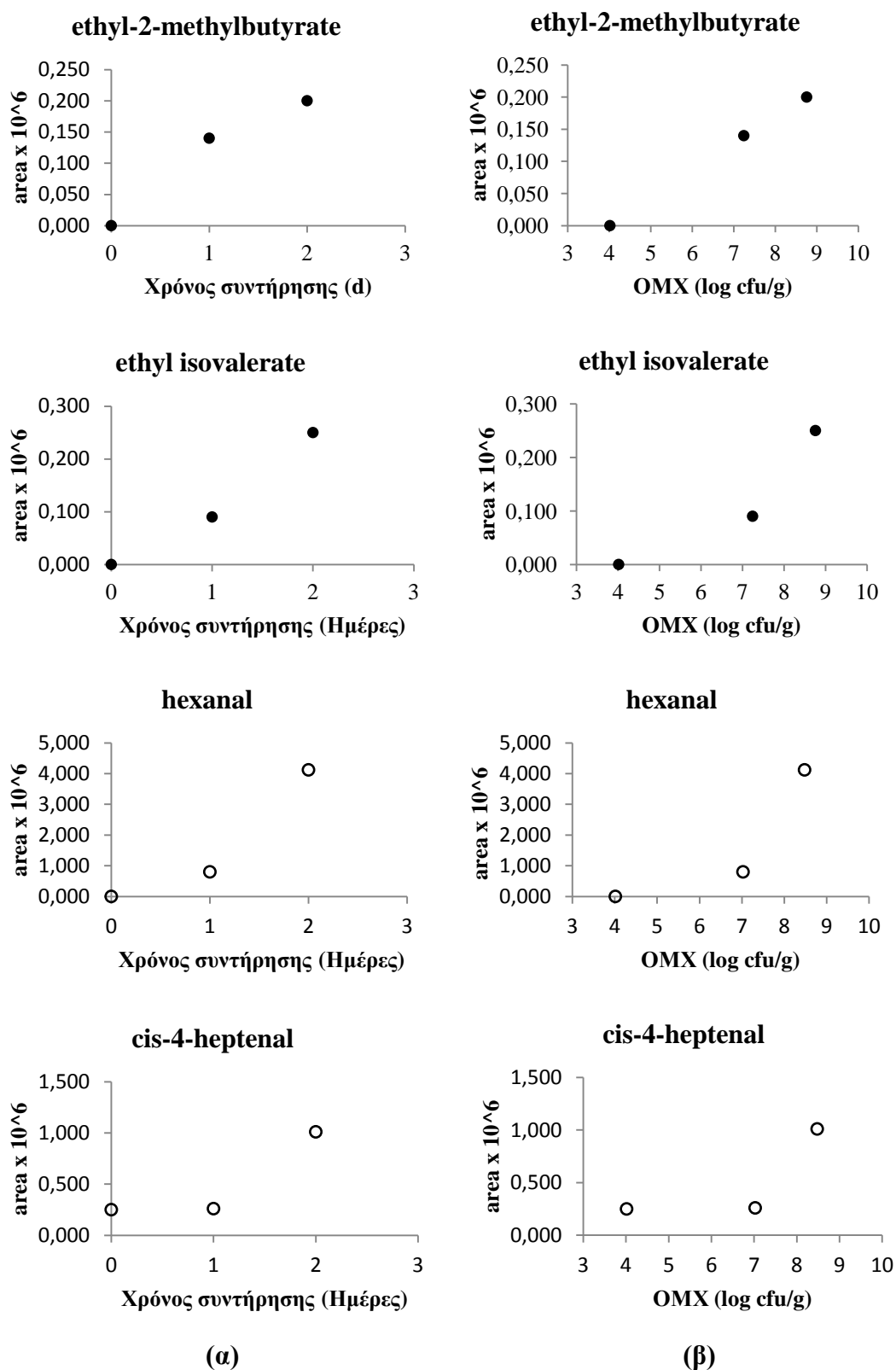


Σχήμα 4.13. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με τον χρόνο αποθήκευσης (α) και τις μεταβολές της OMX (β) στους 0°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (○).

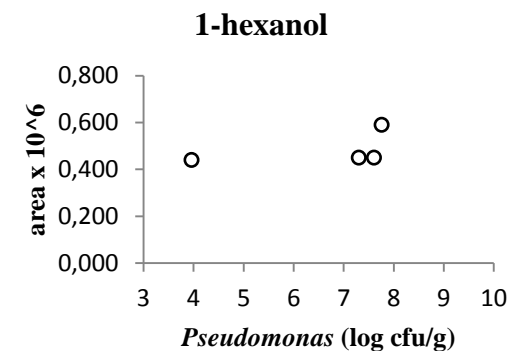
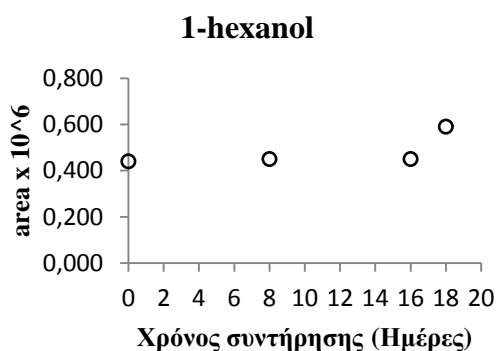
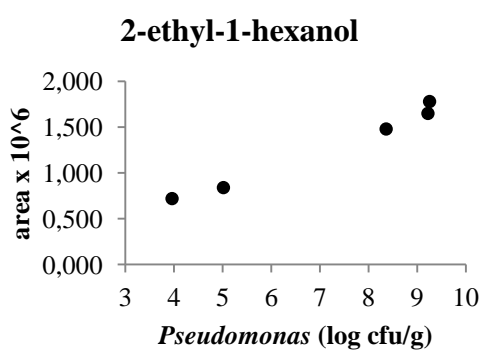
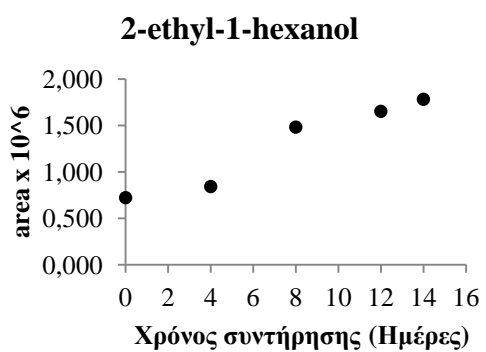
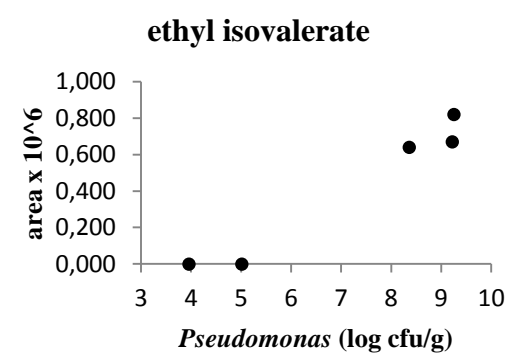
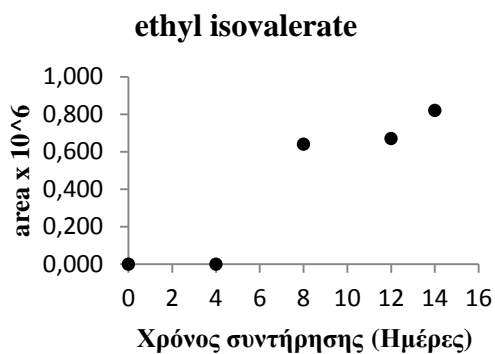
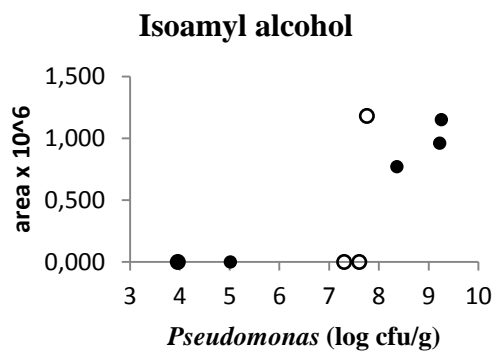
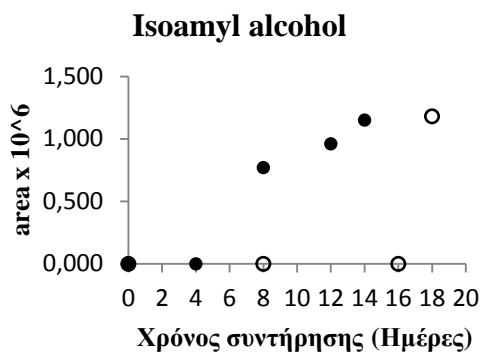


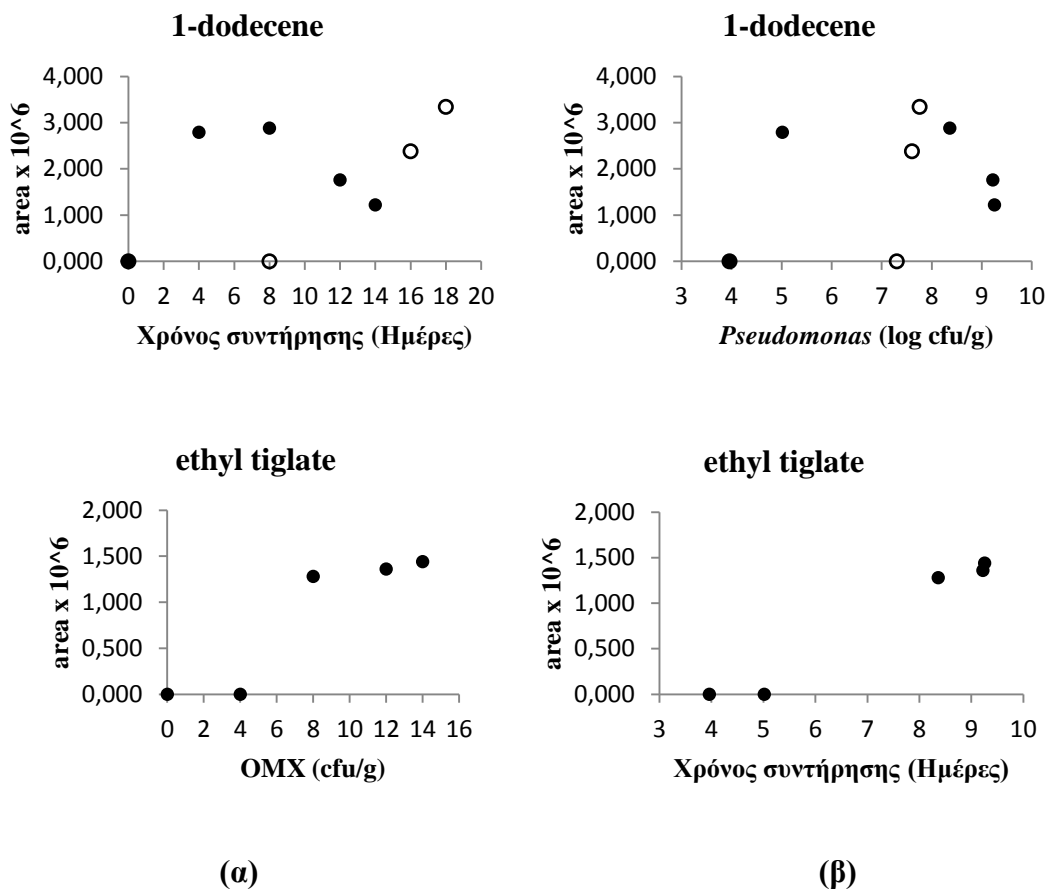
Σχήμα 4.14. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα OMX (β) σε φιλέτα τσιπούρας αποθηκευμένα στους 5°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (○).



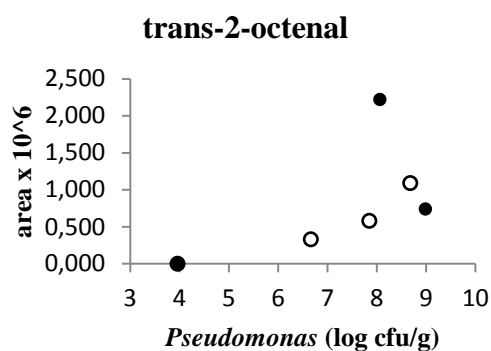
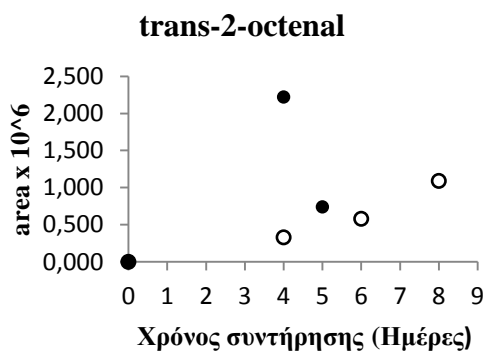
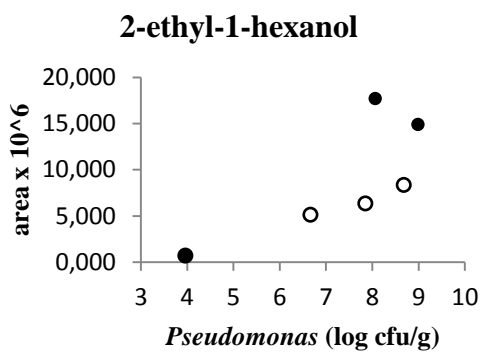
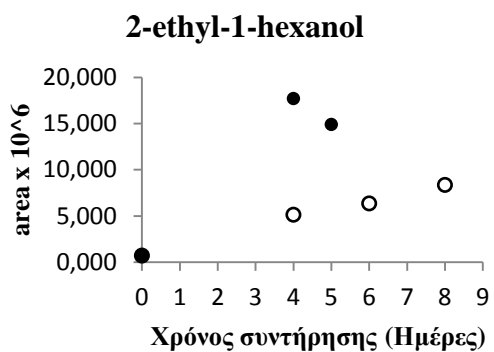
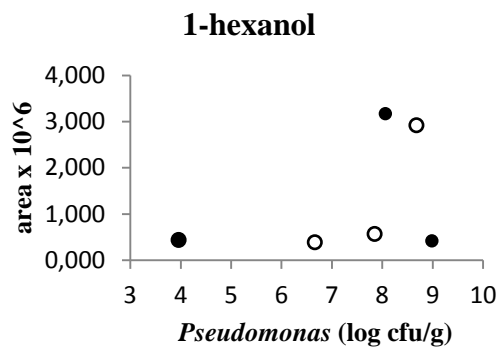
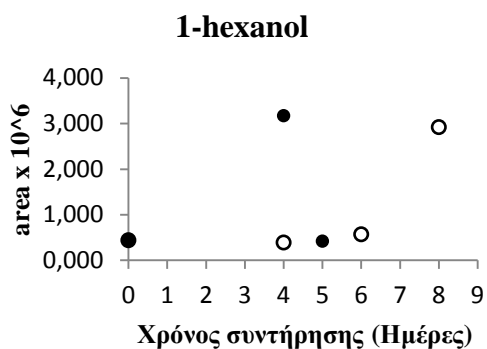
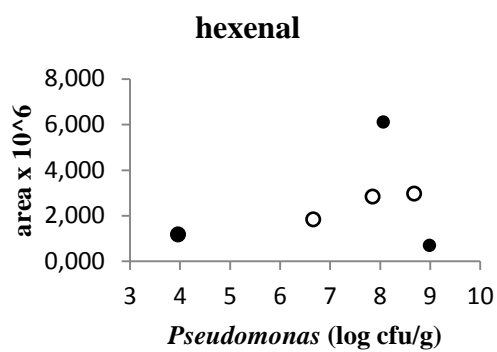
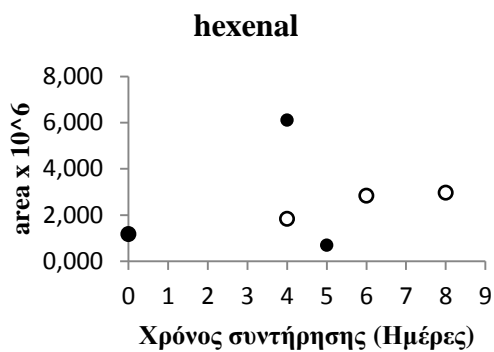


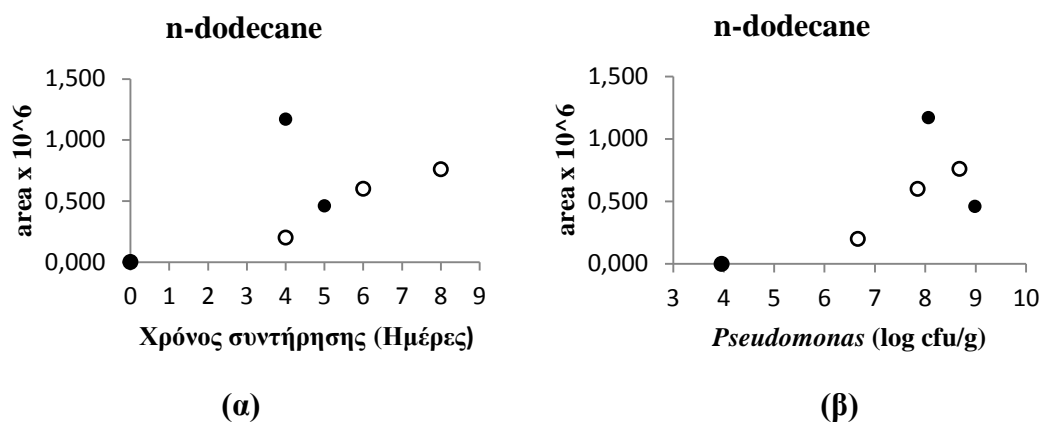
Σχήμα 4.15. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα OMX (β) σε φιλέτα τσιπούρας αποθηκευμένα στους 15°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (○).



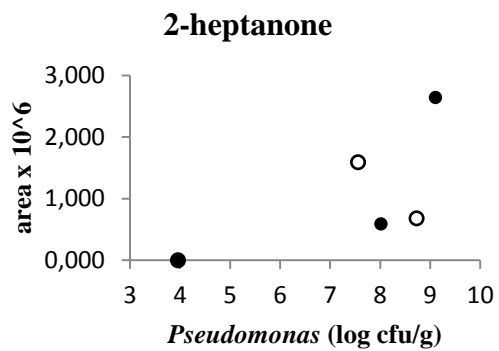
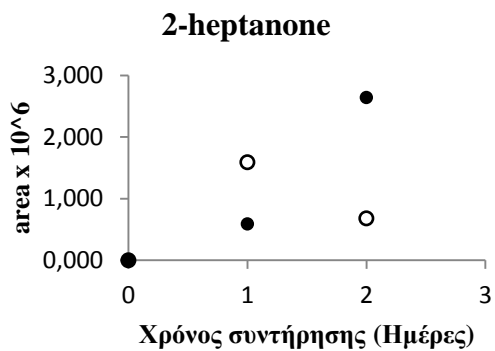
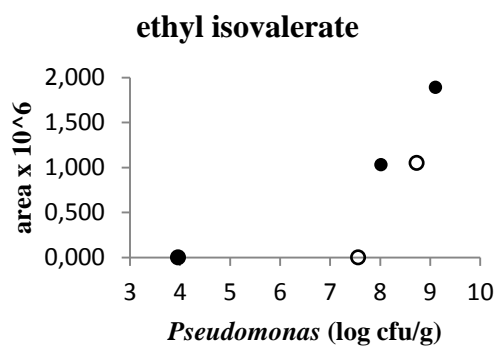
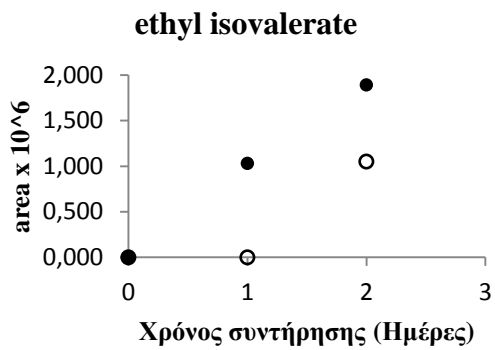
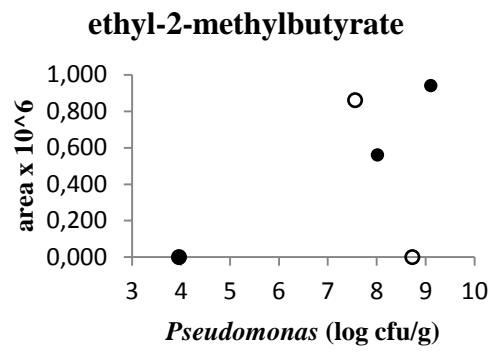
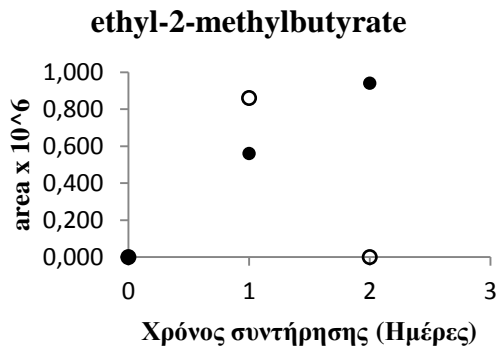
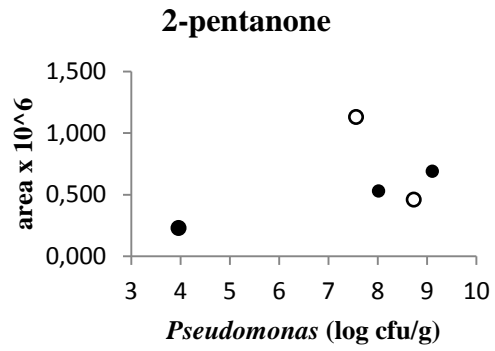
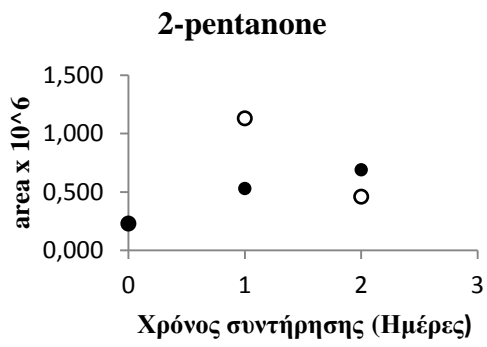


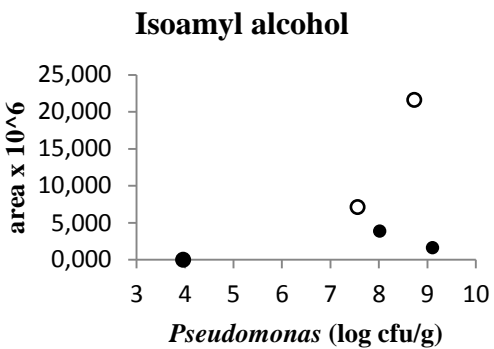
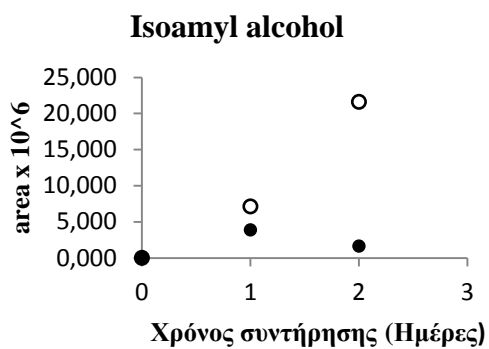
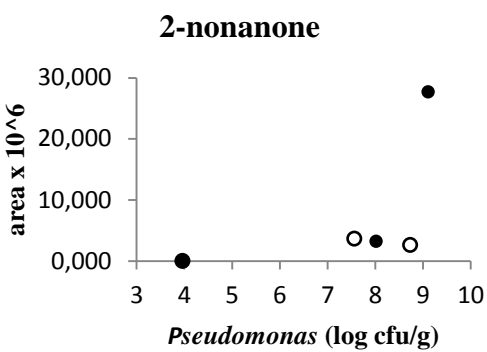
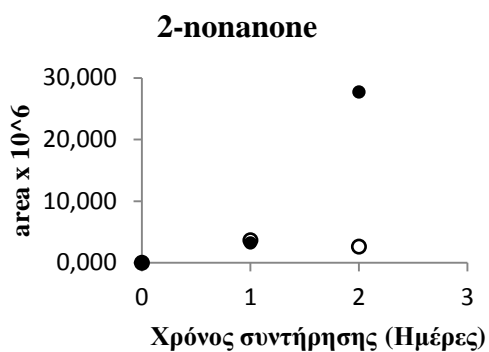
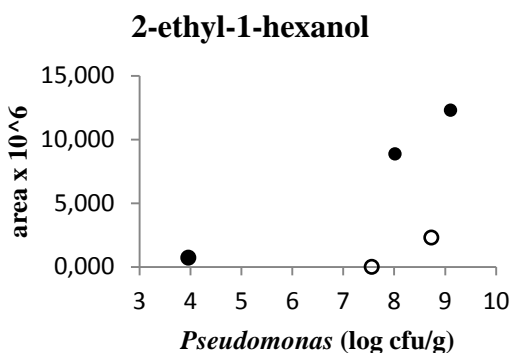
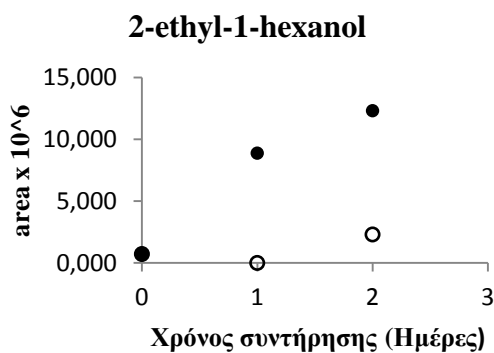
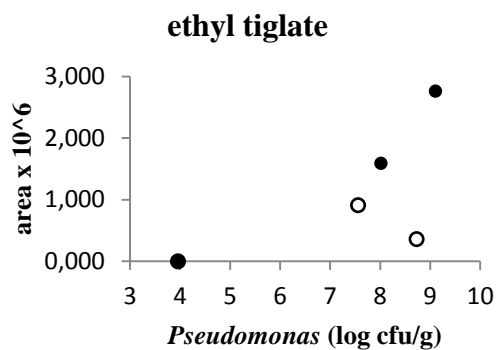
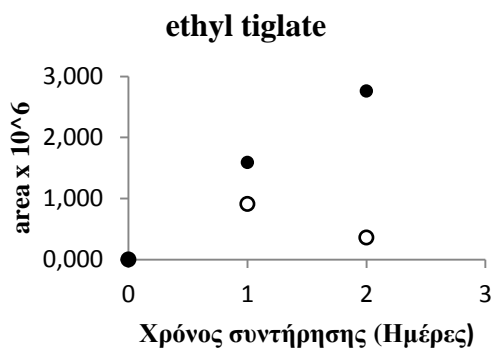
Σχήμα 4.16. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα *Pseudomonas* spp. (β) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 0°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (○).

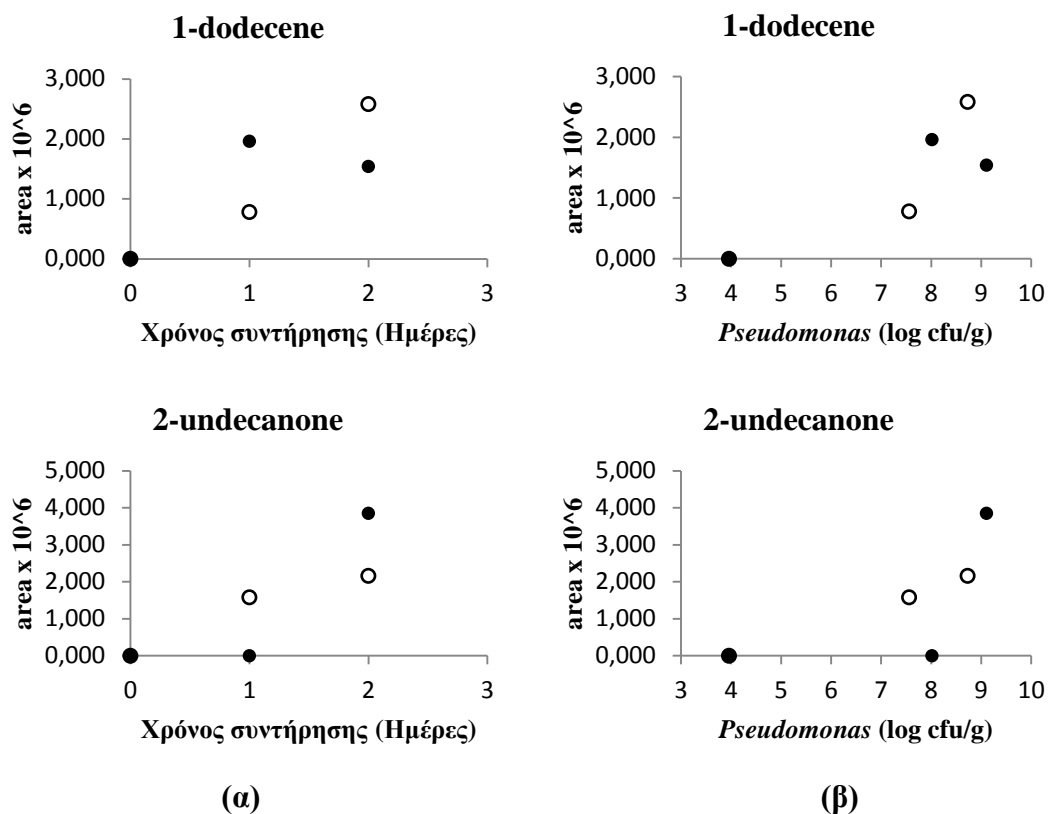




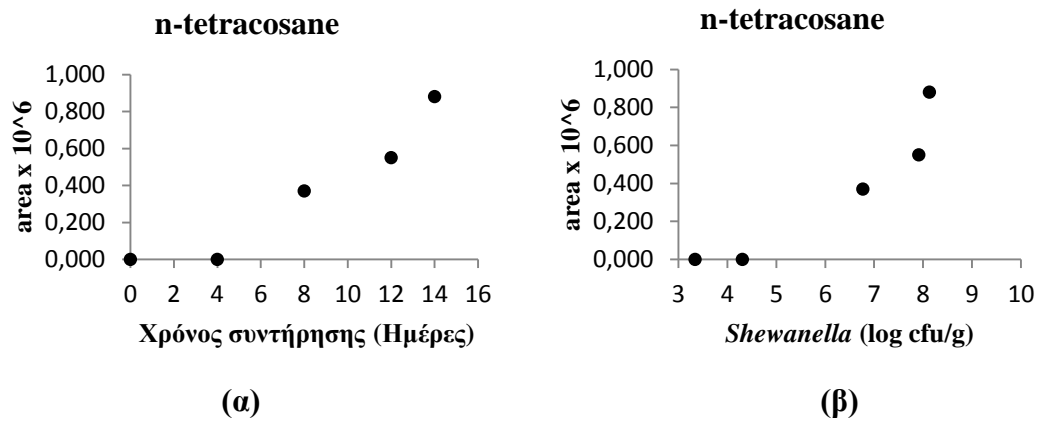
Σχήμα 4.17. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα *Pseudomonas* spp. (β) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 5°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (○).



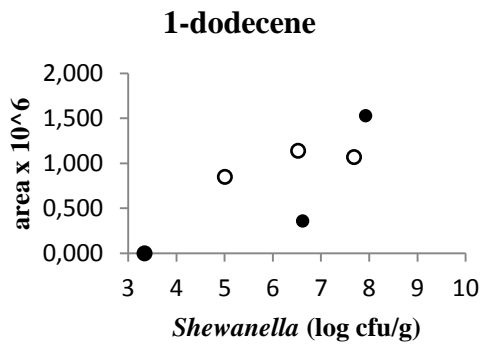
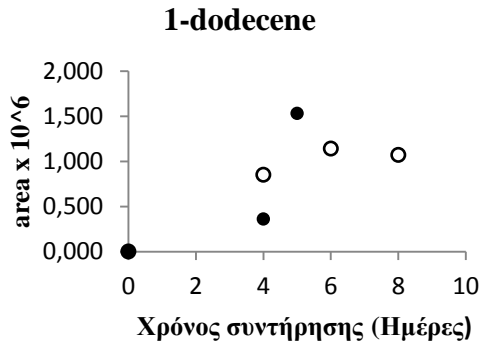
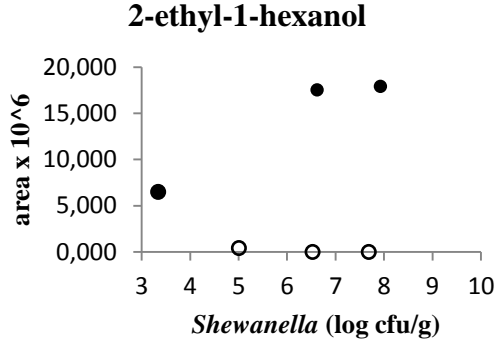
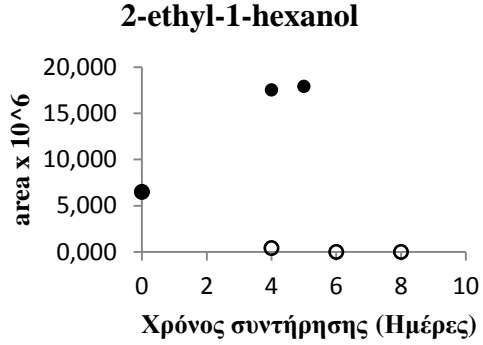
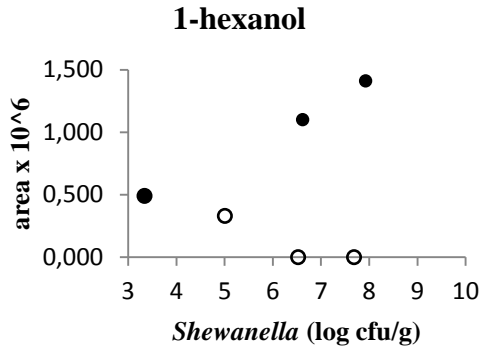
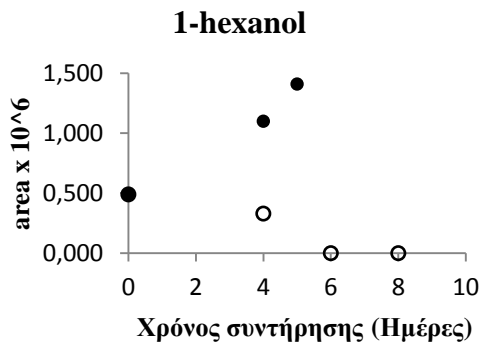
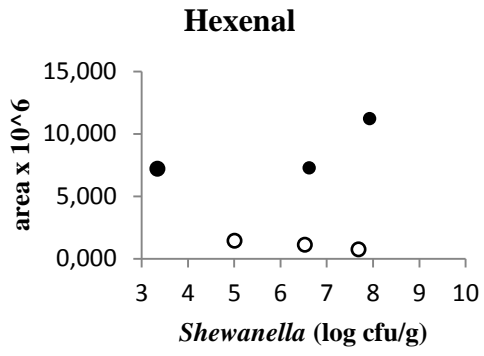
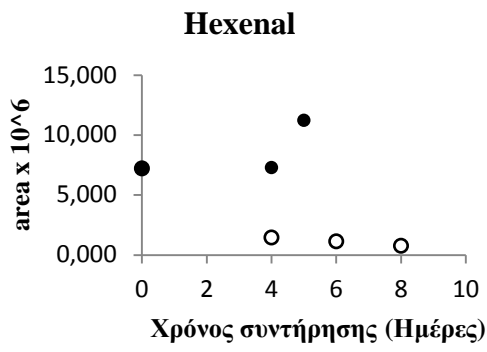


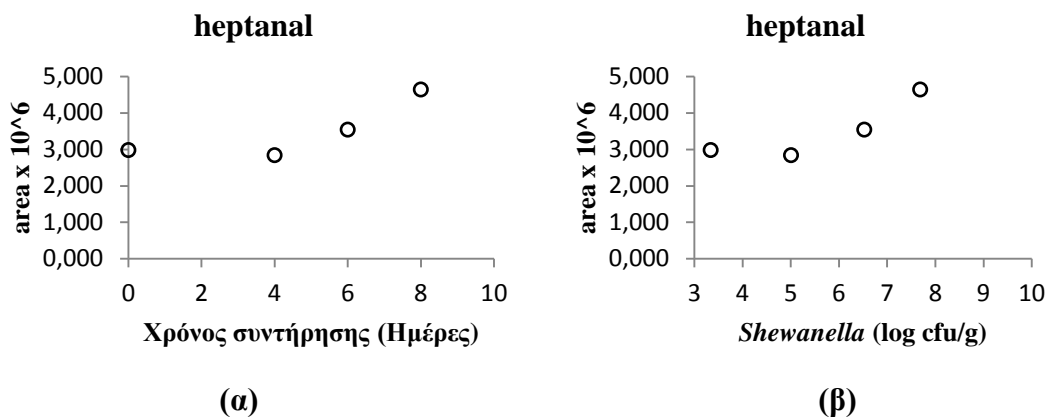


Σχήμα 4.18. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα *Pseudomonas* spp. (β) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 15°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (○).

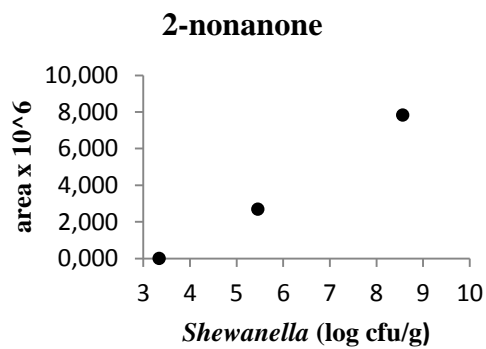
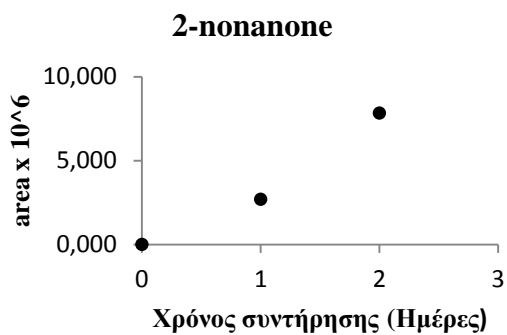
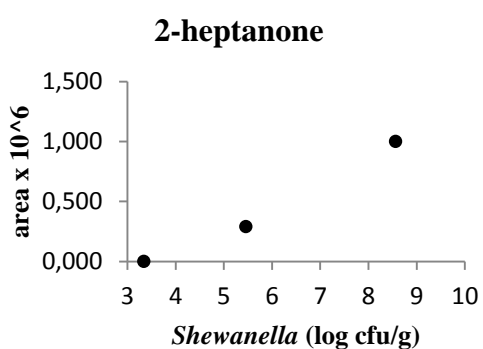
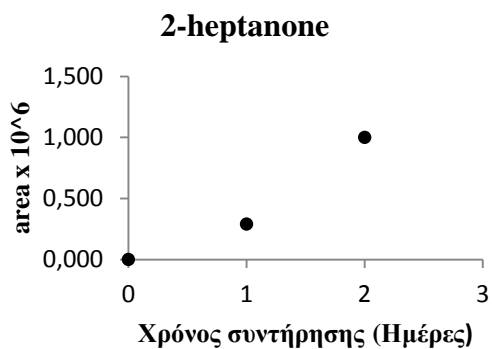
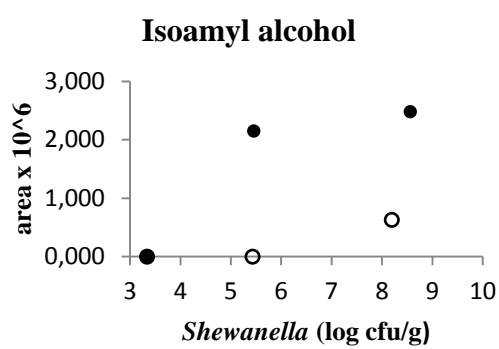
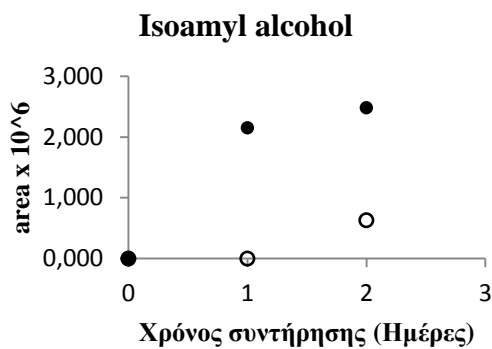
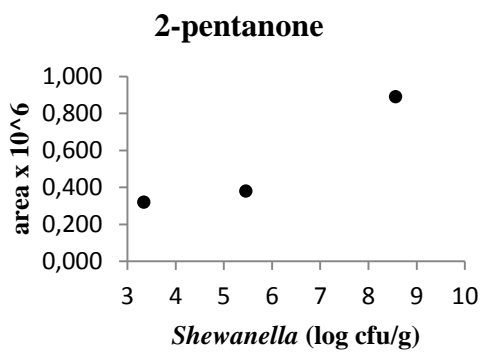
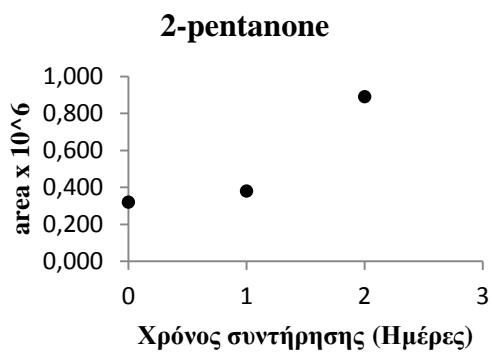


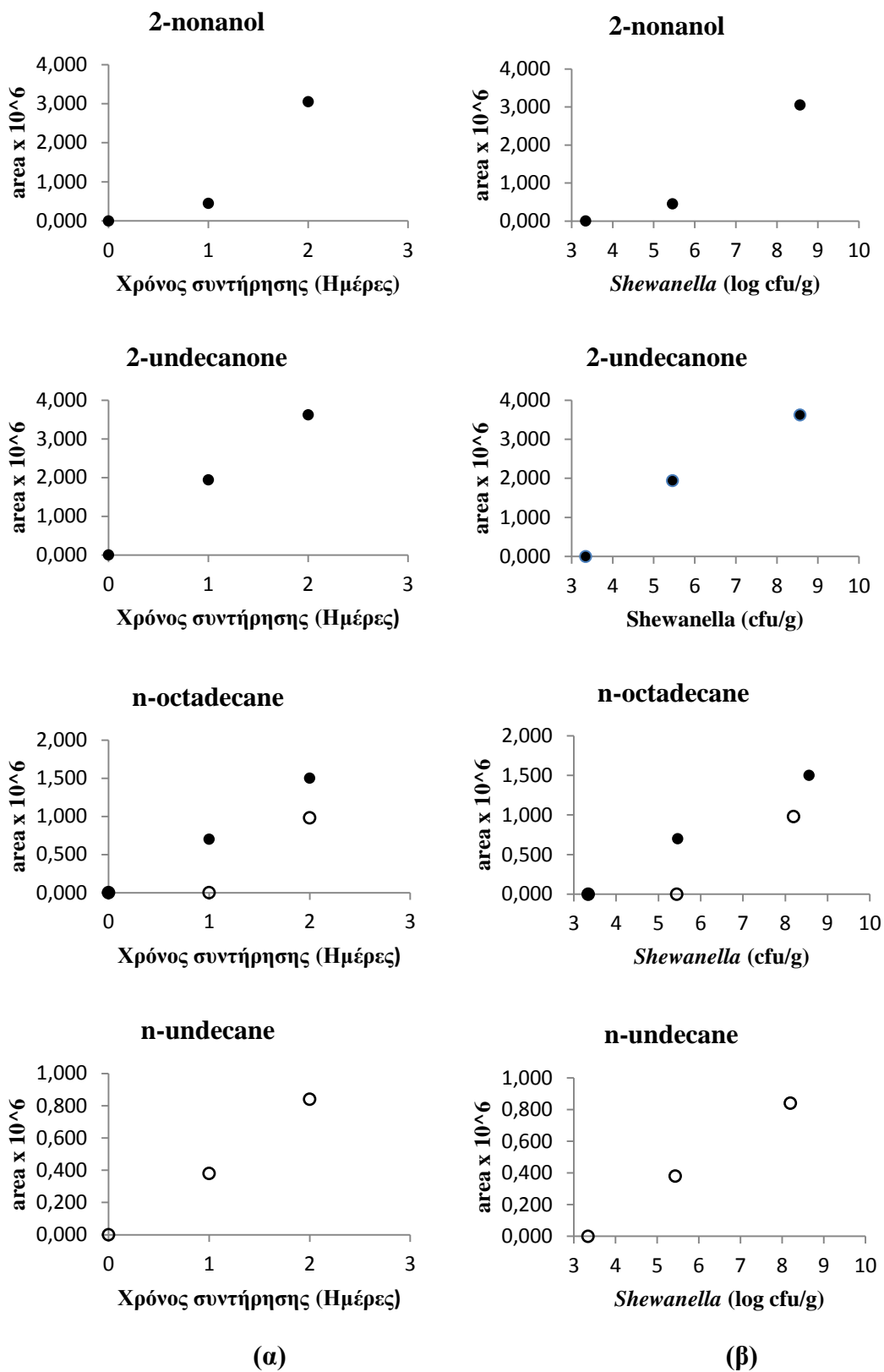
Σχήμα 4.19. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα *Shewanella* spp. (β) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 0°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (○).



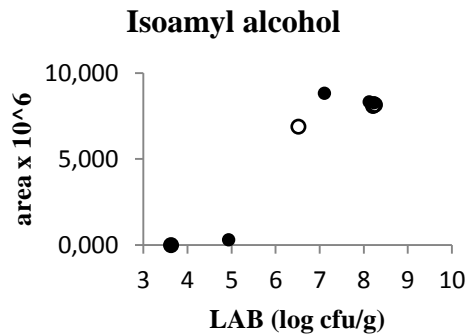
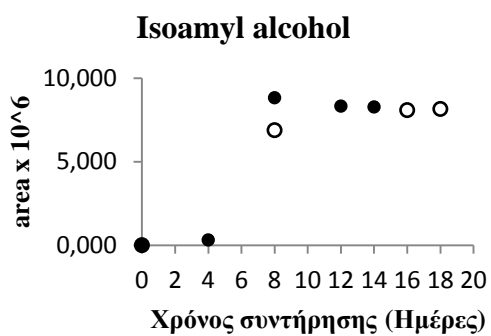
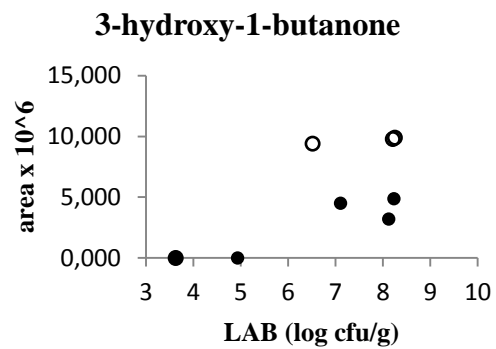
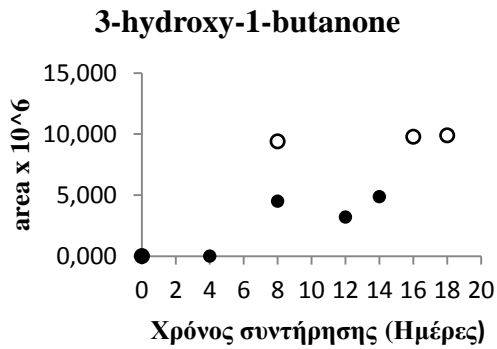
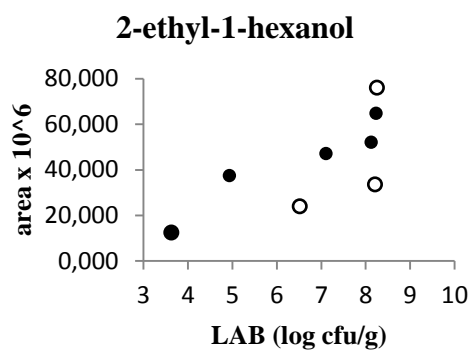
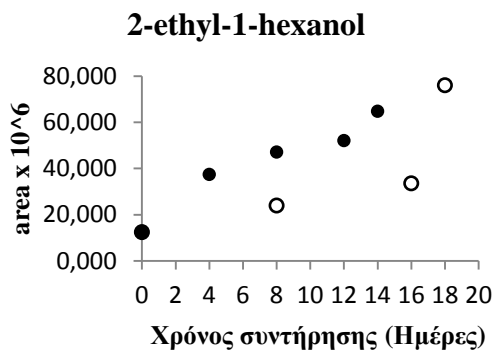
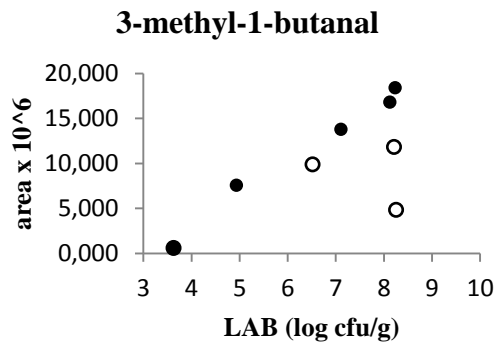
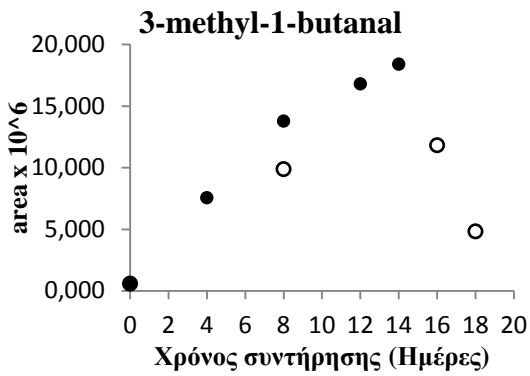


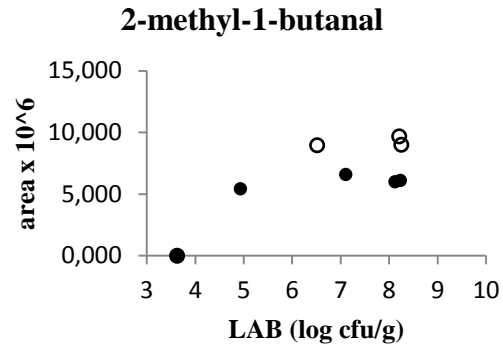
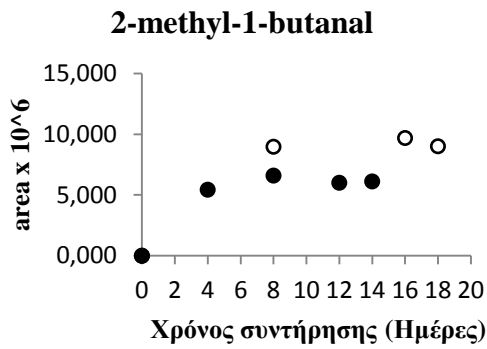
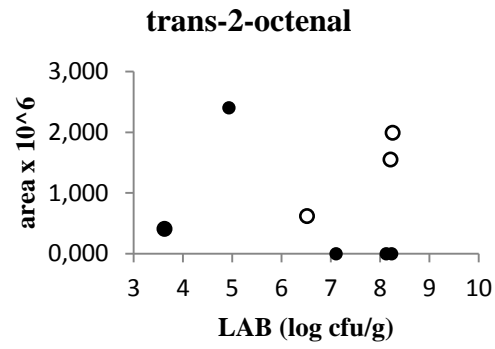
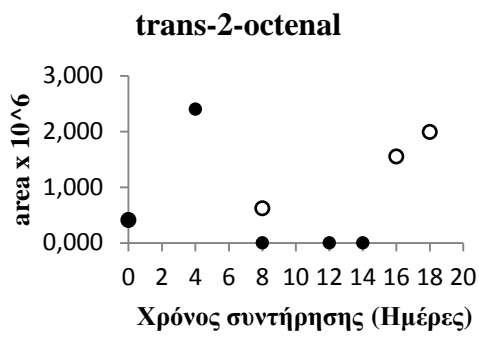
Σχήμα 4.20. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα *Shewanella* spp. (β) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 5°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (○).





(α) **(β)**
Σχήμα 4.21. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα *Shewanella* spp. (β) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 15°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (○).

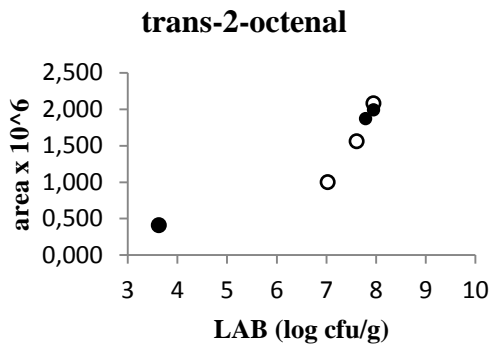
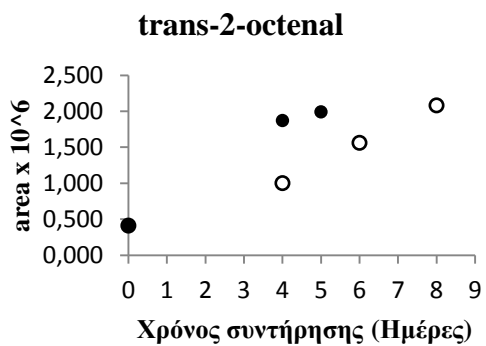
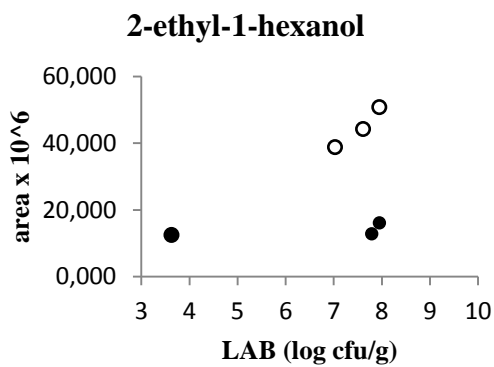
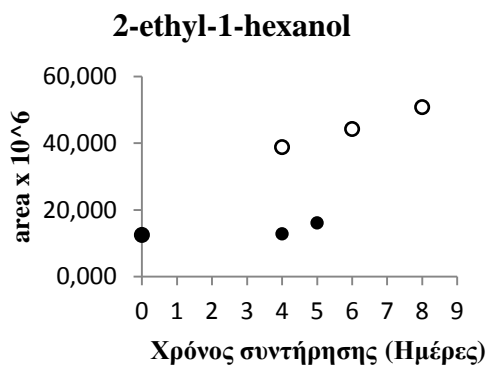
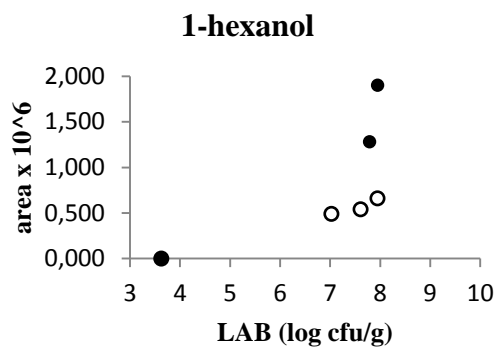
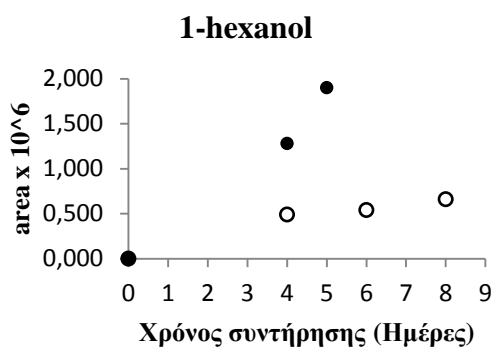
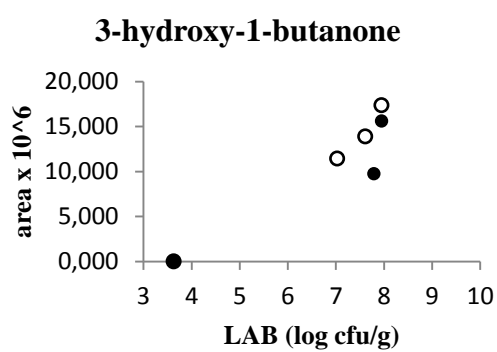
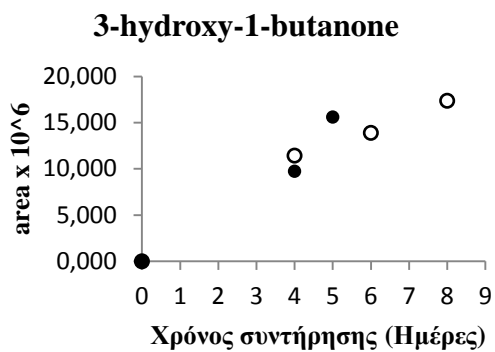


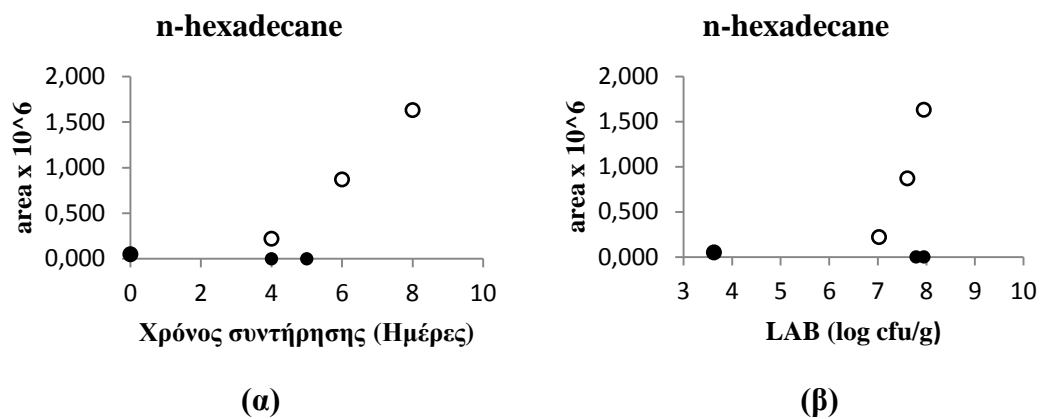


(α)

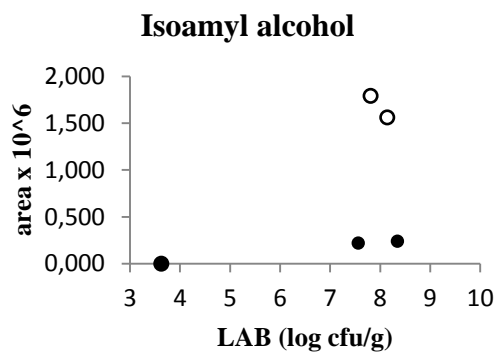
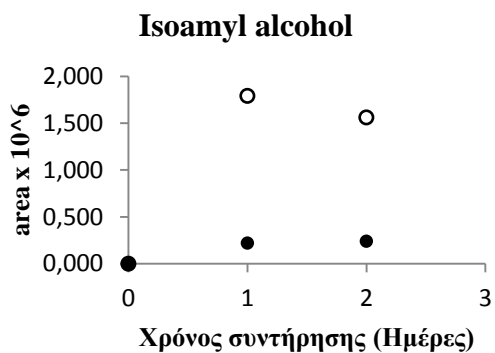
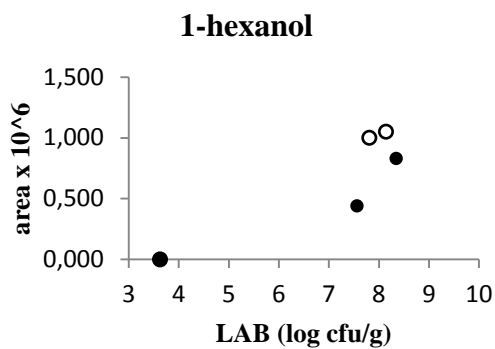
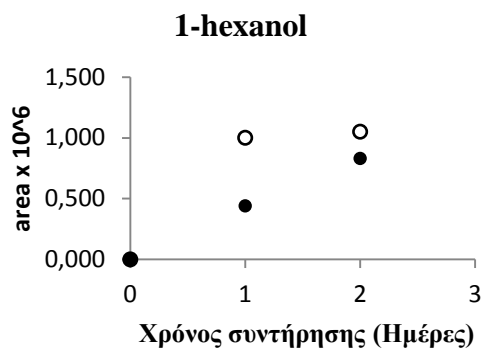
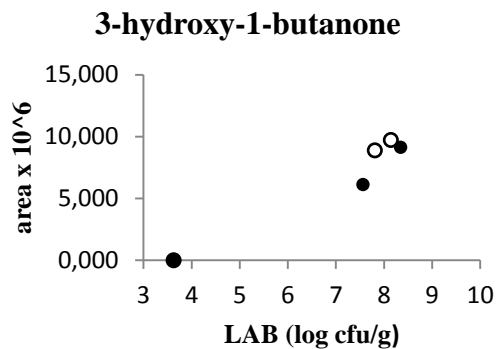
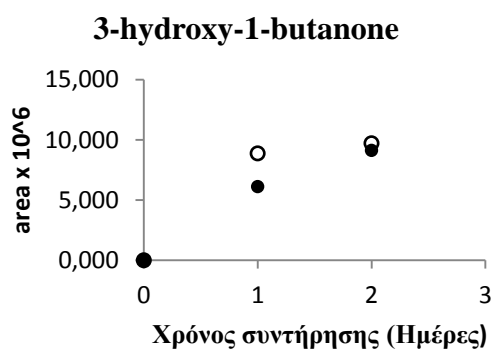
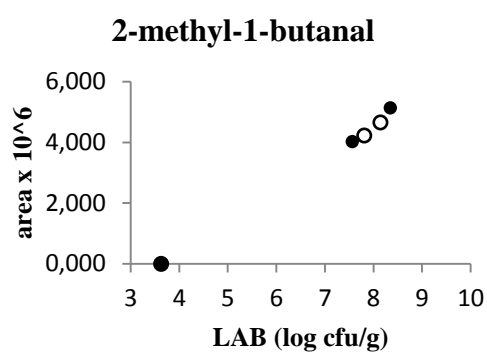
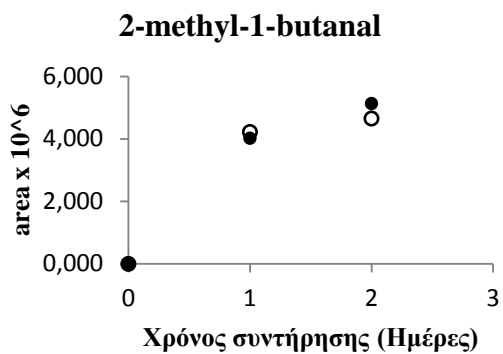
(β)

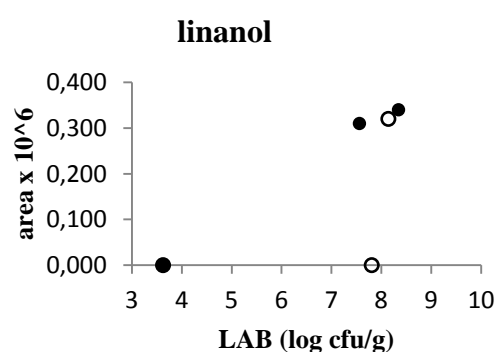
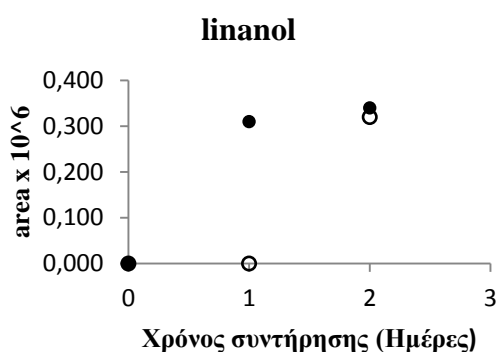
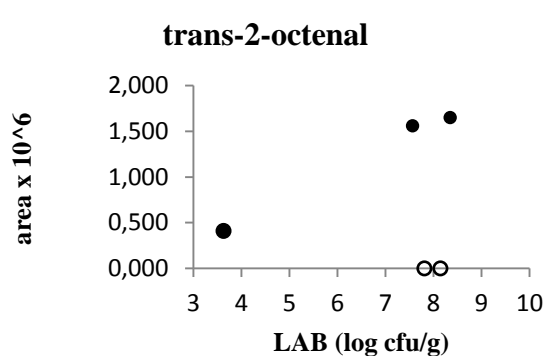
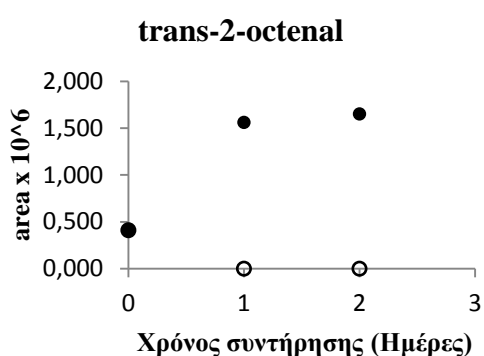
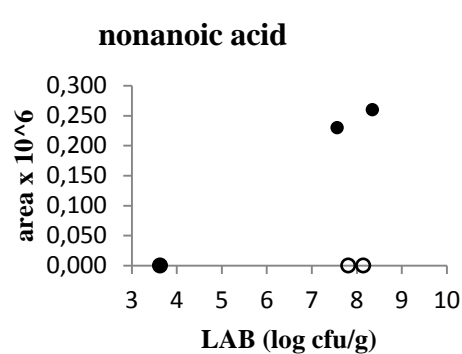
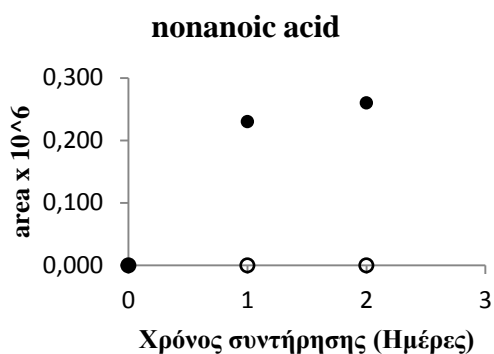
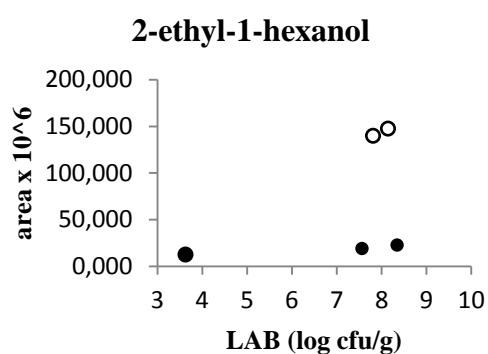
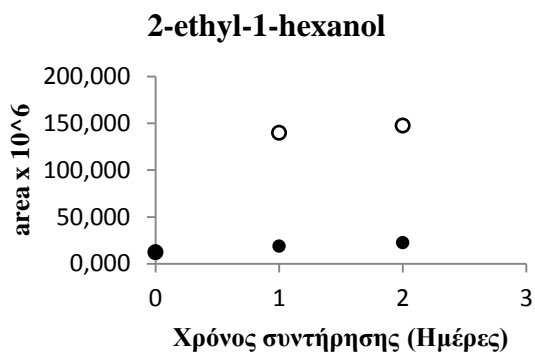
Σχήμα 4.22. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 0°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (○).

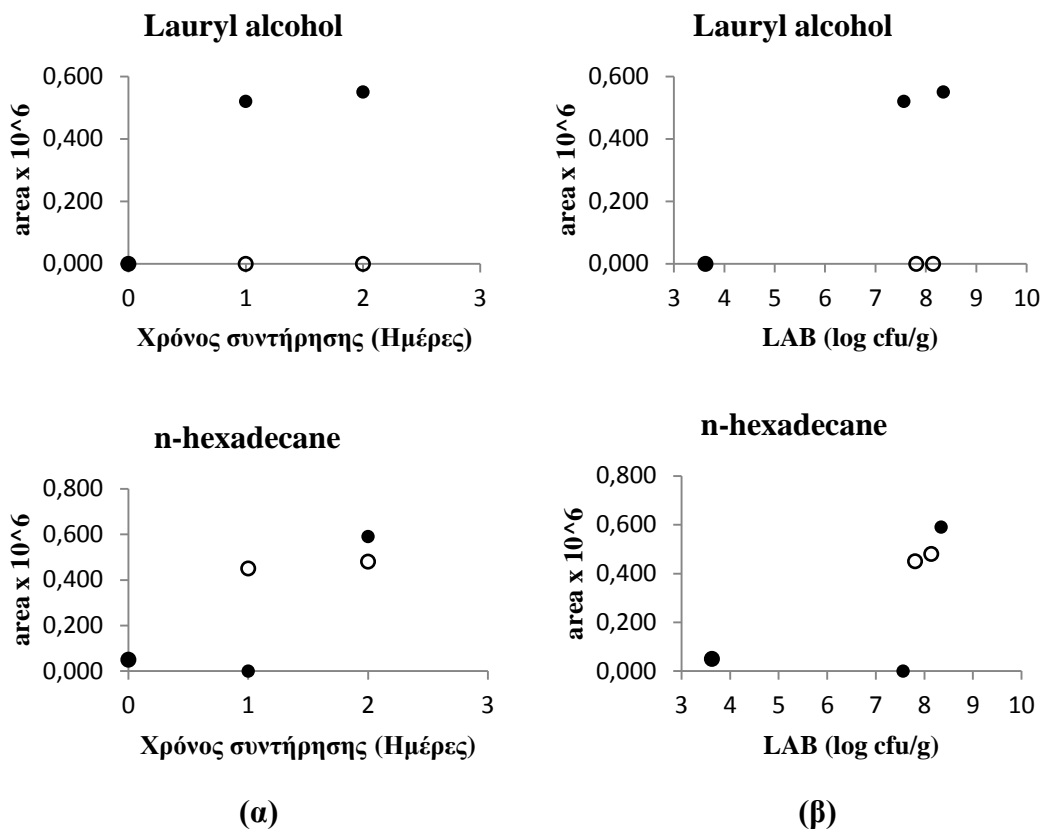




Σχήμα 4.23. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 5°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (○).







Σχήμα 4.24. Σχετικές μεταβολές της συγκέντρωσης πτητικών μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συντήρησης (α) και με τα επίπεδα οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας αποθηκευμένα στους 15°C υπό συνθήκες αέρα (●) και MAP (○).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Επίδραση Ειδικών Αλλοιωγόνων Μικροοργανισμών στην τύχη του *L. monocytogenes*

5.1. Εισαγωγή

Οι μικροοργανισμοί αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν ο ένας την αύξηση του άλλου (Boddy & Wimpenny 1992). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια από τα θετικά κατά Gram βακτήρια, τα *Pseudomonas* spp., το *S. putrefaciens* και γενικότερα τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια διακρίνονται για τις ανταγωνιστικές τους ιδιότητες παράγοντας διάφορες ουσίες έναντι των υπολοίπων μικροοργανισμών. Τα οξυγαλακτικά παράγουν κυρίως οργανικά οξέα και βακτηριοσίνες (Adams & Nicolaidis 1997), τα *Pseudomonas* spp. παράγουν κυρίως σιδηροφόρες ουσίες υπό συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας σε σίδηρο (Gram 1993, Gram 1994, Cheng *et al.* 1995, Laine *et al.* 1996) και γενικότερα, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια παράγουν ουσίες όπως NH₃ και τριμεθυλαμίνη, οι οποίες δρουν τοξικά έναντι των υπολοίπων μικροοργανισμών.

Τα αλιεύματα και τα προϊόντα τους είναι ευαλλοιώτα τρόφιμα λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά και ιδιαίτερα σε μη πρωτεϊνικό άζωτο, με αποτέλεσμα να υποστηρίζουν την αύξηση αλλοιωγόνων μικροοργανισμών αλλά και παθογόνων διότι είναι δυνατό να επιμολυνθούν με διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς κατά τα στάδια της παραγωγικής αλυσίδας τους, έτσι ώστε να είναι δυνατό να καταστούν επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία. Η πρόκληση τροφικών δηλητηριάσεων από παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως είναι το *L. monocytogenes*, έχει αυξήσει το ενδιαφέρον των καταναλωτών σε θέματα ασφάλειας τροφίμων κυρίως ζωικής προέλευσης (WHO 2000). Το *L. monocytogenes* έχει απομονωθεί αρκετές φορές από το θαλάσσιο περιβάλλον και από αρκετά αλιεύματα (Weagant *et al.* 1988, Colburn

et al. 1990, Jemmi 1993, Ben Embarek 1994, Jorgensen & Huss 1998). Η κατανάλωση αλευτικών προϊόντων έχει αποτελέσει πολλές φορές αιτία πρόκλησης λιστερίωσης (Facinelli *et al.* 1989, Ericsson *et al.* 1997). Η παρεμπόδιση της αύξησης ή/και της αδρανοποίησης αυτών των μικροοργανισμών αποτελεί πρωταρχική ανάγκη για την προστασία της δημόσιας υγείας.

Διάφοροι τρόποι θανάτωσης ή παρεμπόδισης της αύξησης των μικροοργανισμών έχουν βασισθεί στην τεχνολογία των εμποδίων (Hurdles Technology), όπως διατυπώθηκε από τον Prof. Leistner (Leistner 1992). Μεταξύ αυτών των τεχνολογιών, είναι η συσκευασία σε MAP η οποία έχει υιοθετηθεί σε μεγάλο βαθμό στην Ευρώπη (Davies 1997). Ωστόσο είναι αξιοσημείωτο ότι παρά την αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα της τεχνολογίας MAP η χρήση της είναι σπάνια ή γίνεται με ακατάλληλο τρόπο από τις Ελληνικές Βιομηχανίες επεξεργασίας, συσκευασίας και διακίνησης των αλιευμάτων λόγω ότι (i) υπάρχει λιγοστή πληροφόρηση σχετικά με τη μικροβιακή κοινότητα (αλλοιωγόνο και παθογόνο) των Ελληνικών προϊόντων (ολόκληρα, ολόκληρα απεντερωμένα, φιλέτα κτλ) σε σύγκριση με την εκτενέστερη γνώση γύρω από παρόμοια προϊόντα σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες και (ii) δεν πραγματοποιείται σωστή εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας λόγω κυρίως έλλειψης επιστημονικής γνώσης (π.χ. υπάρχει διαφορετική μικροβιακή κοινότητα και διαφορετικά μικροβιακά προφίλ αλλοίωσης μεταξύ των νωπών αλιευτικών προϊόντων των χωρών της Βόρειας Ευρώπης σε σχέση με αυτά από τις Νότιες Ευρωπαϊκές χώρες) (Gram & Dalgaard 2002). Επιπλέον, έχουν εκφραστεί ανησυχίες για το ότι η τεχνολογία MAP εγκυμονεί κινδύνους. Αυτό διότι είναι δυνατό οι παθογόνοι μικροοργανισμοί να αναπτύξουν προσαρμοστικότητα σε αντίξοα περιβάλλοντα (Davies 1997, Farber 2001) αλλά και η τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών εξαρτάται από τον ανταγωνισμό

τους με την αλλοιωγόνο μικροκοινότητα, η οποία παραμποδίζεται από τη συσκευασία MAP.

Η τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών εξαρτάται από τις συνθήκες επεξεργασίας και συντήρησης καθώς και από τον ανταγωνισμό τους με την αλλοιωγόνο μικροκοινότητα (Buchanan & Bagi 1999). Ανταγωνισμός υφίσταται και μεταξύ των EAM, ο οποίος επιδρά εκτός από το ρυθμό αύξησης και το μέγεθος του τελικού πληθυσμού τους, και τον μεταβολισμό τους (Tsigarida *et al.* 2003). Η επίδραση των συνθηκών επεξεργασίας και συντήρησης στην μικροβιακή οικολογία είναι πρωτεύοντος σημασίας για την παραγωγή και διάθεση υγιεινών και ποιοτικών αλιευμάτων.

Στην Ελλάδα, καμία μελέτη δεν έχει λάβει χώρα σχετικά με τη διερεύνηση της οικολογικής αλληλεπίδρασης μεταξύ αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών, όπως είναι το *L. monocytogenes*, είτε σε υπόστρωμα-μοντέλο που να προσομοιάζει σάρκα ιχθύος τσιπούρας ή σε ιχθύες τσιπούρας, σε σχέση με τις συνθήκες αποθήκευσης-συντήρησης.

Σκοπός του κεφαλαίου αυτού είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών καθώς και της αλληλεπίδρασης αυτών με το παθογόνο *L. monocytogenes*.

5.2. Υλικά και Μέθοδοι

5.2.1. Προέλευση και προετοιμασία δειγμάτων

Η προέλευση των φιλέτων και η προετοιμασία των μοντέλων ιχθύος τσιπούρας πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφονται στο Κεφάλαιο 3.

5.2.2. Προετοιμασία εμβολίου, ενοφθαλμισμός και αποθήκευση

Καλλιέργειες *L. monocytogenes* σε μίγμα που αποτελούνταν από Scott A, Pirie 21075, Pirie 21085, Pirie 214112, Pirie 23UD, Pirie NCTC 10527 και μίγμα από *Pseudomonas* spp. (βλέπε Κεφ. 3), *Shewanella* spp. (βλέπε Κεφ. 3) και οξυγαλακτικά βακτήρια (βλέπε Κεφ. 3), χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό: ι) φιλέτων με τη φυσική τους μικροβιακή σύνθεση και ιι) στερεών μοντέλων ιχθύος τσιπούρας. Οι καλλιέργειες *L. monocytogenes* προμηθεύθηκαν από το εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Στα φιλέτα, πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός με *L. monocytogenes* σε αρχικό εμβόλιο περίπου 10^3 cfu/g. Στα μοντέλα, πραγματοποιήθηκαν ενοφθαλμισμοί σε μονοκαλλιέργειες και σε συγκαλλιέργειες αλλοιωγόνων καθώς και των αλλοιωγόνων και του παθογόνου *L. monocytogenes* μαζί. Το αρχικό εμβόλιο των μικροοργανισμών στις μονοκαλλιέργειες και στις συγκαλλιέργειες ήταν περίπου 10^3 cfu/g. Οι συνδυασμοί των μικροοργανισμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1.

Κάθε μεταχείριση πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις. Ακολουθούσε συσκευασία και αποθήκευση των φιλέτων και των μοντέλων σε συνθήκες αέρα και MAP (CO₂: 60%, O₂: 10%, N₂: 30%) με χρήση φιλμ BDF 8050F (SEALED AIR) το οποίο προμηθεύθηκε από τη βιομηχανία ΔΙΑΣ, ίδιο με αυτό που χρησιμοποιείται στα εμπορικά φιλέτα, με σκοπό το εργαστηριακό προϊόν σε MAP να προσομοιάζει το περισσότερο δυνατό το πραγματικό εμπορικό προϊόν. Ακολουθούσε αποθήκευση σε επωαστικούς θαλάμους στους 5°C. Η συσκευασία σε MAP πραγματοποιήθηκε σε συσκευή τύπου Henkovac 1900 στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, του Γεωπονικού

Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η μικροβιολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2. Σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε προσαρμογή των δεδομένων αύξησης χρησιμοποιώντας τη σιγμοειδή εξίσωση του Baranyi (Baranyi & Roberts 1994) (βλέπε Κεφ. 2).

5.3 Αποτελέσματα

5.3.1. Ανάπτυξη του *L. monocytogenes* σε φιλέτα τσιπούρας

Οι καμπύλες αύξησης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και το pH στα φιλέτα ιχθύος τσιπούρας (α) και στα φιλέτα ενοφθαλμισμένα με το *L. monocytogenes* (β), κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους στους 5°C για 8 και 10 ημέρες υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP, αντίστοιχα, παρουσιάζονται στα Σχήματα 5.1 - 5.4. Οι κινητικές παράμετροι των μικροοργανισμών παρουσιάζονται στους Πίνακες 5.2 και 5.3.

Κατά τη συντήρηση των ιχθύων στις δύο ατμόσφαιρες στο χρόνο απόρριψης (d5 και d8 για τα φιλέτα σε αέρα και MAP, αντίστοιχα), τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς στους 5 °C. Τα *Pseudomonas* spp. ακολουθούνταν από τα βακτήρια που παράγουν H₂S, Enterobacteriaceae, *B. thermosphacta* και οξυγαλακτικά βακτήρια, σε αερόβιες συνθήκες (Σχ. 5.1α), ενώ από τα βακτήρια που παράγουν H₂S, *B. thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια και Enterobacteriaceae, σε συνθήκες MAP (Σχ. 5.2α).

Με την παρουσία του *L. monocytogenes*, παρατηρήθηκαν μεταβολές στις κινητικές παραμέτρους των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών κατά τη συντήρηση των φιλέτων. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ_{max}) των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών μεταβλήθηκε εξαιτίας της παρουσίας του παθογόνου στα φιλέτα υπό τις ίδιες συνθήκες

θερμοκρασίας και ατμόσφαιρας. Σε συσκευασία αέρα, στα φιλέτα χωρίς το παθογόνο, ο μεγαλύτερος ειδικός ρυθμός αύξησης παρατηρήθηκε στα Enterobacteriaceae και ακολουθούσαν τα *Pseudomonas* spp., τα *B. thermosphacta*, τα βακτήρια που παράγουν H₂S και τα οξυγαλακτικά βακτήρια (p< 0,05) (Πίν. 5.2). Παρουσία του παθογόνου, ο ρυθμός αύξησης των βακτηρίων που παράγουν H₂S, του *B. thermosphacta* καθώς και των Enterobacteriaceae μειώθηκε (p< 0,05) (Πίν. 5.2). Αντίθετα, ο ρυθμός αύξησης των *Pseudomonas* spp. και των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρουσίασε αύξηση, με τα *Pseudomonas* spp. να παρουσιάζουν τον μεγαλύτερο ειδικό ρυθμό αύξησης (p< 0,05) (Πίν. 5.2). Επομένως, η αύξηση των *Pseudomonas* spp. και των οξυγαλακτικών βακτηρίων ευνοήθηκε στα φιλέτα με το παθογόνο που συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες, ενώ η αύξηση των βακτηρίων που παράγουν H₂S, του *B. thermosphacta* καθώς και των Enterobacteriaceae παρεμποδίστηκε εξαιτίας της παρουσίας του *L. monocytogenes* στις συνθήκες αυτές, σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το παθογόνο. Οι τελικοί πληθυσμοί των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών επίσης μεταβλήθηκαν λόγω της παρουσίας του παθογόνου στα φιλέτα σε αερόβιες συνθήκες (Πίν.5.2). Οι τελικοί πληθυσμοί των *Pseudomonas* spp. και των Enterobacteriaceae παρουσίασαν μείωση παρουσία του *L. monocytogenes* σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς την παρουσία του παθογόνου, ενώ οι τελικοί πληθυσμοί των βακτηρίων που παράγουν H₂S και των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρουσίασαν αύξηση. Οι τελικοί πληθυσμοί του *B. thermosphacta* δεν παρουσίασαν μεταβολές (p>0,05) (Πίν. 5.2).

Σε συσκευασία MAP, στα φιλέτα χωρίς το παθογόνο, ο μεγαλύτερος ειδικός ρυθμός αύξησης παρατηρήθηκε στα βακτήρια που παράγουν H₂S και ακολουθούσαν τα *Pseudomonas* spp., οξυγαλακτικά βακτήρια, *B. thermosphacta* και τα Enterobacteriaceae (Πίν. 5.3). Παρουσία παθογόνου, ο ρυθμός αύξησης των

αλλοιωγόνων μικροοργανισμών μειώθηκε ($p < 0,05$), εκτός από την περίπτωση των Enterobacteriaceae όπου παρέμεινε ο ίδιος ($p > 0,05$). Επομένως, ο ρυθμός αύξησης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, πλην των Enterobacteriaceae, μειώθηκε εξαιτίας της παρουσίας του *L. monocytogenes* στις συνθήκες αυτές, σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το παθογόνο. Επιπλέον, οι τελικοί πληθυσμοί των μικροοργανισμών των φιλέτων σε συσκευασία MAP παρουσίασαν μείωση παρουσία του *L. monocytogenes* σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς την παρουσία του παθογόνου. Η μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (0,5-1,0 log) (Πίν. 5.3).

Συνολικά για τα δύο προϊόντα (αέρας, MAP), στα φιλέτα με το παθογόνο, τα *Pseudomonas* spp. ακολουθούνταν από τα βακτήρια που παράγουν H_2S , Enterobacteriaceae, οξυγαλακτικά βακτήρια και από τα *B. thermosphacta*, σε αερόβιες συνθήκες (Σχ. 5.1β), ενώ τα βακτήρια που παράγουν H_2S ακολουθούνταν από τα *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια και από τα Enterobacteriaceae, σε συνθήκες MAP (Σχ. 5.2β). Στο τέλος της συντήρησης, τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς στα φιλέτα στις δύο ατμόσφαιρες. Στα φιλέτα με το παθογόνο, τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε αερόβιες συνθήκες (Πίν. 5.2), ενώ στα φιλέτα με το παθογόνο σε MAP, τα βακτήρια που παράγουν H_2S αποτέλεσαν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (Πίν. 5.3).

Το *L. monocytogenes* παρουσίασε μεγαλύτερο ειδικό ρυθμό αύξησης ($0,393 d^{-1}$) στα φιλέτα που συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες σε σχέση με αυτά που συντηρήθηκαν σε συνθήκες MAP ($0,300 d^{-1}$) ($p < 0,05$) (Πίν. 5.2&5.3). Παρόλα αυτά, έφτασε σε υψηλότερο πληθυσμό σε συνθήκες MAP, στο χρόνο απόρριψης (4,57 και 4,88 log cfu/g σε αέρα και MAP, αντίστοιχα) και στο τέλος του πειράματος

συντήρησης (5,73 και 5,92 log cfu/g σε αέρα και MAP, αντίστοιχα) (Σχ. 5.1β & 5.2β). Στη συσκευασία σε MAP, στο τέλος της συντήρησης, το παθογόνο έφτασε σε υψηλότερα πληθυσμιακά επίπεδα από τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα Enterobacteriaceae, ενώ στην συσκευασία αέρα βρέθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους αλλοιωγόνους πλην του *B. thermosphacta*.

Κατά τη συντήρηση των φιλέτων, φάση προσαρμογής παρατηρήθηκε κατά την αύξηση των Enterobacteriaceae στα φιλέτα σε αερόβιες συνθήκες παρουσία ή όχι του *L. monocytogenes* (Πίν. 5.2). Στη συσκευασία σε MAP, φάση προσαρμογής παρατηρήθηκε στα βακτήρια που παράγουν H₂S και στα *B. thermosphacta* κατά τη διάρκεια της συντήρησης και στις δύο περιπτώσεις (Πίν. 5.3). Στα φιλέτα σε MAP παρουσία παθογόνου, η φάση προσαρμογής των βακτηρίων που παράγουν H₂S επιμηκύνθηκε πάνω από 2 ημέρες σε σχέση με τα μη ενοφθαλμισμένα με παθογόνο φιλέτα (από 0,83 σε 3,03 ημέρες). Δεν παρατηρήθηκε φάση προσαρμογής κατά την αύξηση του *L. monocytogenes* σε καμία συσκευασία (Πίν. 5.2&5.3).

Συμπερασματικά παρατηρήθηκε ότι η μείωση του ειδικού ρυθμού αύξησης και του επιπέδου των πληθυσμών των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα φιλέτα σε MAP (Πίν. 5.2 & 5.3) φαίνεται να επιτρέπει την αύξηση του παθογόνου σε υψηλότερα πληθυσμιακά επίπεδα σε σχέση με την αποθήκευση σε συσκευασία αέρα, αλλά όχι σημαντικά ώστε να συνεπάγεται ότι η συσκευασία MAP ευνοεί το παθογόνο.

Το pH παρουσίασε αύξηση στα φιλέτα που αποθηκεύθηκαν σε αερόβιες συνθήκες κατά τη συντήρηση, η οποία φαίνεται να συμπίπτει με την αύξηση του πληθυσμού των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Σχ. 5.1α). Στα φιλέτα σε συνθήκες αέρα, παρουσία παθογόνου, το pH παρουσίασε αυξομειώσεις (Σχ. 5.1β). Στα φιλέτα σε συνθήκες MAP κατά τη διάρκεια της συντήρησης, το pH κυμάνθηκε σε παρόμοια

επίπεδα στα ανεμβολίαστα φιλέτα (Σχ. 5.2α), ενώ παρουσίασε πτώση στα φιλέτα παρουσία παθογόνου (Σχ. 5.2β). Η πτώση του pH στα φιλέτα παρουσία παθογόνου συνέπεσε με την πτώση των πληθυσμών των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, κυρίως των *Pseudomonas* spp. (Σχ. 5.2β).

Μονοκαλλιέργεια μικροοργανισμών σε στερεά μοντέλα υποστρώματα ιχθύος

Οι καμπύλες αύξησης και οι κινητικές παράμετροι των μικροοργανισμών παρουσιάζονται στα Σχήματα 5.3&5.4 και στον Πίνακα 5.4, αντίστοιχα.

Τα *Pseudomonas* spp. έφτασαν στα επίπεδα των 9,33 και 8,77 log cfu/g σε συσκευασία αέρα και MAP αντίστοιχα, παρουσιάζοντας τον μεγαλύτερο τελικό πληθυσμό (N_{max}) σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς σε μονοκαλλιέργειες και στις δύο συσκευασίες (Σχ. 5.3&5.4). Παρόλα αυτά, ο ειδικός ρυθμός αύξησης των *Pseudomonas* spp. ($1,173\text{ d}^{-1}$) ήταν χαμηλότερος από αυτόν των *Shewanella* spp. ($1,250\text{ d}^{-1}$) σε συνθήκες αέρα καθώς και από τα *Shewanella* spp. και από οξυγαλακτικά σε συνθήκες MAP (Πίν. 5.4). Φάση προσαρμογής των *Pseudomonas* spp. ίση με 0,39 d παρατηρήθηκε μόνο στη συσκευασία αέρα.

Τα *Shewanella* spp. έφτασαν στα αριθμητικά επίπεδα των 8,56 και 8,19 log cfu/g σε συσκευασία αέρα και MAP αντίστοιχα, ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια έφτασαν στα επίπεδα των 8,44 και 8,17 log cfu/g σε συσκευασία αέρα και MAP αντίστοιχα. Ο μεγαλύτερος ειδικός ρυθμός αύξησης παρατηρήθηκε στα *Shewanella* spp. στην συσκευασία αέρα και στα οξυγαλακτικά βακτήρια στην συσκευασία σε MAP (Πίν. 5.4). Φάση προσαρμογής παρατηρήθηκε κατά την αύξηση των *Shewanella* spp. και στις δύο ατμόσφαιρες.

Το *L. monocytogenes* παρουσίασε τον χαμηλότερο μέγιστο πληθυσμό και τον χαμηλότερο ρυθμό αύξησης σε σχέση με τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε μονοκαλλιέργεια (Πίν. 5.4). Ο ειδικός ρυθμός αύξησης του *L. monocytogenes* ήταν περίπου 3 φορές μεγαλύτερος στη συσκευασία MAP σε σχέση με τη συσκευασία αέρα. Στη συσκευασία σε MAP παρατηρήθηκε επιμήκυνση της φάσης προσαρμογής του *L. monocytogenes* ίση με 4,26 d σε σχέση με τα μοντέλα υπό συνθήκες αέρα (Πίν. 5.4).

Συγκαλλιέργεια αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του *L. monocytogenes* σε στερεά μοντέλα υποστρώματα ιχθύος

Οι καμπύλες αύξησης και το pH των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε στερεά μοντέλα ιχθύος τσιπούρας (α) με τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς και (β) με τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς μαζί με το *L. monocytogenes*, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους για 10 και 11 ημέρες υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP, αντίστοιχα, στους 5°C, παρουσιάζονται στα Σχήματα 5.5-5.9. Οι κινητικές παράμετροι των μικροοργανισμών στις συγκαλλιέργειες παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.5.

Δεν παρατηρήθηκε ουσιαστική διαφορά μεταξύ των κινητικών παραμέτρων αύξησης των *Pseudomonas* spp. στη συγκαλλιέργεια με το *L. monocytogenes* (Ps-L) σε σχέση με την αύξησή τους στη μονοκαλλιέργεια, σε αερόβιες συνθήκες (Πίν. 5.5) ($p > 0.05$). Τα *Pseudomonas* spp. έφτασαν σε παρόμοια πληθυσμιακά επίπεδα της τάξης των 9,33 και 9,31 log cfu/g στη μονοκαλλιέργεια και στη συγκαλλιέργεια με το παθογόνο (Ps-L) με ειδικό ρυθμό αύξησης ίσο με 1,173 και 1,188 ημέρες⁻¹ αντίστοιχα, στο τέλος της συντήρησης. Αντίθετα, ο ειδικός ρυθμός αύξησης των *Pseudomonas* spp. σχεδόν υποδιπλασιάστηκε (από 0,677 σε 0,347 ημέρες⁻¹) στη συγκαλλιέργεια Ps-L σε σχέση με την αύξησή τους στη μονοκαλλιέργεια σε συνθήκες MAP (Πίν. 5.5). Ο

τελικός πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. ήταν περίπου 1 log χαμηλότερος στη συγκαλλιέργεια Ps-L σε σχέση με τη μονοκαλλιέργεια στις συνθήκες αυτές. Η αύξηση του *L. monocytogenes* παρεμποδίστηκε στη συγκαλλιέργεια με τα *Pseudomonas* spp. και στις δύο ατμόσφαιρες σε σχέση με την αύξησή του στη μονοκαλλιέργεια (από 0,242 σε 0,110 και από 0,676 σε 0,213, για τα μοντέλα σε αέρα και MAP αντίστοιχα) (Σχ. 5.5α,β).

Ο ειδικός ρυθμός αύξησης των *Shewanella* spp. βρέθηκε να είναι μικρότερος στη συγκαλλιέργεια με το παθογόνο (Sh-L), σε σχέση με τον ρυθμό αύξησής τους στη μονοκαλλιέργεια, στις δύο ατμόσφαιρες (Πίν. 5.4&5.5). Ιδιαίτερα, στην περίπτωση της αποθήκευσης των μοντέλων σε συνθήκες MAP, ο ρυθμός αύξησης των *Shewanella* spp. ήταν περίπου 4 φορές μικρότερος (0,745 ημέρες⁻¹ στη μονοκαλλιέργεια και 0,195 ημέρες⁻¹ στη συγκαλλιέργεια). Ο τελικός πληθυσμός των *Shewanella* spp. βρέθηκε να είναι περίπου 2 και 4 logs μικρότερος στη συγκαλλιέργεια Sh-L σε σχέση με τη μονοκαλλιέργεια σε συνθήκες αέρα και MAP αντίστοιχα. Ο ρυθμός αύξησης του παθογόνου βρέθηκε να είναι περίπου 8 φορές μεγαλύτερος στη συγκαλλιέργεια Sh-L (1,819 ημέρες⁻¹) σε σχέση με τη μονοκαλλιέργεια (0,242 ημέρες⁻¹) και 2 φορές μικρότερος στη συγκαλλιέργεια Sh-L (0,310 ημέρες⁻¹) σε σχέση με τη μονοκαλλιέργεια (0,676 ημέρες⁻¹), σε συνθήκες αέρα και MAP αντίστοιχα. Φαίνεται ότι τα *L. monocytogenes* παρεμποδίζουν την αύξηση των *Shewanella* spp. στις δύο ατμόσφαιρες, ενώ η παρουσία των *Shewanella* spp. προκαλεί σημαντική αύξηση του ρυθμού αύξησης των *L. monocytogenes* σε αερόβιες συνθήκες (Σχ. 5.6α) και μείωση του ρυθμού αύξησης των *L. monocytogenes* σε συνθήκες MAP (Σχ. 5.6β).

Ο ρυθμός αύξησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων βρέθηκε να είναι μικρότερος στη συγκαλλιέργεια Lab-L (1,079 ημέρες⁻¹) σε σχέση με τη μονοκαλλιέργεια (1,101

ημέρες⁻¹) σε αερόβιες συνθήκες. Ο ρυθμός αύξησης του παθογόνου αυξήθηκε από 0,242 ημέρες⁻¹ στη μονοκαλλιέργεια σε 0,290 ημέρες⁻¹ στη συγκαλλιέργεια Lab-L, σε αερόβιες συνθήκες. Επομένως, φαίνεται ότι τα *L. monocytogenes* παρεμποδίζουν την αύξηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ενώ η παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων φαίνεται να προκαλεί αύξηση του ρυθμού αύξησης του *L. monocytogenes* (Σχ. 5.7α).

Σε συνθήκες MAP, ο ρυθμός αύξησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων βρέθηκε να είναι μεγαλύτερος στη συγκαλλιέργεια Lab-L (0,842 ημέρες⁻¹) σε σχέση με τη μονοκαλλιέργεια (0,779 ημέρες⁻¹). Ο ρυθμός αύξησης του παθογόνου βρέθηκε να είναι περίπου 5 φορές μικρότερος στη συγκαλλιέργεια (0,135 ημέρες⁻¹) σε σχέση με τη μονοκαλλιέργεια (0,676 ημέρες⁻¹). Επομένως, φαίνεται ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρεμποδίζουν την αύξηση του παθογόνου, ενώ η παρουσία του παθογόνου φαίνεται να προκαλεί αύξηση του ρυθμού αύξησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε MAP (Σχ. 5.7β).

Κατά τη συγκαλλιέργεια των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (Ps-Sh-Lab) παρατηρήθηκαν μεταβολές στην αύξησή τους σε σχέση με τις μονοκαλλιέργειες (Σχ. 5.8). Ο ειδικός ρυθμός αύξησης όλων των μικροοργανισμών στη συγκαλλιέργεια Ps-Sh-Lab ήταν χαμηλότερος σε σχέση με τις μονοκαλλιέργειες σε αερόβιες συνθήκες (Πίν. 5.4&5.5). Στη συσκευασία MAP, ο ειδικός ρυθμός αύξησης των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, *Pseudomonas* spp. και *Shewanella* spp., ήταν χαμηλότερος σε σχέση με τις μονοκαλλιέργειες, ενώ ο ειδικός ρυθμός αύξησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν υψηλότερος σε σχέση με τις μονοκαλλιέργειες (Πίν. 5.4&5.5).

Κατά τη συγκαλλιέργεια όλων των μικροοργανισμών (Ps-Sh-Lab-L) παρατηρήθηκαν επίσης μεταβολές στην αύξησή τους σε σχέση με τις μονοκαλλιέργειες

(Σχ. 5.9). Ο ειδικός ρυθμός αύξησης των *Pseudomonas* spp., οξυγαλακτικών βακτηρίων και *L. monocytogenes* ήταν μεγαλύτερος στη συγκαλλιέργεια σε σχέση με τις μονοκαλλιέργειες, ενώ ο ρυθμός αύξησης των *Shewanella* spp. ήταν μικρότερος, σε αερόβιες συνθήκες. Σε συνθήκες MAP, τα *Pseudomonas* spp. και το *L. monocytogenes* παρουσίασαν μικρότερο ρυθμό αύξησης, τα *Shewanella* spp. παρουσίασαν μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια αυξάνονταν με τον ίδιο ρυθμό σε σχέση με τις μονοκαλλιέργειες ($p>0.05$) (Πίν. 5.4&5.5).

Επιπλέον, κατά τη συγκαλλιέργεια όλων των μικροοργανισμών (Ps-Sh-Lab-L) παρατηρήθηκαν μεταβολές στην αύξηση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε σχέση με την αύξησή τους στη συγκαλλιέργεια Ps-Sh-Lab (Σχ. 5.8&5.9). Ο ειδικός ρυθμός αύξησης των *Pseudomonas* spp. και των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν μεγαλύτερος στη συγκαλλιέργεια Ps-Sh-Lab-L σε σχέση με τη συγκαλλιέργεια με τους αλλοιωγόνους μόνο (Ps-Sh-Lab) σε αερόβιες συνθήκες. Αντίθετα, ο ειδικός ρυθμός αύξησης των *Shewanella* spp. ήταν μικρότερος στη συγκαλλιέργεια Ps-Sh-Lab-L σε σχέση με τη συγκαλλιέργεια με τους αλλοιωγόνους μόνο (Ps-Sh-Lab) (Πίν. 5.4&5.5). Επομένως, φαίνεται ότι η παρουσία του *L. monocytogenes* ευνοεί την αύξηση των *Pseudomonas* spp. και των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ενώ παρεμποδίζει την αύξηση των *Shewanella* spp. στα μοντέλα στη συσκευασία αέρα. Πράγματι, το *L. monocytogenes* φαίνεται να προκαλεί αύξηση του ρυθμού αύξησης των *Pseudomonas* spp. στη συγκαλλιέργεια Ps-L και μείωση του ρυθμού αύξησης των *Shewanella* spp. στη συγκαλλιέργεια Sh-L στη συσκευασία αέρα. Αντίθετα, το *L. monocytogenes* προκαλεί μείωση του ρυθμού αύξησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στη συγκαλλιέργεια Lab-L σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης.

Στη συσκευασία σε MAP, ο ειδικός ρυθμός αύξησης των *Pseudomonas* spp. και των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν μικρότερος, ενώ ο ειδικός ρυθμός αύξησης των *Shewanella* spp. ήταν μεγαλύτερος, στη συγκαλλιέργεια Ps-Sh-Lab-L σε σχέση με τη συγκαλλιέργεια με τους αλλοιωγόνους μόνο (Ps-Sh-Lab). Επομένως, φαίνεται ότι η παρουσία του *L. monocytogenes* παρεμποδίζει την αύξηση των *Pseudomonas* spp. και των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ενώ προκαλεί αύξηση του ρυθμού αύξησης των *Shewanella* spp. στα μοντέλα στη συσκευασία MAP. Πράγματι, το *L. monocytogenes* προκαλεί μείωση του ρυθμού αύξησης των *Pseudomonas* spp. στη συγκαλλιέργεια Ps-L στο MAP. Αντίθετα, το *L. monocytogenes* προκαλεί αύξηση του ρυθμού αύξησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στη συγκαλλιέργεια Lab-L και μείωση του ρυθμού αύξησης των *Shewanella* spp. στη συγκαλλιέργεια Sh-L στο MAP. Η διαφορετική συμπεριφορά των μικροοργανισμών αυτών στη συγκαλλιέργεια Ps-Sh-Lab-L σε σχέση με τη συγκαλλιέργεια Ps-Sh-Lab φαίνεται να οφείλεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών εξαιτίας της παρουσίας του *L. monocytogenes*.

Φάση προσαρμογής παρατηρήθηκε στις περισσότερες περιπτώσεις συγκαλλιέργειας των μικροοργανισμών στα μοντέλα που συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες και σε λιγότερες περιπτώσεις στους μικροοργανισμούς στα μοντέλα που συντηρήθηκαν σε συνθήκες MAP. Η μεγαλύτερη φάση προσαρμογής παρατηρήθηκε κατά την αύξηση του *L. monocytogenes* και στις δύο ατμόσφαιρες. Η φάση προσαρμογής του παθογόνου ήταν 6,19 και 4,67 ημέρες στη συγκαλλιέργεια με τα *Shewanella* spp., σε αερόβιες συνθήκες και σε συνθήκες MAP αντίστοιχα.

Συμπερασματικά στις συγκαλλιέργειες του κάθε αλλοιωγόνου με το παθογόνο σε σχέση με τις μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα παρατηρείται ότι η αύξηση του *L. monocytogenes* α) παρεμποδίζεται στη συγκαλλιέργεια με τα *Pseudomonas* spp. και

στις δύο ατμόσφαιρες, β) ευνοείται στη συγκαλλιέργεια με τα *Shewanella* spp. σε αερόβιες συνθήκες και παρεμποδίζεται στη συγκαλλιέργεια με τα *Shewanella* spp. σε συνθήκες MAP και γ) ευνοείται στη συγκαλλιέργεια με τα οξυγαλακτικά βακτήρια σε αερόβιες συνθήκες και παρεμποδίζεται στη συγκαλλιέργεια με αυτά σε συνθήκες MAP.

Στις συγκαλλιέργειες όλων των αλλοιωγόνων με το παθογόνο σε σχέση με τις μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα παρατηρείται ότι η αύξηση του *L. monocytogenes* ευνοείται σε αερόβιες συνθήκες, ενώ παρεμποδίζεται σε συνθήκες MAP. Όσον αφορά την αύξηση των αλλοιωγόνων στις συγκαλλιέργειες όλων των αλλοιωγόνων με το παθογόνο σε σχέση με τις μονοκαλλιέργειες, τα *Pseudomonas* spp. και τα οξυγαλακτικά βακτήρια ευνοούνται, ενώ η αύξηση των *Shewanella* spp. παρεμποδίζεται σε αερόβιες συνθήκες. Σε συνθήκες MAP, η αύξηση των *Pseudomonas* spp. παρεμποδίζεται, των *Shewanella* spp. ευνοείται ενώ των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν ευνοείται και ούτε παρεμποδίζεται.

Το pH παρουσίασε ουσιαστική αύξηση (0,5-1,0) στα μοντέλα που αποθηκεύθηκαν σε αερόβιες συνθήκες σε σχέση με τα μοντέλα σε συνθήκες MAP (Σχ. 5.5-5.9). Η αύξηση του pH φαίνεται να συμπίπτει με την αύξηση του πληθυσμού των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, κυρίως των *Pseudomonas* spp. και *Shewanella* spp. (Σχ. 5.5α, 5.8α, 5.9α). Οι μεταβολές στον πληθυσμό του παθογόνου φαίνεται να μην επηρεάζουν ιδιαίτερα το pH, παρά μόνο στις περιπτώσεις όπου η παρουσία του παθογόνου βρέθηκε να ευνοεί κυρίως την αύξηση των *Pseudomonas* spp.

5.4 Συζήτηση

Η συμπεριφορά των μικροοργανισμών στα τρόφιμα όπως είναι τα φιλέτα ιχθύος τσιπούρας φαίνεται να αποτελεί ένα σύνθετο φαινόμενο. Οι σχέσεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των μικροοργανισμών στα φιλέτα ιχθύος τσιπούρας έγιναν πιο κατανοητές με τη μελέτη αυτών στις μονοκαλλιέργειες και στις συγκαλλιέργειες στα υποστρώματα μοντέλα. Η συγκαλλιέργεια μεταξύ των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών αλλά και αυτών με το *L. monocytogenes* σε στερεά μοντέλα υποστρώματα ιχθύος έδειξε ότι ο ένας μικροοργανισμός επηρεάζει την αύξηση του άλλου.

Η συμπεριφορά των μικροοργανισμών στα μοντέλα υποστρώματα ήταν παρόμοια με τη συμπεριφορά των μικροοργανισμών στα φιλέτα σε αρκετές περιπτώσεις. Η αύξηση των *Pseudomonas* spp. και των οξυγαλακτικών βακτηρίων ευνοήθηκε εξαιτίας της παρουσίας του παθογόνου σε αερόβιες συνθήκες, ενώ παρεμποδίστηκε από την παρουσία του παθογόνου σε συνθήκες MAP, στην συγκαλλιέργεια όλων των αλλοιωγόνων με το παθογόνο (Ps-Sh-Lab-L) στα μοντέλα και στα φιλέτα. Η αύξηση των *Shewanella* spp. παρεμποδίστηκε από την παρουσία του παθογόνου στη συγκαλλιέργεια όλων των αλλοιωγόνων με το παθογόνο (Ps-Sh-Lab-L) στα μοντέλα και στα φιλέτα σε αερόβιες συνθήκες. Σε συνθήκες MAP, η αύξηση των *Shewanella* spp. παρεμποδίστηκε από την παρουσία του παθογόνου στα φιλέτα, ενώ ευνοήθηκε από την παρουσία του παθογόνου στα μοντέλα στην περίπτωση της συγκαλλιέργεια όλων των αλλοιωγόνων με το παθογόνο (Ps-Sh-Lab-L). Επομένως, το *L. monocytogenes* επηρεάζει την αύξηση των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα φιλέτα ιχθύος τσιπούρας σε συσκευασία αέρα και MAP με τη συγκεκριμένη σύνθεση αερίων. Οι Mellefont *et al.* (2008) αναφέρουν ότι η αύξηση μικροοργανισμών όπως *P. fluorescens* και οξυγαλακτικών βακτηρίων όπως το *L.*

plantarum επηρεάζεται από την αύξηση του *L. monocytogenes* και το αντίστροφο κατά τη συγκαλλιέργεια του καθενός με το παθογόνο σε θρεπτικούς ζωμούς στους 25°C. Συγκεκριμένα, αναφέρουν ότι η τύχη των μικροοργανισμών εξαρτάται από τον αρχικό πληθυσμό με τον οποίο πραγματοποιείται ο ενοφθαλμισμός στη συγκαλλιέργεια και ο μικροοργανισμός που θα φθάσει πρώτος στη στατική φάση ‘καταπιέζει’ την αύξηση του άλλου (Jameson effect). Στην παρούσα διατριβή ‘Jameson effect’ φαίνεται να ισχύει στις συγκαλλιέργειες Ps-L, Sh-L σε αερόβιες συνθήκες, όπου τα *Pseudomonas* spp. και *Shewanella* spp. αντίστοιχα, φθάνουν πρώτα στη στατική φάση και φαίνεται να αναστέλουν έτσι την αύξηση του παθογόνου, καθώς και στη συγκαλλιέργεια Lab-L σε συνθήκες MAP, όπου τα οξυγαλακτικά φθάνουν πρώτα στη στατική φάση και αναστέλουν ξεκάθαρα την αύξηση του παθογόνου. Δεν υπάρχουν μελέτες, στις οποίες να έχει διελευκανθεί η επίδραση του *L. monocytogenes* στην αύξηση των εν λόγω αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε παρόμοιες συνθήκες με της παρούσας μελέτης.

Οι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί των φιλέτων ιχθύος τσιπούρας βρέθηκε να επηρεάζουν την αύξηση του *L. monocytogenes*. Στα μοντέλα, τα *Pseudomonas* spp. παρεμπόδισαν την αύξηση του *L. monocytogenes* στη συγκαλλιέργεια Ps-L και στις δύο ατμόσφαιρες. Οι Buchanan and Bagi (1999) σε πειράματα σε θρεπτικούς ζωμούς αναφέρουν περιορισμό του πληθυσμού του *L. monocytogenes* από τα *Pseudomonas* spp. σε χαμηλή θερμοκρασία και καλές συνθήκες αερισμού. Τα *Pseudomonas* spp., ιδιαίτερα αυτά που προέρχονται από το υδάτινο περιβάλλον, είναι ικανά να παράγουν σιδηροφόρες ουσίες (χειλικές ενώσεις) και να παρεμποδίσουν την αύξηση των υπόλοιπων μικροοργανισμών υπό συνθήκες μειωμένου σιδήρου κυρίως όταν ο πληθυσμός τους φθάσει στα επίπεδα των 8 log cfu/g (Gram & Melchiorson 1996). Τα *Pseudomonas* spp. στη σάρκα των ιχθύων παράγουν σιδηροφόρες ουσίες έναντι των

άλλων μικροοργανισμών (Gram 1993, Gram & Melchiorson 1996, Gram *et al.* 2002), υπό πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σιδήρου ($1-2 \mu\text{mol l}^{-1}$, Gram 1994). Επιπλέον, τα *Pseudomonas* spp., ιδιαίτερα τα φθορίζοντα στελέχη, εκτός των σιδηροφόρων ενώσεων, παράγουν ταυτόχρονα διάφορες άλλες αντιμικροβιακές ουσίες (π.χ. αντιβιοτικά) έναντι των άλλων μικροοργανισμών (Ellis *et al.* 2000).

Παρόλα αυτά, στα φιλέτα σε συνθήκες αέρα όπου τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τον κυρίαρχο μικροοργανισμό, η αύξηση του παθογόνου ευνοήθηκε. Η συμπεριφορά αυτή του παθογόνου φαίνεται να συνδέεται με την παρουσία των άλλων μικροοργανισμών που μελετήθηκαν (*Shewanella* spp. και οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία ευνόησαν την αύξηση του παθογόνου στις συγκαλλιέργειες Sh-L και Lab-L) καθώς και άλλων αναγνωρισμένων ή όχι μικροοργανισμών που δεν μελετήθηκαν στα φιλέτα σε συσκευασία αέρα, οι οποίοι ευνοούν την αύξηση του παθογόνου. Η συμπεριφορά αυτή των εν λόγω μικροοργανισμών μένει να διελευκανθεί.

Η αποθήκευση σε MAP βρέθηκε να επηρεάζει την αύξηση των μικροοργανισμών καθώς και τις σχέσεις αλληλεπίδρασης μεταξύ τους, σε σχέση με την αποθήκευση σε αερόβιες συνθήκες. Η αποθήκευση σε MAP βρέθηκε να επιδρά στην αύξηση των *Pseudomonas* spp., των *Shewanella* spp. και των οξυγαλακτικών βακτηρίων, πράγμα το οποίο διαπιστώθηκε και από τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου. Παρόλα αυτά, τα *Pseudomonas* spp. παρουσίασαν τον υψηλότερο τελικό πληθυσμό σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Επιπλέον, η αποθήκευση σε MAP βρέθηκε να επιδρά και στην αύξηση του παθογόνου. Το παθογόνο παρουσίασε μικρότερο ειδικό ρυθμό αύξησης στα φιλέτα σε MAP σε σχέση με την αποθήκευση σε συσκευασία αέρα. Παρόλα αυτά, βρέθηκε σε λίγο μεγαλύτερα επίπεδα από αυτά που παρατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες, στη συσκευασία MAP σε σχέση με τη

συσκευασία αέρα. Το γεγονός αυτό φαίνεται να έχει άμεση σχέση με την πτώση των πληθυσμών των *Pseudomonas* spp. και των *Shewanella* spp. εξαιτίας της επίδρασης του MAP στην αύξησή τους. Επομένως, είναι ξεκάθαρο το γεγονός ότι η συγκεκριμένη σύνθεση αερίων μπορεί να επιτρέψει την αύξηση του *L. monocytogenes* σε επίπεδα λίγο μεγαλύτερα από αυτά που παρατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες, παρόλο που το MAP μείωσε τον ειδικό ρυθμό αύξησης του παθογόνου. Πράγματι, η μείωση οξυγόνου στη συσκευασία MAP έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες και τη δημιουργία πιο ευνοϊκού περιβάλλοντος για την αύξηση άλλων μικροοργανισμών, όπως είναι οι παθογόνοι (Farber 2001). Από την άλλη, στην παρούσα διατριβή, τα οξυγαλακτικά βακτήρια βρέθηκε να παρεμποδίζουν την αύξηση του παθογόνου σε συνθήκες MAP. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν στο Κεφάλαιο 3, η κυρίαρχη μικροβιακή σύνθεση των φιλέτων που αποθηκεύθηκαν σε MAP στους 5°C, αποτελούνταν από είδη/στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (*C. maltaromaticum*, *L. fuchuisis*, *C. divergens*) σε ποσοστό 45,5% επί της συνολικής μικροβιακής σύνθεσης, με κυρίαρχο το *C. maltaromaticum* strain MMF-32. Στα αλιευτικά προϊόντα, η παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων ως κυρίαρχος πληθυσμός παρεμποδίζει την αύξηση του *L. monocytogenes* (Dalgaard & Jorgensen 1998, Ghalfi *et al.* 2006, Nilsson *et al.* 1999, Brillet *et al.* 2004, Giménez & Dalgaard 2004, Nilsson *et al.* 2004). Η παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα αλιεύματα είναι δυνατόν παρεμποδίσει την αύξηση του *L. monocytogenes* είτε παράγοντας βακτηριοσίνες έναντι του παθογόνου ή εκδηλώνοντας ανταγωνιστικούς μηχανισμούς για την προσκόλλησή τους στο υπόστρωμα. Τέτοιου τύπου αλληλεπιδράσεις έχουν αναφερθεί κατά τη μελέτη αυτών των μικροοργανισμών τόσο σε στείρα υποστρώματα ιχθύος, όσο και σε καπνιστό

σολομό με τη φυσική του μικροβιακή σύνθεση (Dalgaard & Jorgensen 1998, Brillet *et al.* 2004, Ghalfi *et al.* 2006, Nilsson *et al.* 1999, Giménez & Dalgaard 2004, Nilsson *et al.* 2004). Οι Brillet *et al.* (2004) μελετώντας τη δράση των μικροοργανισμών αυτών σε στείρα υποστρώματα καπνιστού σολομού αποθηκευμένα σε κενό και σε χαμηλές θερμοκρασίες, αναφέρουν ότι τα στελέχη *C. divergens* V41 και *C. piscicola* V1 (*C. maltaromaticum*) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προστατευτικές καλλιέργειες έναντι του παθογόνου *L. monocytogenes*. Κατά Andersen (1995), τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται ως προστατευτικές καλλιέργειες σε επίπεδα μεταξύ 5-7 log cfu/g. Οι Giménez & Dalgaard (2004) αναφέρουν ότι τα οξυγαλακτικά, Enterobacteriaceae, Εντερόκοκκοι και *P. phosphoreum*, ως κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί, σε συγκυριαρχία με το *L. monocytogenes* σε στείρο καπνιστό σολομό, περιορίζουν σημαντικά την αύξηση του παθογόνου. Συγκεκριμένα, αναφέρουν ότι ο πληθυσμός του παθογόνου έφτασε το επίπεδο των 8 log cfu/g σε μονοκαλλιέργεια, ενώ κυμάνθηκε μεταξύ 2-4 log cfu/g όταν βρισκόταν σε συγκαλλιέργεια με τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς. Η κυριαρχία των οξυγαλακτικών βακτηρίων αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα που εμποδίζει την αύξηση του παθογόνου αυτού σε ιχθύες σολομού υπό τις παραπάνω συνθήκες. Επιπλέον, έχει αναφερθεί αποτελεσματική παρεμπόδιση παθογόνων μικροοργανισμών στην περίπτωση όπου η φυσική μικροβιακή σύνθεση σε μοσχαρίσιο κιμά αποτελούνταν κατά 80% από οξυγαλακτικά βακτήρια (Vold *et al.* 2000). Επομένως, μία νέα συσκευασία με χαμηλότερη συγκέντρωση σε οξυγόνο είναι δυνατόν να ευνοήσει περισσότερο την αύξηση των οξυγαλακτικών ή/και άλλων θετικών κατά Gram αλλοιωγόνων βακτηρίων (π.χ. *B. thermosphacta*), με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της αύξησης του παθογόνου και τη διατήρηση του πληθυσμού του σε χαμηλότερα επίπεδα. Οι Tsigarida *et al.* (2000), μελετώντας την

επίδραση της συσκευασίας σε κενό (vacuum packaging), σε MAP (40%CO₂/ 30%O₂/ 30%N₂) και σε αέρα στην αύξηση/επιβίωση του *L. monocytogenes* σε ιστό βόειου κρέατος, παρατήρησαν ότι όταν τα *Pseudomonas* spp. αποτελούσαν τον κυρίαρχο πληθυσμό (στην αερόβια συσκευασία και σε MAP/ VP σε υψηλής διαπερατότητας φιλμ) ευνοούνταν η αύξηση του παθογόνου. Σε άλλες όμως συνθήκες (MAP/ VP με χαμηλής διαπερατότητας φιλμ) όπου ο κυρίαρχος πληθυσμός ήταν ο *B. thermosphacta*, δεν παρατηρήθηκε αύξηση του παθογόνου.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω (αποτελέσματα παρούσας διατριβής και βιβλιογραφική ανασκόπηση), η αποθήκευση των φιλέτων σε ατμόσφαιρα η οποία θα ευνοούσε περισσότερο την αύξηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, θα μπορούσε να βελτιώσει την ασφάλεια του προϊόντος. Σε μια τέτοια περίπτωση θα πρέπει να ξαναεκτιμηθεί η συνολική επίδραση της νέας ατμόσφαιρας, ίσως με λιγότερο οξυγόνο, στη μικροβιακή αλληλουχία και στον εμπορικό χρόνο ζωής.

Πίνακας 5.1. Συνδυασμοί συγκαλλιεργείων και κωδικοποίησή τους.

<i>Pseudomonas</i> spp. - <i>L. monocytogenes</i>	Ps-L
<i>Shewanella</i> spp. - <i>L. monocytogenes</i>	Sh-L
οξυγαλακτικά βακτήρια- <i>L. monocytogenes</i>	Lab-L
<i>Pseudomonas</i> spp.- <i>Shewanella</i> spp.- οξυγαλακτικά βακτήρια	Ps-Sh-Lab
<i>Pseudomonas</i> spp.- <i>Shewanella</i> spp.- οξυγαλακτικά βακτήρια- <i>L. monocytogenes</i>	Ps-Sh-Lab-L

Πίνακας 5.2. Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του *Listeria monocytogenes* σε φιλέτα τσιπούρας κατά τη συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες στους 5°C. Οι τιμές (μέσος όρος ± τυπ. απόκλιση 3 επαναλήψεων) εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

Μικροοργανισμοί	Φυσική μικροβιακή σύνθεση				Φυσική μικροβιακή σύνθεση και <i>Listeria</i>			
	Αρχικός πληθυσμός (log cfu/g±τυπ. απ.)	Τελικός πληθυσμός (Nmax)* (log cfu/g±τυπ. απ.)	lag± τυπ. απ. (d)*	μmax± τυπ. απ. (d ⁻¹)*	Αρχικός πληθυσμός (log cfu/g±τυπ. απ.)	Τελικός πληθυσμός (Nmax)* (log cfu/g±τυπ. απ.)	lag± τυπ. απ. (d)*	μmax± τυπ. απ. (d ⁻¹)*
Βακτήρια που παράγουν H ₂ S	3,35±0,11	7,27±0,09 (7,48±0,05)	0	0,656±0,02	3,81±0,08	7,92±0,02 (>8,20)	0	0,544±0,04
<i>Pseudomonas</i> spp.	4,40±0,07	9,17±0,05 (9,13±0,03)	0	0,827±0,02	3,62±0,17	9,05±0,03 (9,02±0,05)	0	1,010±0,03
Enterobacteriaceae	3,06±0,05	7,14±0,05 (7,10±0,05)	1,67±0,10	1,142±0,07	3,56±0,19	6,81±0,08 (>6,81)	1,93±0,64	0,531±0,05
Οξυγαλακτικά βακτήρια	1,87±0,12	5,78±0,13 (>5,63)	0	0,489±0,05	1,87±0,07	6,06±0,06 (>5,81)	0	0,500±0,07
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<2,00	5,94±0,03 (5,90±0,03)	0	0,693±0,08	<2,00	5,78±0,17 (5,77±0,18)	0	0,674±0,04
<i>L. monocytogenes</i>	<2,00	<2,00	-	-	2,66±0,28	5,73±0,06 (>5,76)	0	0,393±0,02

* μmax: μέγιστος ρυθμός αύξησης, lag phase: φάση προσαρμογής, Nmax: μέγιστος τελικός πληθυσμός

Πίνακας 5.3. Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του *Listeria monocytogenes* σε φιλέτα τσιπούρας κατά τη συντήρηση υπό συνθήκες MAP στους 5°C. Οι τιμές (μέσος όρος ± τυπ. απόκλιση 3 επαναλήψεων) εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

Μικροοργανισμοί	Φυσική μικροβιακή σύνθεση				Φυσική μικροβιακή σύνθεση και <i>Listeria</i>			
	Αρχικός πληθυσμός (log cfu/g ± τυπ. απ.)	Τελικός πληθυσμός Nmax* (log cfu/g ± τυπ. απ.)	lag ± τυπ. απ. (d)*	μmax ± τυπ. απ. (d ⁻¹)*	Αρχικός πληθυσμός (log cfu/g ± τυπ. απ.)	Τελικός πληθυσμός Nmax* (log cfu/g ± τυπ. απ.)	lag ± τυπ. απ. (d)*	μmax ± τυπ. απ. (d ⁻¹)*
Βακτήρια που παράγουν H ₂ S	3,12±0,03	7,27±0,08 (7,32±0,19)	0,83±0,05	0,589±0,08	3,30±0,17	6,84±0,08 (>6,78)	3,03±0,03	0,484±0,04
<i>Pseudomonas</i> sp	3,03±0,05	7,31±0,08 (7,36±0,07)	0	0,579±0,04	3,03±0,06	6,58±0,14 (6,57±0,08)	0	0,409±0,03
Enterobacteriaceae	3,23±0,06	5,48±0,07 (>5,43)	0	0,225±0,03	2,84±0,07	4,97±0,03 (>5,06)	0	0,227±0,06
Οξυγαλακτικά βακτήρια	1,70±0,14	5,95±0,07 (6,11±0,03)	0	0,522±0,02	2,18±0,06	5,87±0,14 (5,99±0,09)	0	0,398±0,04
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	3,48±0,27	6,42±0,10 (6,41±0,18)	2,67±0,03	0,521±0,09	3,39±0,27	6,21±0,10 (6,22±0,03)	2,49±0,03	0,478±0,09
<i>L. monocytogenes</i>	<2,00	<2,00	-	-	2,83±0,08	5,92±0,03 (>5,70)	0	0,300±0,05

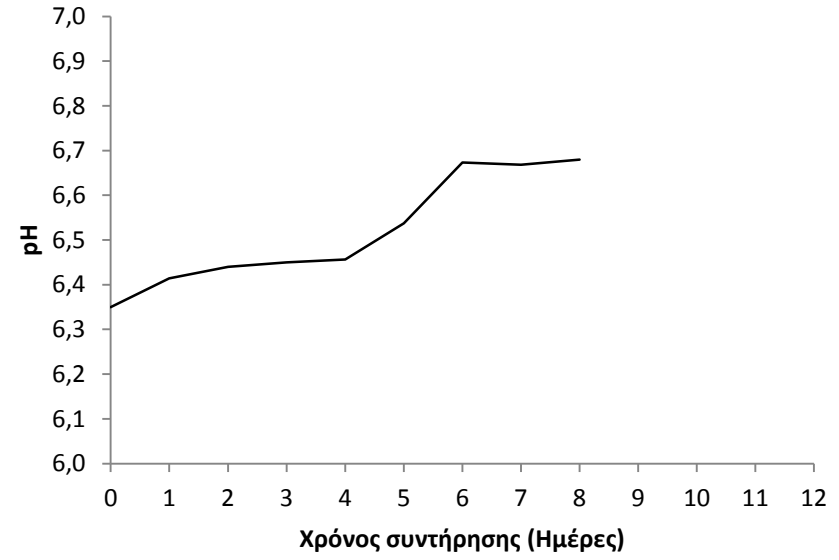
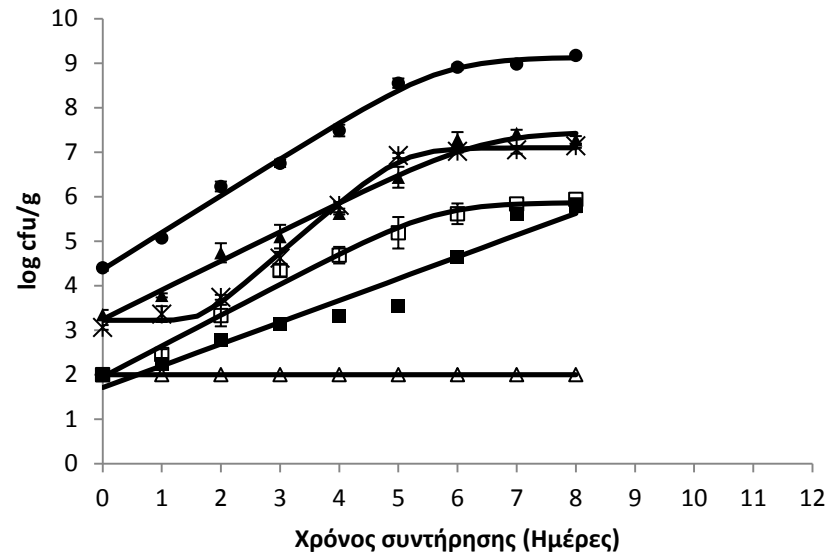
μmax: μέγιστος ρυθμός αύξησης, lag phase: φάση προσαρμογής, Nmax: μέγιστος τελικός πληθυσμός

Πίνακας 5.4. Κινητικές παράμετροι των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του *Listeria monocytogenes* σε μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP στους 5°C. Οι τιμές (μέσος όρος ± τυπ. απόκλιση 3 επαναλήψεων) εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

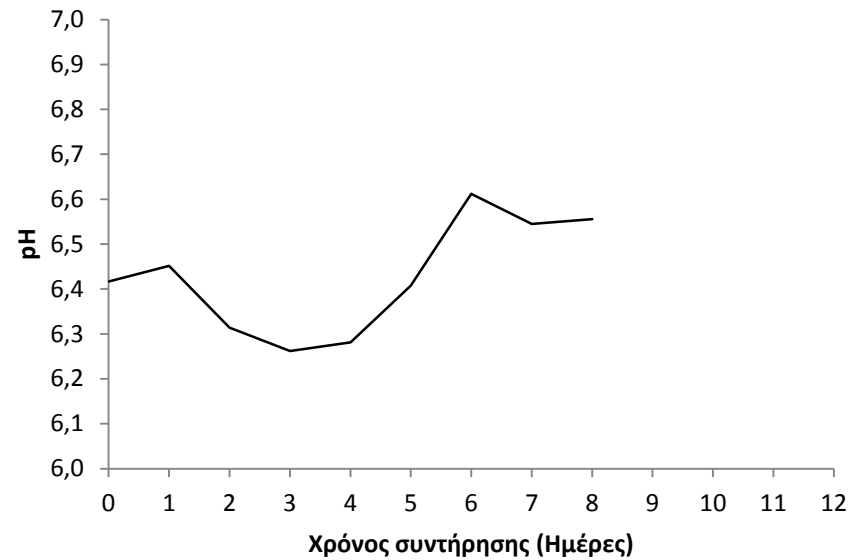
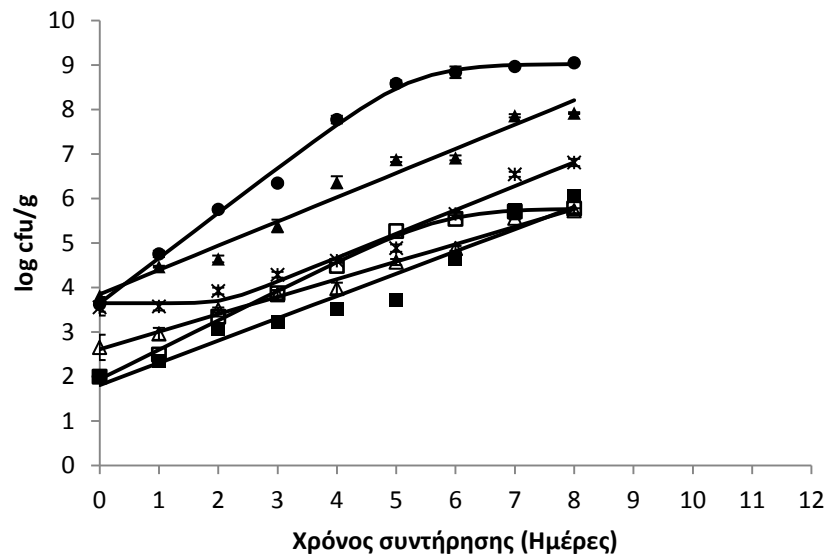
Μικροοργανισμοί	Αέρας				MAP		
	Αρχικός πληθυσμός (log cfu/g)	Τελικός πληθυσμός Nmax (log cfu/g±τυπ.απ.)	lag (d)	μmax (d ⁻¹)	Τελικός πληθυσμός Nmax (log cfu/g±τυπ.απ.)	lag±τυπ.απ. (d)	μmax±τυπ.απ. (d ⁻¹)
<i>Pseudomonas</i> spp.	3,96±0,09	9,33±0,08 (9,31±0,07)	0,39±0,05	1,173±0,02	8,77±0,10 (8,78±0,10)	0	0,677±0,01
<i>Shewanella</i> spp.	3,34±0,07	8,56±0,18 (8,54±0,23)	1,35±0,06	1,250±0,04	8,19±0,09 (8,17±0,05)	1,95±0,15	0,745±0,06
Οξυγαλακτικά	3,63±0,13	8,44±0,13 (8,21±0,11)	0	1,103±0,01	8,17±0,07 (7,98±0,06)	0	0,785±0,03
<i>L. monocytogenes</i>	3,25±0,04	5,14±0,02 (5,19±0,13)	0	0,242±0,03	5,13±0,04 (5,06±0,04)	4,26±0,12	0,676±0,11

Πίνακας 5.5. Κινητικές παράμετροι των μικροοργανισμών σε συγκαλλιέργεια σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP στους 5°C. Οι τιμές (μέσος όρος ± τυπ. απόκλιση 3 επαναλήψεων) εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

Μικροοργανισμοί		Αέρας			MAP		
Συγκαλλιέργεια	Αρχικός πληθυσμός (log cfu/g)	Τελικός πληθυσμός Nmax (log cfu/g)	lag (d)	μmax (d ⁻¹)	Τελικός πληθυσμός Nmax (log cfu/g)	lag (d)	μmax (d ⁻¹)
Ps (Ps-L)	3,30±0,27	9,31±0,02 (9,29±0,02)	1,29±0,07	1,188±0,06	7,67±0,05 (>7,80)	0	0,347±0,03
L (Ps-L)	3,25±0,04	4,36±0,07 (>4,35)	0	0,110±0,04	5,29±0,02 (>5,40)	0	0,213±0,02
Sh (Sh-L)	2,79±0,03	6,47±0,04 (6,33±0,03)	2,13±0,11	0,854±0,05	3,84±0,11 (3,80±0,04)	2,95±0,08	0,198±0,04
L (Sh-L)	3,00±0,02	3,92±0,06 (3,76±0,04)	6,19±0,13	1,819±0,07	5,19±0,09 (>5,30)	4,67±0,05	0,310±0,04
Lab (Lab-L)	3,14±0,09	9,03±0,09 (8,82±0,04)	0	1,079±0,04	8,82±0,06 (8,81±0,04)	1,46±0,06	0,842±0,03
L (Lab-L)	3,35±0,07	6,44±0,11 (>6,44)	0	0,290±0,04	4,50±0,08 (4,42±0,06)	0	0,135±0,05
Ps (Ps-Sh-Lab)	2,27±0,05	9,26±0,03 (9,09±0,02)	0,65±0,05	1,137±0,03	8,05±0,08 (8,09±0,06)	0	0,541±0,04
Sh (Ps-Sh-Lab)	3,34±0,07	8,16±0,05 (8,00±0,03)	2,17±0,10	1,134±0,07	8,74±0,11 (>9,17)	0	0,529±0,04
Lab (Ps-Sh-Lab)	3,05±0,08	8,47±0,14 (8,09±0,07)	0	0,919±0,05	7,77±0,11 (7,53±0,08)	1,40±0,10	0,991±0,03
Ps (Ps-Sh-Lab-L)	3,47±0,11	9,77±0,08 (9,41±0,05)	0	1,603±0,09	8,90±0,09 (>9,22)	0	0,524±0,03
Sh (Ps-Sh-Lab-L)	3,11±0,11	8,98±0,10 (8,88±0,06)	0,66±0,06	1,023±0,06	8,52±0,11 (8,54±0,07)	2,29±0,13	0,801±0,05
Lab (Ps-Sh-Lab-L)	3,14±0,15	8,80±0,02 (8,75±0,03)	0,29±0,04	1,177±0,08	8,70±0,14 (8,77±0,09)	2,05±0,11	0,785±0,06
L (Ps-Sh-Lab-L)	2,95±0,08	6,27±0,04 (>6,29)	0	0,346±0,04	5,01±0,06 (4,88±0,04)	1,82±0,09	0,460±0,04

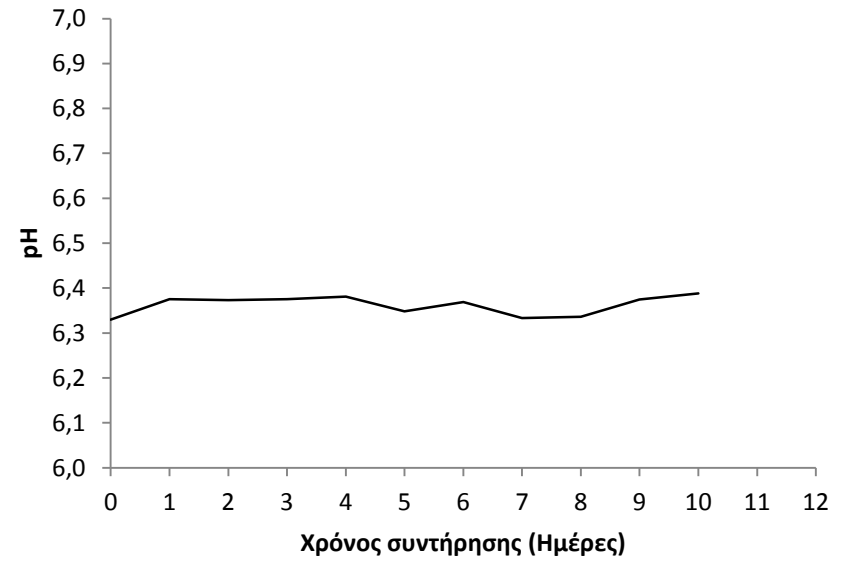
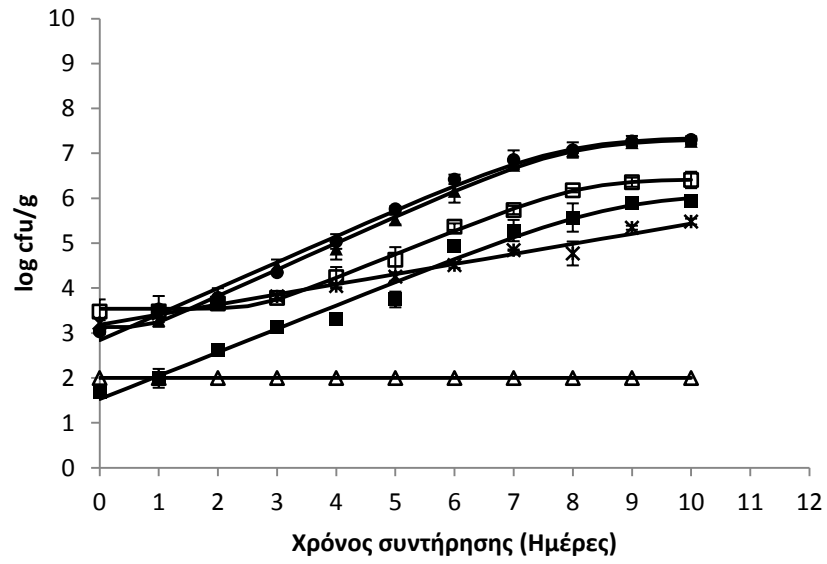


(α)

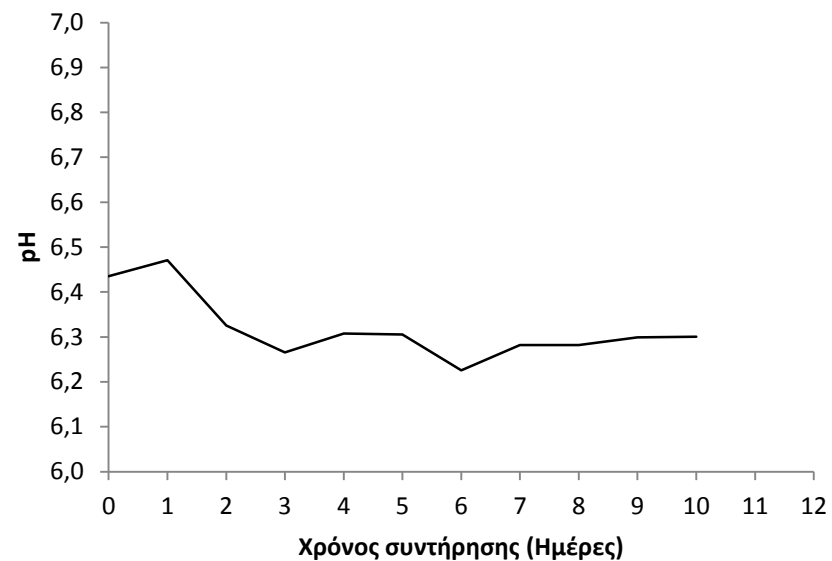
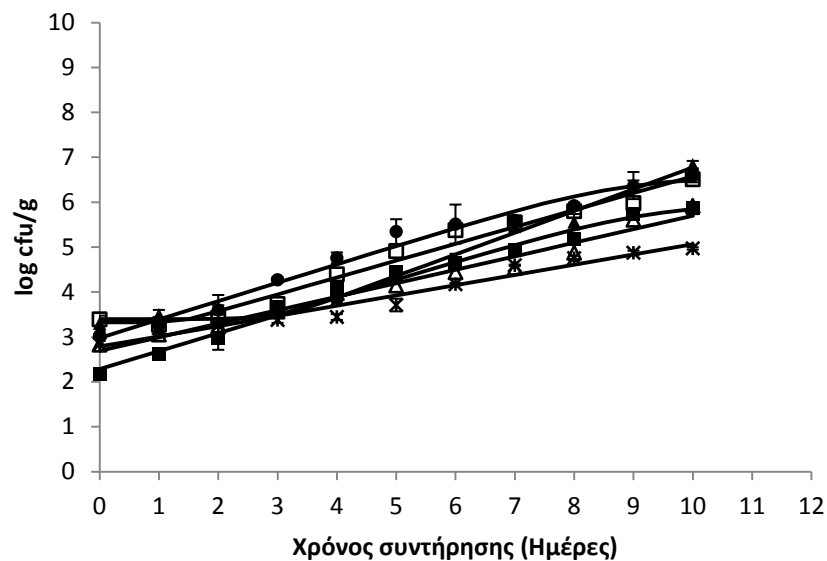


(β)

Σχήμα 5.1. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας (με τη φυσική τους μικροβιακή σύνθεση) (α) και σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας μετά τον ενοφθαλμισμό τους με *L. monocytogenes* (β) και μεταβολή του pH του μοντέλου υποστρώματος κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες συνθήκες στους 5°C. *Pseudomonas* spp. (●), βακτήρια που παράγουν H₂S (▲), *Brochothrix thermosphacta* (□), οξυγαλακτικά βακτήρια (■), Enterobacteriaceae (★) και *Listeria monocytogenes* (Δ).

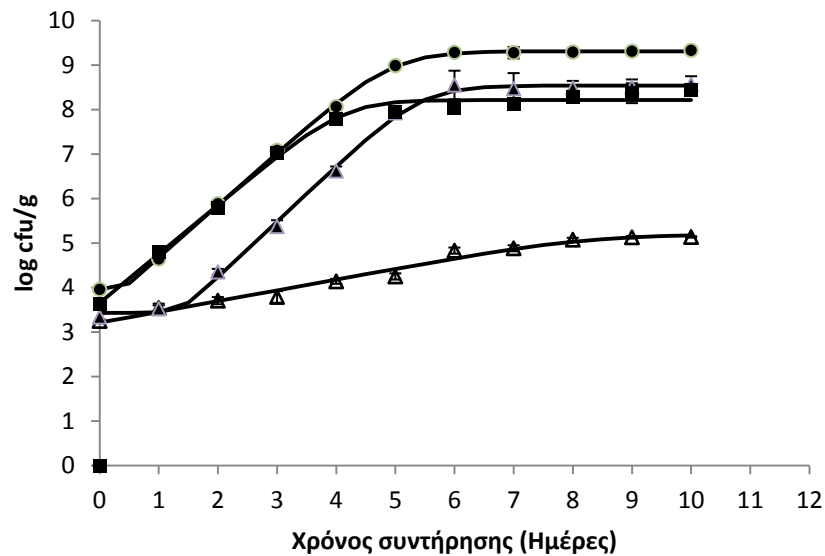


(α)

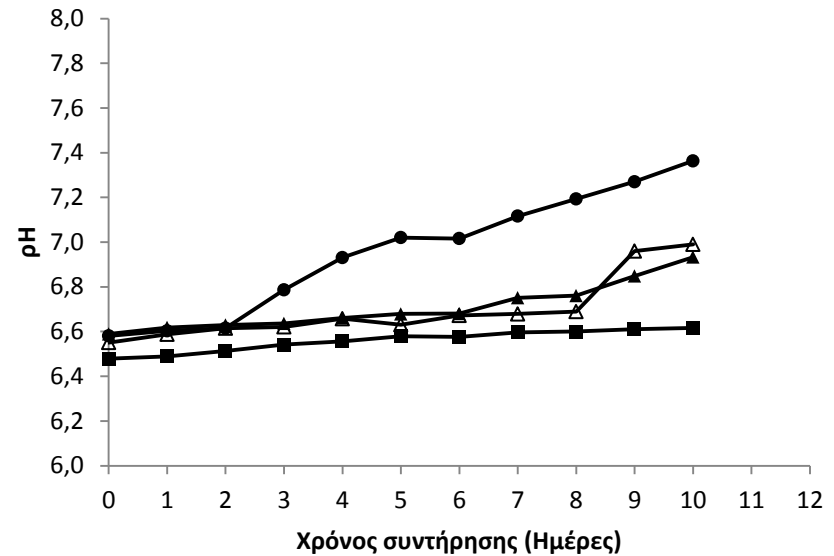


(β)

Σχήμα 5.2. Πληθυσμιακές μεταβολές των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας (με τη φυσική τους μικροβιακή σύνθεση) (α) και σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας μετά τον ενοφθαλμισμό τους με *L. monocytogenes* (β), και μεταβολή του pH του μοντέλου υποστρώματος κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε συνθήκες MAP στους 5°C, *Pseudomonas* spp. (●), βακτήρια που παράγουν H₂S (▲), *Brochothrix thermosphacta* (□), οξυγαλακτικά βακτήρια (■), Enterobacteriaceae (★) και *Listeria monocytogenes* (Δ).

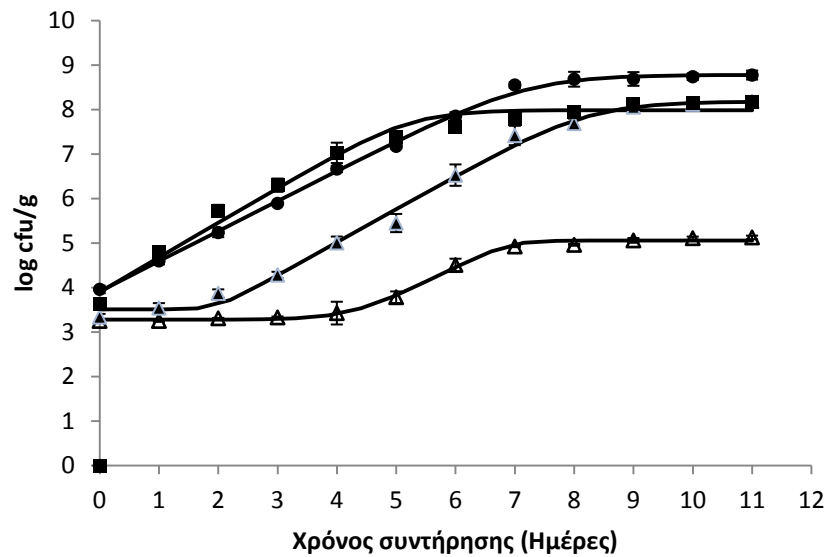


(α)

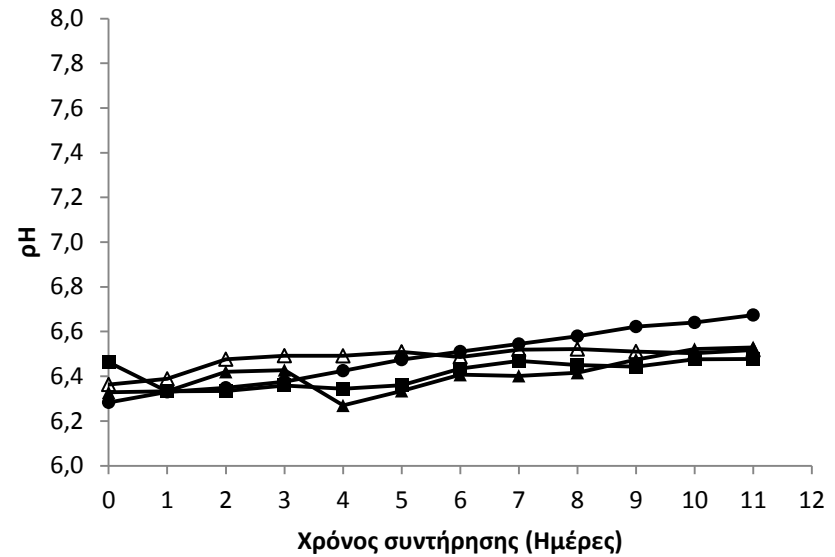


(β)

Σχήμα 5.3. Πληθυσμιακές μεταβολές (α) των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών ιχθύος τσιπούρας και του *Listeria monocytogenes* και μεταβολές του pH του υποστρώματος (β), μετά τον ενοφθαλμισμό τους ως μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες συνθήκες στους 5°C. *Pseudomonas* spp. (●), *Shewanella* spp. (▲), οξυγαλακτικά βακτήρια (■) και *Listeria monocytogenes* (Δ). Τα σημεία είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων.

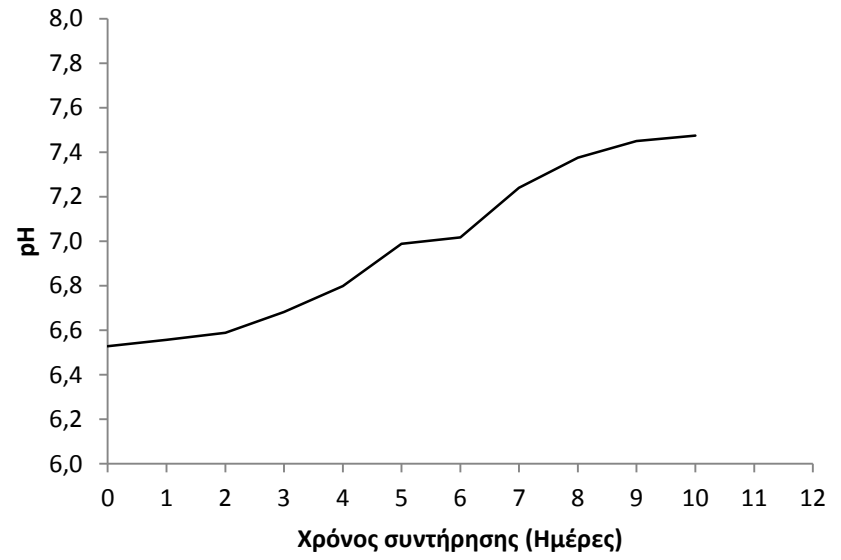
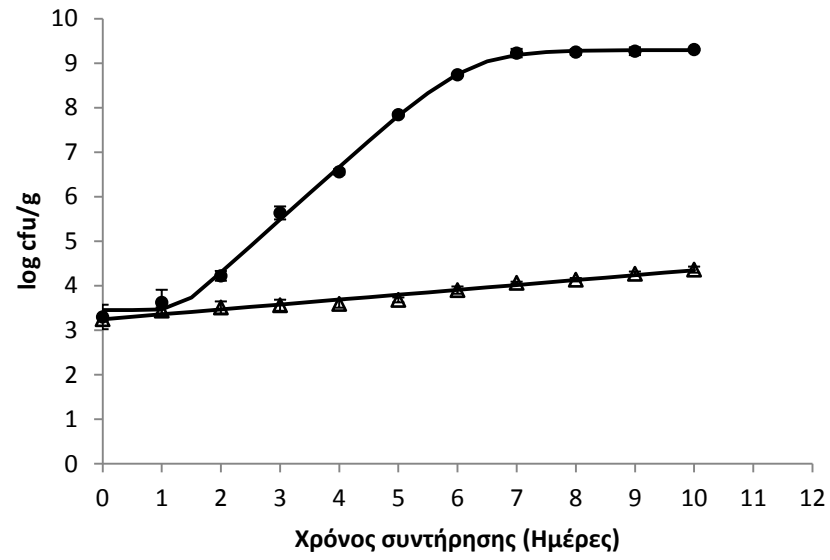


(α)

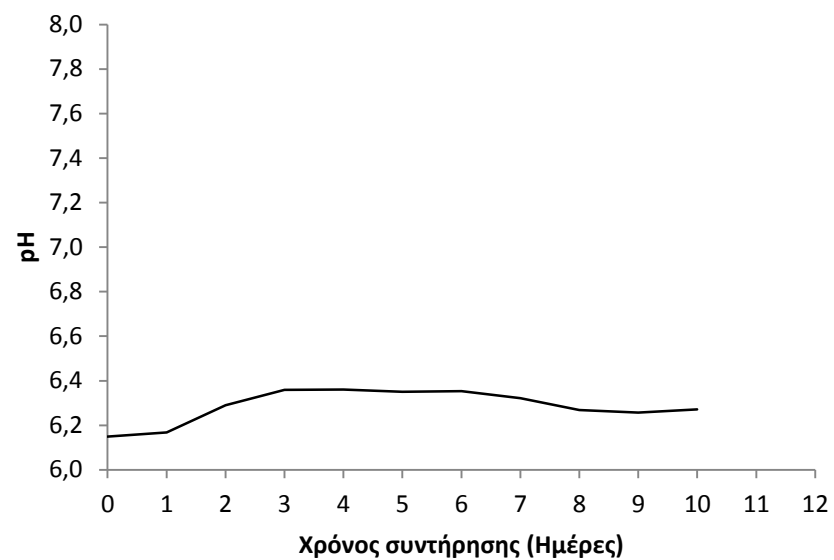
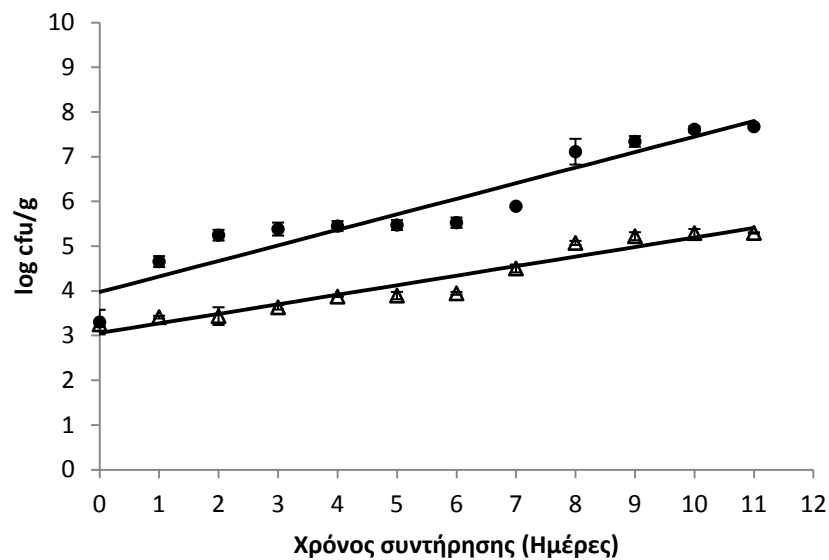


(β)

Σχήμα 5.4. Πληθυσμιακές μεταβολές (α) των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών ιχθύος τσιπούρας και του *Listeria monocytogenes* και μεταβολές του pH του υποστρώματος (β), μετά τον ενοφθαλμισμό τους ως μονοκαλλιέργειες σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε MAP στους 5°C. *Pseudomonas* spp. (●), *Shewanella* spp. (▲), οξυγαλακτικά βακτήρια (■) και *Listeria monocytogenes* (Δ). Τα σημεία είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων.

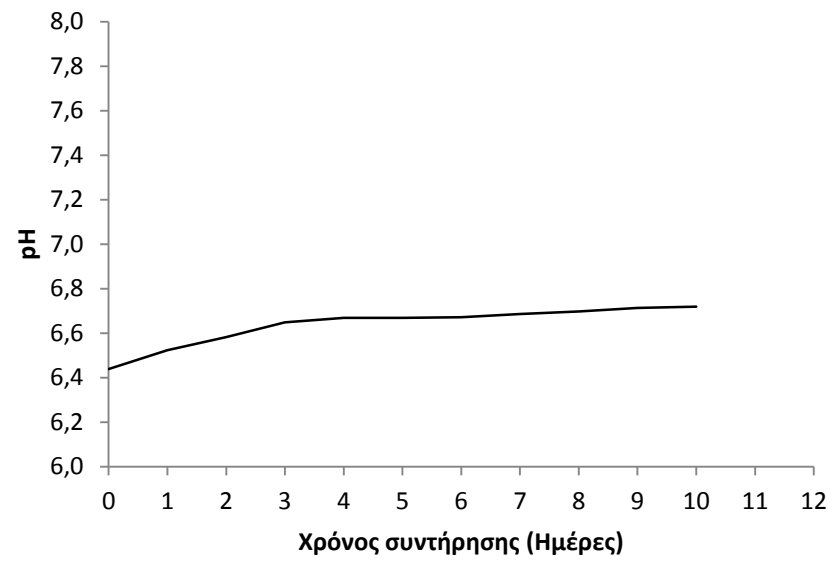
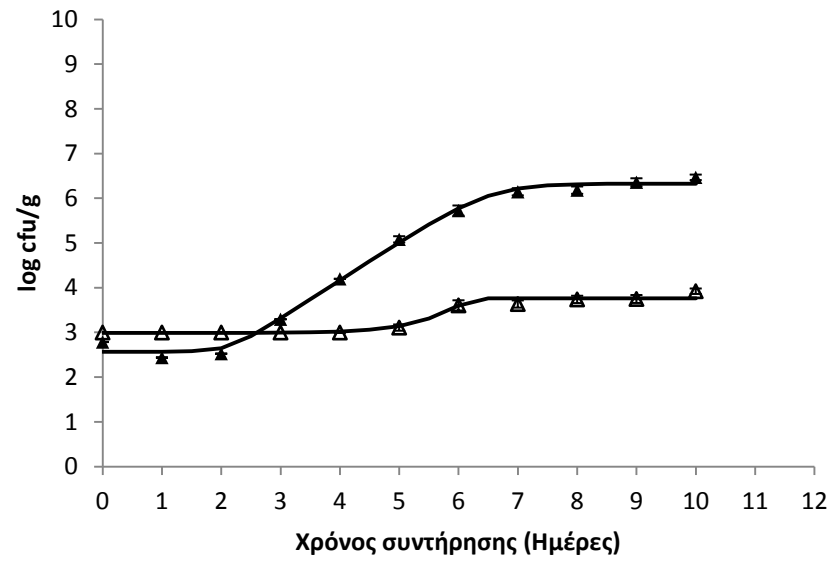


(α)

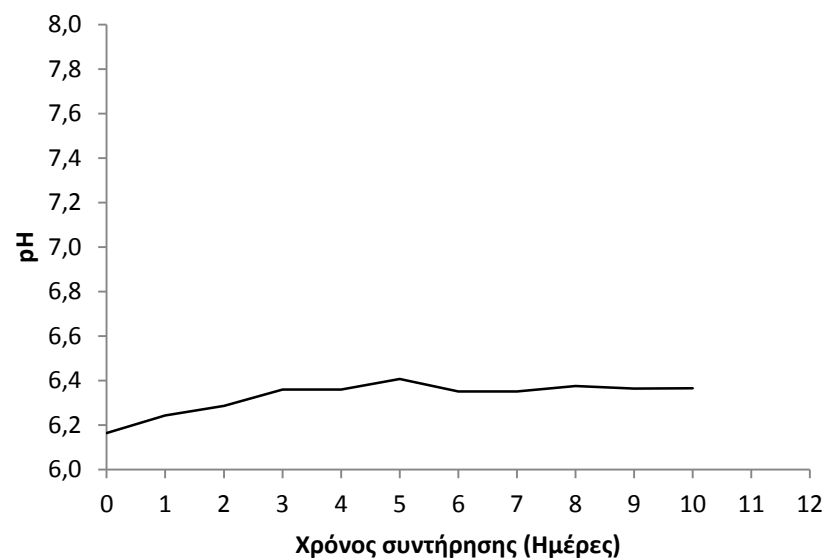
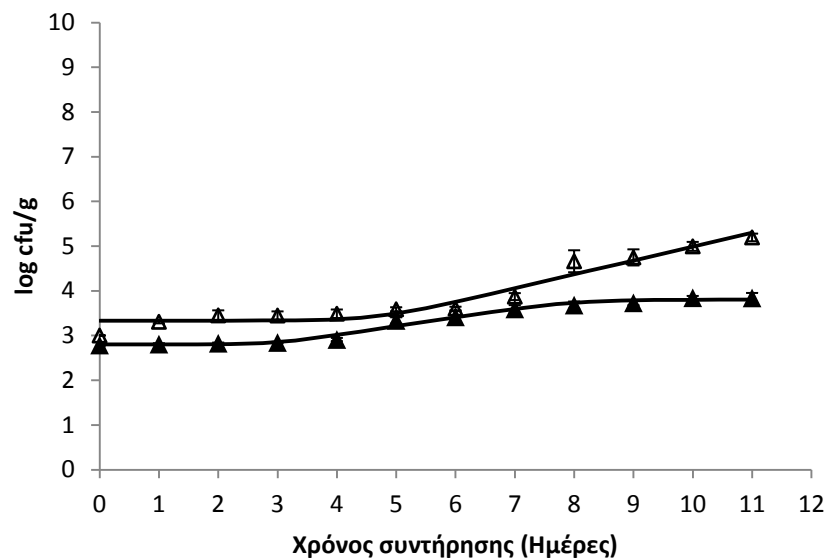


(β)

Σχήμα 5.5. Πληθυσμιακές μεταβολές των *Pseudomonas* spp. (●) και *L. monocytogenes* (Δ) μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε συγκαλλιέργεια σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε συνθήκες MAP (β) στους 5°C. Τα σημεία είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων.

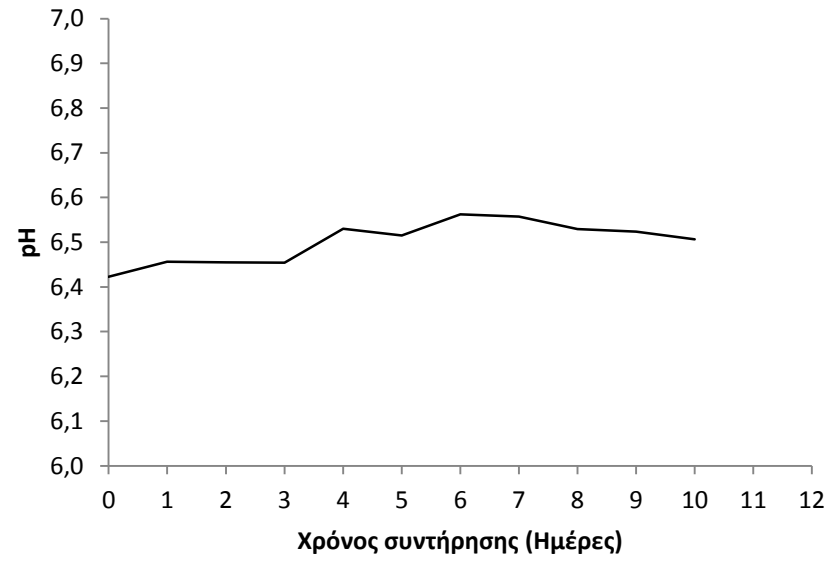
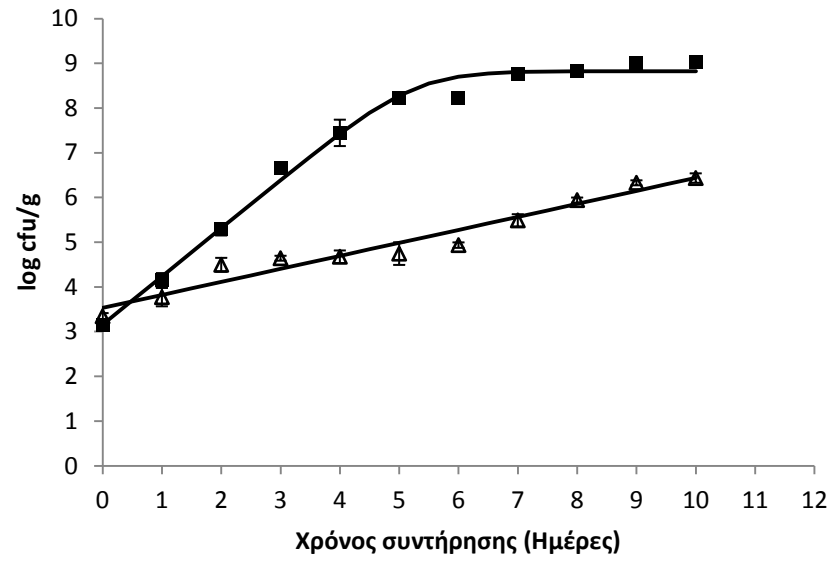


(α)

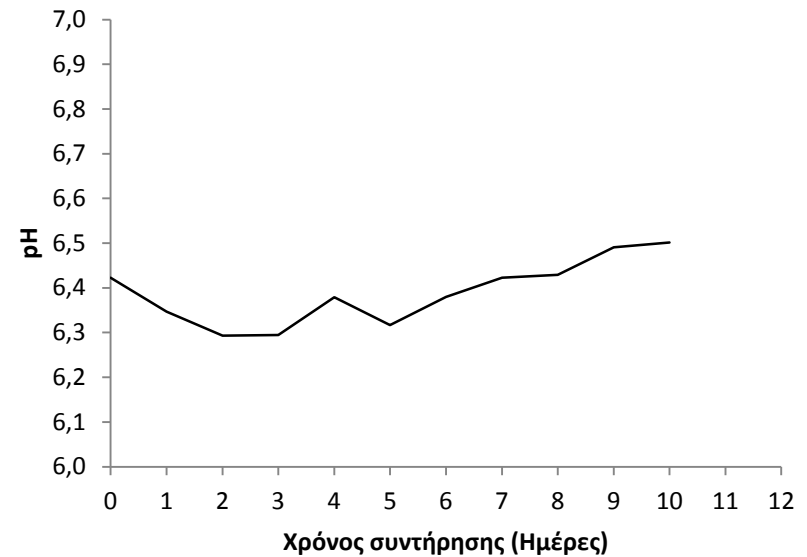
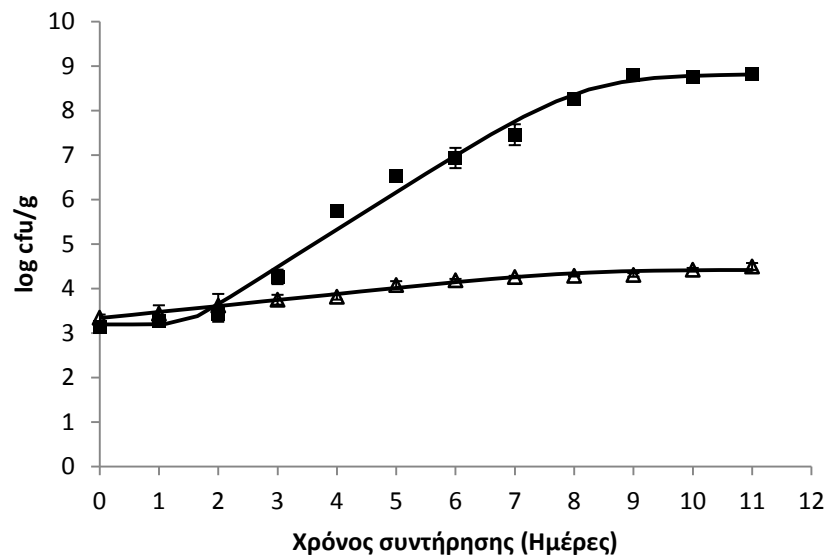


(β)

Σχήμα 5.6. Πληθυσμιακές μεταβολές των *Shewanella* spp. (▲) και *L. monocytogenes* (Δ) μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε συγκαλλιέργεια σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (β) στους 5°C. Τα σημεία είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων.

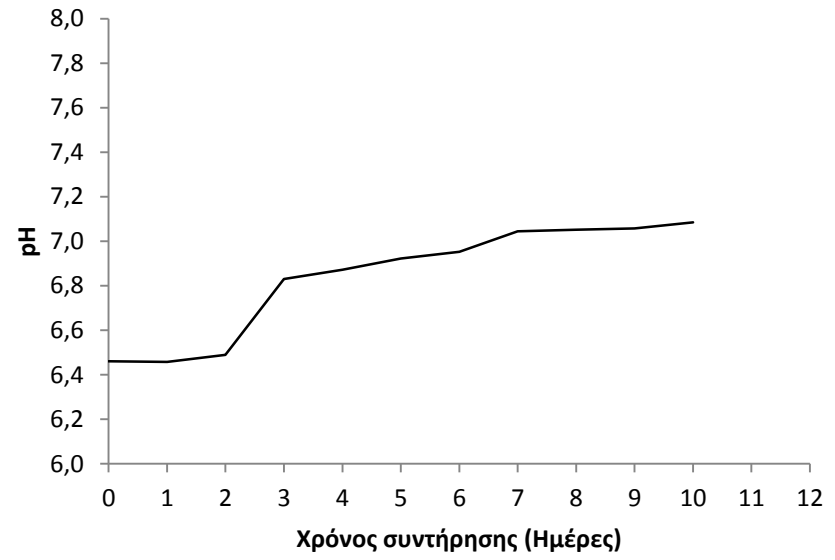
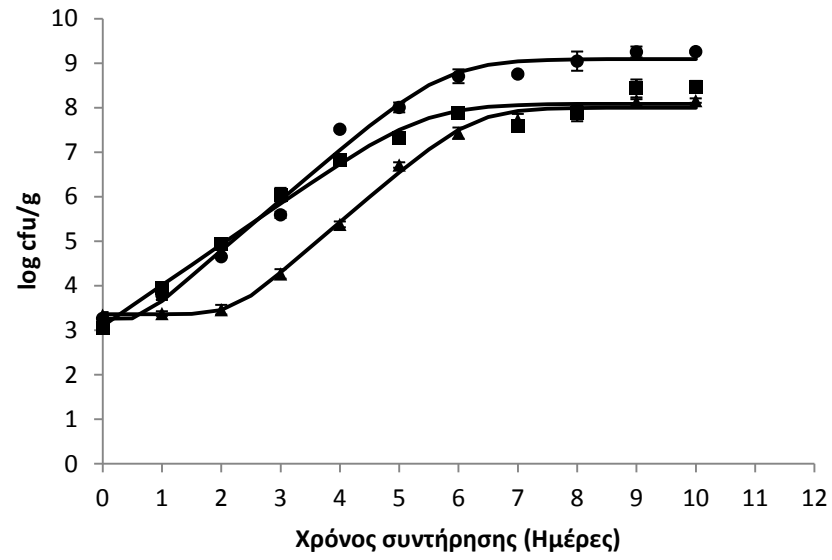


(α)

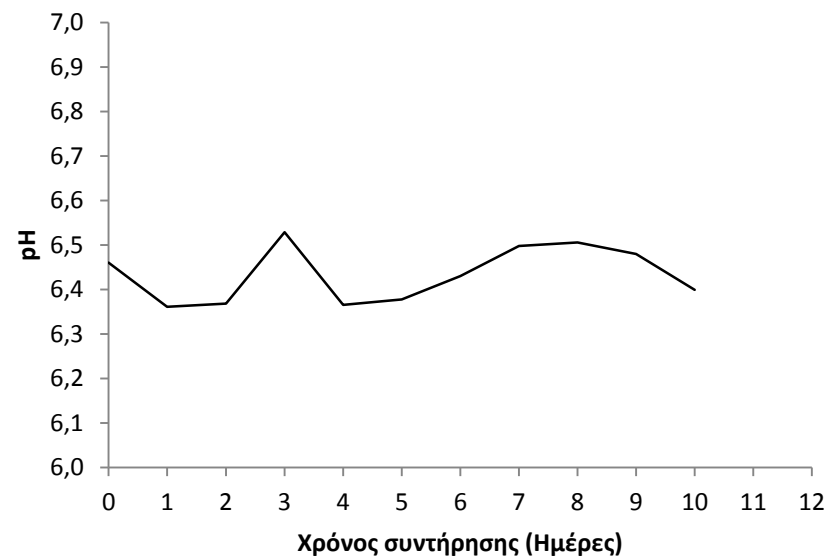
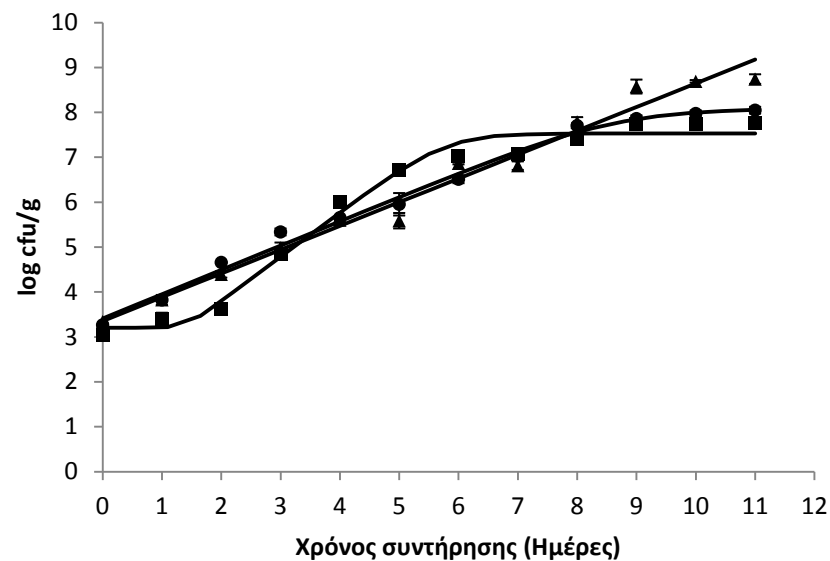


(β)

Σχήμα 5.7. Πληθυσμιακές μεταβολές των οξυγαλακτικών βακτηρίων (■) και *L. monocytogenes* (Δ) μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε συγκαλλιέργεια σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε συνθήκες MAP (β) στους 5°C. Τα σημεία είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων.

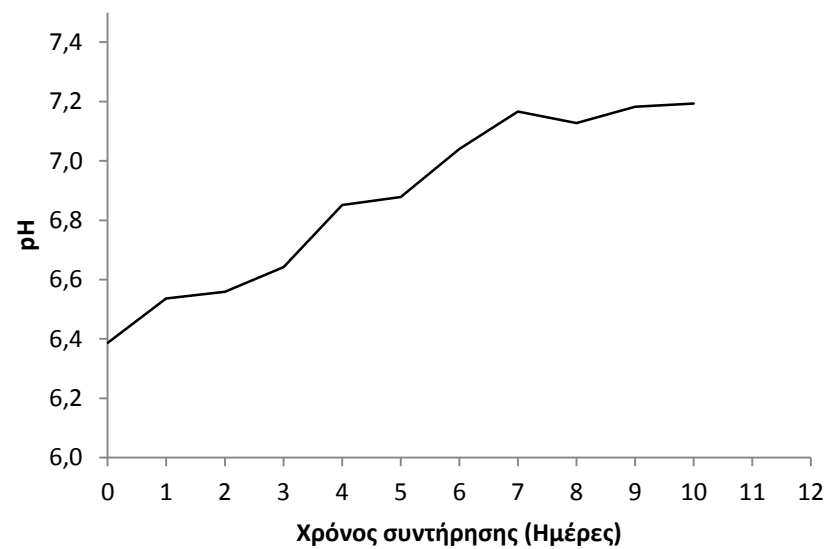
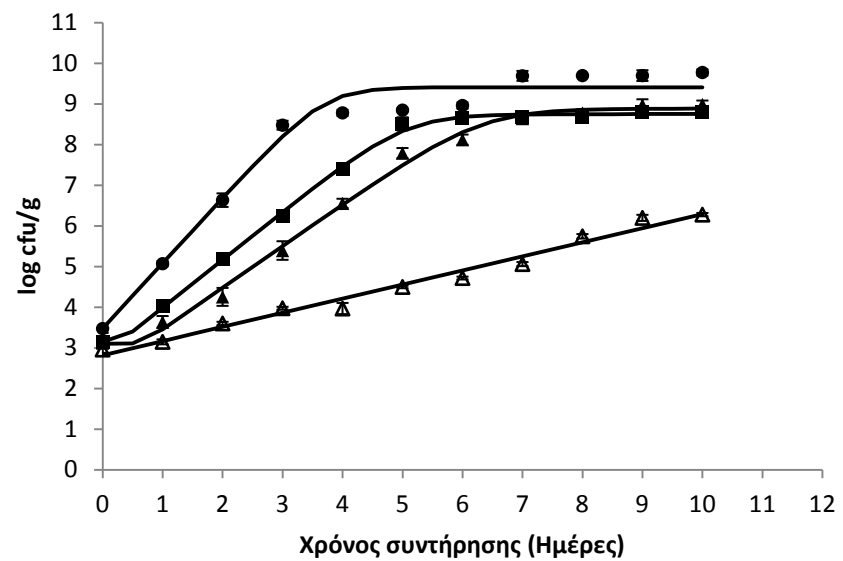


(α)

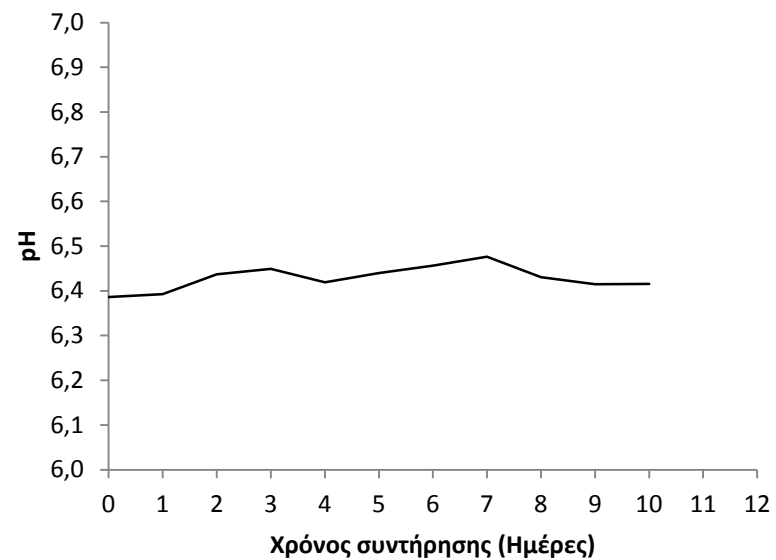
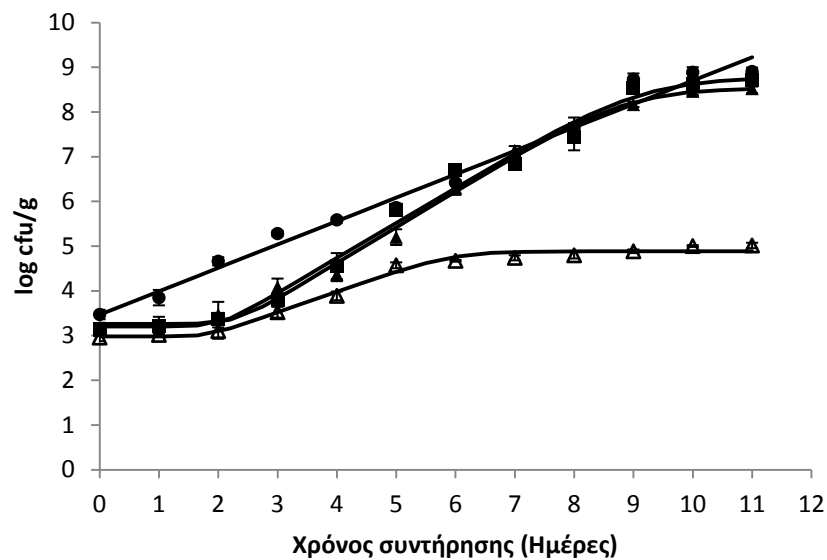


(β)

Σχήμα 5.8. Πληθυσμιακές μεταβολές των *Pseudomonas* spp. (●), *Shewanella* spp. (▲) και οξυγαλακτικών βακτηρίων (■) μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε συγκαλλιέργεια σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε συνθήκες MAP (β) στους 5°C. Τα σημεία είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων.



(α)



(β)

Σχήμα 5.9. Πληθυσμιακές μεταβολές των *Pseudomonas* spp. (●), *Shewanella* spp. (▲), οξυγαλακτικών βακτηρίων (■) και *L. monocytogenes* (Δ) μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε συγκαλλιέργεια σε μοντέλα ιχθύος τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους σε αερόβιες συνθήκες (α) και σε συνθήκες MAP (β) στους 5°C. Τα σημεία είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Επίδραση κιτρικού στις οργανοληπτικές και μικροβιολογικές μεταβολές και στην τύχη του *Listeria monocytogenes* σε φιλέτα τσιπούρας

6.1. Εισαγωγή

Η αύξηση διοξειδίου του άνθρακα και η μείωση οξυγόνου στη συσκευασία MAP έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες και τη δημιουργία πιθανώς πιο ευνοϊκού περιβάλλοντος για την αύξηση άλλων μικροοργανισμών, όπως είναι οι παθογόνοι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Farber 2001) καθώς και με τα αποτελέσματα του προηγούμενου Κεφαλαίου (Κεφ. 5). Έτσι, η συσκευασία σε MAP είναι δυνατόν να επιτρέψει την αύξηση παθογόνων σε επίπεδα μεγαλύτερα από εκείνα που παρατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης (Davies 1997). Οι Skandamis and Nychas (2002) αναφέρουν ότι οι συσκευασίες κενού ή MAP αυξάνουν την ανησυχία για αύξηση και επιβίωση μικροαερόφιλων ή/και ψυχρότροφων παθογόνων βακτηρίων. Πρόσθετα εμπόδια, όπως τα φυσικά συντηρητικά ή άλλες νεοεμφανιζόμενες τεχνολογίες (Skandamis & Nychas 2002, Chouliara *et al.* 2004) είναι τα πολλά υποσχόμενα όπλα για την αντιμετώπιση τέτοιων προβλημάτων.

Η χρήση των αλάτων οργανικών οξέων, όπως είναι το κιτρικό νάτριο, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της αντιμικροβιακής (Zhuang *et al.* 1996, Sallam 2007) και αντιοξειδωτικής του δράσης (Lee *et al.* 2005). Συγκεκριμένα, τα άλατα αυτά δρουν έναντι της αύξησης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την επέκταση του εμπορικού χρόνου ζωής στα τρόφιμα όπως στο κρέας (Maca *et al.* 1997, Sallam & Samejima 2004), στα πουλερικά (Williams & Phillips 1998) και στους ιχθύες

(Boskou & Debevere 2000; Zhuang *et al.* 1996). Επιπλέον, οι ουσίες αυτές δρουν έναντι της αύξησης αρκετών παθογόνων μικροοργανισμών όπως είναι τα *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica* (Lee *et al.* 2002), *L. monocytogenes* (Qvist *et al.* 1994), *Escherichia coli* (Lee *et al.* 2002, McWilliam Leitch & Stewart 2002) και *Clostridium botulinum* (Anders *et al.* 1989).

Σκοπός του κεφαλαίου αυτού είναι να μελετήσει την τύχη/συμπεριφορά των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και του παθογόνου *L. monocytogenes* μετά από την εμφάνιση των φιλέτων ιχθύος τσιπούρας σε διάλυμα με κιτρικό 2% και αποθήκευση υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP στους 5°C.

6.2. Υλικά και Μέθοδοι

6.2.1 Προέλευση και προετοιμασία δειγμάτων

Φιλέτα τσιπούρας βάρους περίπου 100-120 γρ, συσκευάστηκαν σε δισκάκια από διογκωμένη πολυστερίνη απορροφητικά (SIRAP GEMA) σε συνθήκες αέρα από ελληνική βιομηχανία στην Αττική (ΔΙΑΣ). Τα φιλέτα μεταφέρθηκαν εντός 30 min στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για περαιτέρω μεταχειρίσεις.

Μετά την άφιξη των δειγμάτων στο εργαστήριο, πραγματοποιήθηκαν αμέσως, υπό ασηπτικές συνθήκες, τα παρακάτω:

- A) εμφάνιση φιλέτων σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό στο οποίο είχε γίνει ρύθμιση του pH με HCl στην τιμή 6,0
- B) εμφάνιση φιλέτων σε αποστειρωμένο διάλυμα με κιτρικό (tris-sodium citrate) 2% (w/v) στο οποίο είχε γίνει ρύθμιση του pH με HCl στην τιμή 6,0.

Η εμφάνιση των φιλέτων πραγματοποιήθηκε μέσα σε λεκάνες οι οποίες είχαν αποστειρωθεί επί τόπου με αιθανόλη 70%. Μετά την απομάκρυνση της αιθανόλης, ακολούθησε η τοποθέτηση των φιλέτων στις λεκάνες που περιείχαν το αποστειρωμένο διάλυμα tris-sodium citrate 2% (w/v) σε pH=6, και η τοποθέτηση των φιλέτων στις λεκάνες που περιείχαν το αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Σε κάθε λεκάνη που περιείχε 4 λίτρα διαλύματος ή νερού τοποθετούνταν 20 φιλέτα ιχθύος και παρέμεναν εκεί για 20 min. Κατόπιν, τα φιλέτα απομακρύνθηκαν και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε ασηπτικές συνθήκες εντός θαλάμου νηματικής ροής. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο ενοφθαλμισμός των μισών φιλέτων ανά περίπτωση, με το *L. monocytogenes*. Τα υπόλοιπα φιλέτα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, ανά περίπτωση. Η συγκέντρωση και το pH του διαλύματος κιτρικού και ο χρόνος εμφάνισης επιλέχθηκε μετά από προκαταρκτικά πειράματα έτσι ώστε να μην επηρεάζει δυσμενώς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φιλέτων, π.χ. έντονα ξινή γεύση κτλ.

6.2.2 Προετοιμασία εμβολίου, ενοφθαλμισμός και αποθήκευση

Καλλιέργειες *L. monocytogenes* σε μίγμα που αποτελούνταν από Scott A, Pirie 21075, Pirie 21085, Pirie 214112, Pirie 23UD, Pirie NCTC 10527 με αρχικό εμβόλιο περίπου 10^3 cfu/g χρησιμοποιήθηκαν για να εμβολιάσουν τα φιλέτα μετά την εμφάνισή τους σε tris-sodium citrate 2% (w/v) και φιλέτα μετά την εμφάνισή τους σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Κάθε μεταχείριση πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις. Ακολούθησε συσκευασία των φιλέτων σε αερόβιες συνθήκες αέρα και σε συνθήκες MAP (CO₂: 60%, O₂: 10%, N₂: 30%) σε συσκευή τύπου Henkovac 1900. Στη συνέχεια, τα φιλέτα μεταφέρθηκαν μέσα σε πολυεστερικούς περιέκτες με παγοκύστες, εντός 4 ωρών στο εργαστήριο του οικείου τμήματος όπου αποθηκεύθηκαν

σε επωαστήρα στους 5°C για 10 και 12 ημέρες για τα φιλέτα υπό αερόβιες συνθήκες αέρα και υπό συνθήκες MAP αντίστοιχα.

Η μικροβιολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2. Σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε προσαρμογή των δεδομένων αύξησης χρησιμοποιώντας τη σιγμοειδή εξίσωση του Baranyi (Baranyi & Roberts 1994) (βλέπε Κεφ. 2).

6.2.3. Προσδιορισμός χρόνου απόρριψης

Για τα νωπά φιλέτα, ο χρόνος απόρριψης προσδιορίστηκε με οργανοληπτική αξιολόγηση όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2.

Για τα ψημένα φιλέτα, έγινε αξιολόγηση της γεύσης, οσμής, συνεκτικότητας και εμφάνισης σύμφωνα με τους Paulus et al. (1979). Πριν την αξιολόγηση των προϊόντων, 30g από κάθε φιλέτο (δηλαδή 30 X 3 = 90g ανά προϊόν) με τη φυσική μικροβιακή του σύνθεση μεταφέρονταν σε αλουμινόχαρτο. Τα τμήματα αυτά των φιλέτων μεταφέρονταν σε προθερμασμένο οικιακό φούρνο όπου ψήνονταν στους 180° C για 20 λεπτά περίπου (Tsironi et al. 2009). Στη συνέχεια, αφήνονταν να κρυώσουν και προσφέρονταν στα 5 άτομα τα οποία αποτελούσαν τους κριτές. Οι κριτές αξιολογούσαν το κάθε χαρακτηριστικό με 1-9 κριτήρια αρεσκείας, από τα οποία βαθμολογούσαν με 9: εξαιρετικά αρεστό, 8-6: βαθμιαία λιγότερο αρεστό, 5: με αμφιβολία αρεστό - μη αρεστό, 4: μη αρεστό, 3-2: βαθμιαία περισσότερο μη αρεστό, 1: εξαιρετικά μη αρεστό (Paulus et al. 1979, Tokur et al. 2006, Tsironi et al. 2009, Kucukgulmez et al. 2013). Κάθε προϊόν απορρίπτονταν όταν οι 3 από τους 5 κριτές το αξιολογούσαν ως 'μη αρεστό' με βαθμολογία <5 (Tsironi et al. 2009).

6.3 Αποτελέσματα

6.3.1 Προσδιορισμός χρόνου οργανοληπτικής απόρριψης

Όλα τα προϊόντα την πρώτη ημέρα (d0) αξιολογήθηκαν οργανοληπτικά ως άριστα. Ο χρόνος απόρριψης των νοπών προϊόντων, βάσει της οργανοληπτικής αξιολόγησης, ήταν 5 και 6 ημέρες για τα φιλέτα που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες και 8 και 9 ημέρες για τα φιλέτα σε MAP, μετά από την εμφάπτισή τους σε νερό και σε διάλυμα με κιτρικό 2%, αντίστοιχα. Το επίπεδο του μικροβιακού πληθυσμού τη στιγμή της απόρριψης κυμαίνονταν μεταξύ 7-8 log cfu/g σε όλα τα προϊόντα (Πίν. 6.1).

Οι μεταβολές στα χαρακτηριστικά των φιλέτων που ψήθηκαν παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.1. Οι μεταβολές κυρίως στην οσμή και στην εμφάνιση των φιλέτων με το κιτρικό (αλλά και χωρίς αυτό) στη συσκευασία αέρα και οι μεταβολές κυρίως στη γεύση των φιλέτων με το κιτρικό (αλλά και χωρίς αυτό) στη συσκευασία MAP, φάνηκε να αποτελούν τους ουσιαστικότερους λόγους απόρριψης των προϊόντων. Ο χρόνος απόρριψης των ψημένων φιλέτων εκτιμήθηκε σε 6 και 7 ημέρες για τα φιλέτα που εμφαπτίστηκαν σε νερό και σε διάλυμα με κιτρικό 2% (w/v), σε συσκευασία αέρα και σε 9 και 10 ημέρες, αντίστοιχα, για τα φιλέτα σε MAP. Επομένως, η προσθήκη του κιτρικού φάνηκε να επιμηκύνει το χρόνο απόρριψης του ψημένου προϊόντος κατά 1 ημέρα.

6.3.2 Μικροβιολογικές μεταβολές

Οι καμπύλες αύξησης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας και σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας ενοφθαλμισμένα με *L. monocytogenes*, με και χωρίς την προσθήκη κιτρικών αλάτων κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους στους 5°C για 10 και 12 ημέρες σε αερόβιες συνθήκες και συνθήκες MAP, αντίστοιχα, παρουσιάζονται στα Σχήματα 6.2 και 6.3. Οι κινητικές παράμετροι των μικροοργανισμών παρουσιάζονται στους Πίνακες 6.2-6.5.

Στη συσκευασία αέρα, στο χρόνο απόρριψης (ημέρα 5^η) στα φιλέτα χωρίς το κιτρικό, τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό με πληθυσμό 7,61 log cfu/g. Τα *Pseudomonas* spp. ακολουθούνταν από τα βακτήρια που παράγουν H₂S, Enterobacteriaceae, οξυγαλακτικά και *B. thermosphacta* με πληθυσμούς 6,88, 6,25, 4,24 και 3,82 log cfu/g αντίστοιχα (Σχ. 6.2α). Στα φιλέτα με το κιτρικό, την 5^η ημέρα της συντήρησης, οι πληθυσμοί των *Pseudomonas* spp., των βακτηρίων που παράγουν H₂S, Enterobacteriaceae, οξυγαλακτικών και *B. thermosphacta* βρέθηκαν να είναι στα επίπεδα των 6,65, 5,89, 5,27, 3,86 και 3,75 log cfu/g αντίστοιχα (Σχ. 6.2β). Την 6^η ημέρα της συντήρησης, η οποία αποτέλεσε το χρόνο απόρριψης των φιλέτων με το κιτρικό, οι πληθυσμοί των βακτηρίων βρέθηκαν να είναι στα επίπεδα των 7,18, 6,68, 6,60, 4,42 και 4,32 log cfu/g αντίστοιχα, με τα *Pseudomonas* spp. να αποτελούν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό. Στο πέρας της συντήρησης, τα *Pseudomonas* spp. βρέθηκε να επικρατούν και ακολουθούνταν από τα Enterobacteriaceae, τα βακτήρια που παράγουν H₂S, *B. thermosphacta* και οξυγαλακτικά βακτήρια σε όλες τις περιπτώσεις με πληθυσμούς 7-9 log cfu/g (Σχ. 6.2). Ο ειδικός ρυθμός αύξησης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών ήταν μικρότερος στα φιλέτα με το κιτρικό σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς αυτό. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης των

θετικών κατά Gram αλλοιωγόνων μικροοργανισμών φάνηκε να έχει μεγαλύτερη πτώση σε σχέση με τον ειδικό ρυθμό αύξησης των αρνητικών κατά Gram αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα φιλέτα με το κιτρικό. Φάση προσαρμογής παρατηρήθηκε στα Enterobacteriaceae, *B. thermosphacta* και οξυγαλακτικά βακτήρια στα φιλέτα χωρίς το κιτρικό, ενώ στα Enterobacteriaceae, στα βακτήρια που παράγουν H₂S και οξυγαλακτικά βακτήρια στα φιλέτα με το κιτρικό. Μεγαλύτερη φάση προσαρμογής παρατηρήθηκε στα φιλέτα με το κιτρικό σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς αυτό κατά την αύξηση των Enterobacteriaceae και των βακτηρίων που παράγουν H₂S (Πίν. 6.2).

Στη συσκευασία MAP, στο χρόνο απόρριψης (ημέρα 8^η) στα φιλέτα χωρίς το κιτρικό, τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτέλεσαν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό με πληθυσμό 7,05 log cfu/g. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ακολουθούνταν από τα *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae, βακτήρια που παράγουν H₂S και *B. thermosphacta* με πληθυσμούς 6,95, 6,91, 6,74 και 6,70 log cfu/g αντίστοιχα (Σχ. 6.3α). Στα φιλέτα με το κιτρικό, την 8^η ημέρα της συντήρησης, οι πληθυσμοί των *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae, των βακτηρίων που παράγουν H₂S, , *B. thermosphacta* και οξυγαλακτικών βακτηρίων βρέθηκαν να είναι στα επίπεδα των 6,13, 6,00, 5,67, 5,52 και 5,35 log cfu/g αντίστοιχα (Σχ. 6.3β). Την 9^η ημέρα της συντήρησης, η οποία αποτέλεσε το χρόνο απόρριψης των φιλέτων με το κιτρικό, τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό με πληθυσμό 6,84 log cfu/g. Τα *Pseudomonas* spp. ακολουθούνταν από τα Enterobacteriaceae, βακτήρια που παράγουν H₂S, *B. thermosphacta* και οξυγαλακτικά με πληθυσμούς 6,67, 5,94, 5,88 και 5,71 log cfu/g αντίστοιχα. Στο πέρας της συντήρησης, τα βακτήρια που παράγουν H₂S και τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τους κυρίαρχους πληθυσμούς στα φιλέτα χωρίς και με την προσθήκη του κιτρικού με πληθυσμούς 8,13 και 7,27 log cfu/g αντίστοιχα. Ο

ειδικός ρυθμός αύξησης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών ήταν μικρότερος στα φιλέτα με το κιτρικό σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το κιτρικό. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης των θετικών κατά Gram αλλοιωγόνων μικροοργανισμών φάνηκε να έχει μεγαλύτερη πτώση σε σχέση με τον ειδικό ρυθμό αύξησης των αρνητικών κατά Gram αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα φιλέτα με το κιτρικό. Στα φιλέτα με το κιτρικό σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς αυτό παρατηρήθηκε μεγαλύτερη φάση προσαρμογής κατά την αύξηση των βακτηρίων που παράγουν H₂S, των Enterobacteriaceae και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Πίν. 6.4).

Συμπερασματικά, διαπιστώνεται ότι οι πληθυσμοί των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα φιλέτα με το κιτρικό ήταν χαμηλότεροι σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το κιτρικό. Στη συσκευασία αέρα, τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό και ακολουθούνταν από τα βακτήρια που παράγουν H₂S, Enterobacteriaceae σε όλες τις περιπτώσεις. Οι πληθυσμοί των *Pseudomonas* spp., των βακτηρίων που παράγουν H₂S και των Enterobacteriaceae ήταν περίπου 1 log χαμηλότεροι στα φιλέτα με το κιτρικό σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς αυτό. Οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων και του *B. thermosphacta* βρέθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους παραπάνω αλλοιωγόνους και παρουσίασαν μικρή πτώση έως 0,50 log στα φιλέτα με το κιτρικό σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς αυτό.

Στη συσκευασία MAP, τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτέλεσαν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό στα φιλέτα χωρίς το κιτρικό. Στα φιλέτα με το κιτρικό, τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό με πληθυσμούς περίπου 1,0 log χαμηλότερους σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το κιτρικό, ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια βρέθηκαν σε πληθυσμούς 1,70 log χαμηλότερους σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το κιτρικό. Επομένως διαπιστώνεται ότι η χρήση κιτρικού

επιδρά περισσότερο στους πληθυσμούς των θετικών κατά Gram βακτηρίων και λιγότερο στους πληθυσμούς των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων στα φιλέτα σε συσκευασία MAP.

Ως γενικότερο συμπέρασμα προκύπτει ότι στα φιλέτα με το κιτρικό οι πληθυσμοί των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών έφθασαν σε επίπεδα που χαρακτηρίζουν την αλλοίωση 1 ημέρα αργότερα σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς την προσθήκη του κιτρικού.

Στα φιλέτα με το παθογόνο σε αερόβιες συνθήκες, την 5^η ημέρα της συντήρησης (λήξη διάρκειας ζωής φιλέτων χωρίς το παθογόνο) τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τον κυρίαρχο πληθυσμό (6,55 log cfu/g) (Σχ. 6.2γ). Δεν βρέθηκαν ουσιαστικές μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς κατά τη διάρκεια της συντήρησης στα φιλέτα με το κιτρικό (Σχ. 6.2δ) σε σχέση με αυτά χωρίς κιτρικό (Σχ. 6.2γ). Στα φιλέτα παρουσία παθογόνου στη συσκευασία αέρα, ο ειδικός ρυθμός αύξησης των μικροοργανισμών παρουσίασε διαφορές μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων (Πίν. 6.3). Στα φιλέτα με την προσθήκη κιτρικού, ο ειδικός ρυθμός αύξησης των βακτηρίων που παράγουν H₂S και των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν μικρότερος σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς κιτρικά που συντηρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες (Πίν. 6.3). Αντίθετα, ο ειδικός ρυθμός αύξησης των *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae και του *B. thermosphacta* ήταν μεγαλύτερος. Φάση προσαρμογής παρατηρήθηκε στα οξυγαλακτικά βακτήρια και στο *B. thermosphacta* σε όλες τις μεταχειρίσεις. Επιπλέον, φάση προσαρμογής παρατηρήθηκε στα *Pseudomonas* spp. στη μεταχείριση των φιλέτων με το κιτρικό (Πίν. 6.3).

Ο ειδικός ρυθμός αύξησης του παθογόνου βρέθηκε να είναι μικρότερος (0,392 ημέρες⁻¹) στα φιλέτα με το κιτρικό, σε σχέση με την ανάπτυξή του (0,524 ημέρες⁻¹) στα

φιλέτα χωρίς την προσθήκη κιτρικού (Πίν. 6.3). Παρόλα αυτά, ο πληθυσμός του παθογόνου την 5^η ημέρα της συντήρησης βρέθηκε στα επίπεδα των 3,43 και 3,35 log και ο τελικός πληθυσμός του παθογόνου βρέθηκε στα επίπεδα των 6,13 και 5,96 log στα φιλέτα χωρίς αλλά και με την προσθήκη του κιτρικού, αντίστοιχα.

Στα φιλέτα με το παθογόνο, χωρίς την προσθήκη κιτρικού, σε συνθήκες MAP, την 8^η ημέρα της συντήρησης (λήξη διάρκειας ζωής φιλέτων χωρίς το παθογόνο), τα βακτήρια που παράγουν H₂S αποτέλεσαν τον κυρίαρχο πληθυσμό (6,42 log cfu/g) και ακολουθούνταν από τα *B. thermosphacta*, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. και οξυγαλακτικά βακτήρια (Σχ. 6.3γ). Στην περίπτωση των φιλέτων με το κιτρικό, τα *B. thermosphacta* αποτέλεσαν τον κυρίαρχο μικροοργανισμό (6,49 log cfu/g) με διαφορά περίπου 2 logs σε σχέση με τους υπόλοιπους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (Σχ. 6.3δ). Οι πληθυσμοί των *Pseudomonas* spp., οξυγαλακτικών και των Enterobacteriaceae βρέθηκαν να είναι περίπου 1 log χαμηλότεροι, ενώ των βακτηρίων που παράγουν H₂S βρέθηκαν να είναι 2,30 log χαμηλότεροι στα φιλέτα με το κιτρικό σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το κιτρικό. Αντίθετα, οι πληθυσμοί του *B. thermosphacta* ήταν 0,70 log υψηλότεροι, στα φιλέτα αντίστοιχα. Στο τέλος της συντήρησης, τα βακτήρια που παράγουν H₂S και τα *B. thermosphacta* αποτέλεσαν τους κυρίαρχους πληθυσμούς (7,41 και 7,77 log cfu/g, αντίστοιχα), στα φιλέτα χωρίς και με το κιτρικό, αντίστοιχα. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης των μικροοργανισμών παρουσίασε διαφορές μεταξύ των φιλέτων με το κιτρικό σε σχέση με αυτά χωρίς το κιτρικό. Κατά τη συντήρηση των φιλέτων με το κιτρικό, ο ειδικός ρυθμός αύξησης των βακτηρίων που παράγουν H₂S και των *Pseudomonas* spp. ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το κιτρικό που συντηρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες (Πίν. 6.5). Αντίθετα, ο ειδικός

ρυθμός αύξησης των Enterobacteriaceae, του *B. thermosphacta* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν μικρότερος.

Ο ειδικός ρυθμός αύξησης του παθογόνου βρέθηκε να είναι μικρότερος (0,158 ημέρες⁻¹) στα φιλέτα με το κιτρικό, σε σχέση με την ανάπτυξή του (0,287 ημέρες⁻¹) στα φιλέτα χωρίς το κιτρικό (Πίν. 6.5). Ο τελικός πληθυσμός του παθογόνου βρέθηκε να είναι χαμηλότερος 1 log στη μεταχείριση με το κιτρικό σε σχέση με τη μεταχείριση των φιλέτων στο νερό. Επομένως, η προσθήκη του κιτρικού φάνηκε να επιδρά στην αύξηση του παθογόνου στα φιλέτα στη συσκευασία MAP.

Συμπερασματικά, διαπιστώνεται ότι η χρήση αλάτων κιτρικού οξέος στη συσκευασία αέρα επιδρά ελάχιστα στους πληθυσμούς του παθογόνου (πτώση 0,10 log), ενώ στο MAP περιορίζει τους πληθυσμούς του *L. monocytogenes* έως και 1 log.

6.4. Συζήτηση

Τα *Pseudomonas* spp. και *S. putrefaciens* αποτελούν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς κατά τη συντήρηση των ιχθύων τσιπούρας σε αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες (Alvarez *et al.* 2008, Koutsoumanis *et al.* 1999, Koutsoumanis & Nychas 2000, Tryfinopoulou *et al.* 2002, Tryfinopoulou *et al.* 2007). Στην παρούσα μελέτη, στους 5°C, τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τους κυρίαρχους πληθυσμούς, ενώ τα βακτήρια που παράγουν H₂S (κυρίως *Shewanella* spp.) και τα Enterobacteriaceae αποτέλεσαν τους δεύτερους και τρίτους πιο επικρατέστερους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς, αντίστοιχα, ανεξαρτήτως της τεχνητής επιμόλυνσης με το παθογόνο *L. monocytogenes* και με την προσθήκη ή όχι του κιτρικού. Αντίθετα, κατά τη συντήρηση των ιχθύων της Μεσογείου σε MAP, πραγματοποιείται επιλογή διαφορετικών μικροοργανισμών ως κυρίαρχοι κάθε φορά. Σε ιχθύες που προέρχονται

από ελληνικά ύδατα, τα *B. thermosphacta* και τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αναφερθεί ως ειδικοί αλλοιωγόννοι μικροοργανισμοί κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε MAP (Drosinos & Nychas 1996, Drosinos et al. 1997, Koutsoumanis & Nychas 1999, Taoukis et al. 1999a,b Koutsoumanis et al. 2000). Επιπλέον, οι Pournis et al. (2006), οι οποίοι χρησιμοποίησαν την ίδια σύσταση αερίων με της παρούσας διατριβής, αναφέρουν ότι τα *Pseudomonas* spp. και τα βακτήρια που παράγουν H₂S (κυρίως *S. putrefaciens*) αποτελούν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς σε κοτσομούρα (*Mullus surmuletus*) που αποθηκεύθηκε στους 4°C. Στην παρούσα διατριβή, στο χρόνο απόρριψης, τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς στα φιλέτα χωρίς και με το κιτρικό, αντίστοιχα. Παρουσία παθογόνου, τα βακτήρια που παράγουν H₂S και τα *B. thermosphacta* αποτέλεσαν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς στα φιλέτα χωρίς και με το κιτρικό, αντίστοιχα.

Τα άλατα των οργανικών οξέων δρουν έναντι της αύξησης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την επέκταση του εμπορικού χρόνου ζωής στους ιχθύες (Boskou & Debevere 2000, Zhuang et al. 1996, Sallam 2007). Πράγματι, στην παρούσα μελέτη ο χρόνος απόρριψης των φιλέτων με το κιτρικό επιμηκύνθηκε κατά 1 ημέρα σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το κιτρικό στις συσκευασίες αέρα και MAP.

Στη συσκευασία αέρα, τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τον κυρίαρχο πληθυσμό (7,61 log cfu/g) στα φιλέτα χωρίς το κιτρικό την ημέρα της οργανοληπτικής απόρριψης (d5). Τα *Pseudomonas* spp. μαζί με τα βακτήρια που παράγουν H₂S και με τα Enterobacteriaceae βρέθηκαν σε πληθυσμούς 1 log χαμηλότερους την 5^η ημέρα στα φιλέτα με το κιτρικό. Την 6^η ημέρα της συντήρησης, η οποία αποτέλεσε το χρόνο απόρριψης των φιλέτων με το κιτρικό, τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τον κυρίαρχο

αλλοιωγόνο μικροοργανισμό και ακολουθούνταν από τα βακτήρια που παράγουν H₂S και Enterobacteriaceae με πληθυσμούς 7,18, 6,68 και 6,60 log cfu/g, αντίστοιχα. Οι θετικοί κατά Gram αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί ακολουθούσαν σε χαμηλότερα επίπεδα παρουσιάζοντας μικρή πτώση έως 0,50 log στα φιλέτα με το κιτρικό σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς αυτό. Επομένως, τα φιλέτα με το άλας κιτρικού οξέος απορρίφθηκαν 1 ημέρα αργότερα σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς αυτό, όταν οι πληθυσμοί του επικρατέστερου αλλοιωγόνου μικροοργανισμού έφθασε στα επίπεδα των 7-8 log που χαρακτηρίζουν την αλλοίωση (Gram & Huss 1996, Olafsdottir *et al.* 1997). Κατά Sallam (2007), τα *Pseudomonas* spp. και τα βακτήρια που παράγουν H₂S αποτελούν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε φέτες σολομού που εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα άλατος κιτρικού οξέος 2,5% v/w για 10 min και αποθηκεύθηκαν στους 1°C. Σύμφωνα με Sallam (2007), τα άλατα του κιτρικού οξέος επιδρούν σημαντικά στους πληθυσμούς των *Pseudomonas* spp. και των βακτηρίων που παράγουν H₂S. Οι πληθυσμοί των κυρίαρχων μικροοργανισμών κατά Sallam (2007) βρέθηκε να είναι περίπου 2 log μικρότεροι στις φέτες σολομού με το κιτρικό σε σχέση με τις φέτες χωρίς το κιτρικό, ενώ ο πληθυσμός τους δεν ξεπέρασε τα επίπεδα των 7 και 6 log, αντίστοιχα, στο πέρας της συντήρησης. Ο εμπορικός χρόνος ζωής του προϊόντος σολομού επιμηκύνθηκε 4 ημέρες τουλάχιστον. Στην παρούσα διατριβή, δεν παρατηρήθηκαν τόσο μεγάλες διαφορές στους πληθυσμούς των αλλοιωγόνων μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων σε συνθήκες αέρα. Παρόλα αυτά, το κιτρικό είχε επίδραση στους πληθυσμούς των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και ο εμπορικός χρόνος του προϊόντος επιμηκύνθηκε κατά 1 ημέρα.

Η συσκευασία MAP σε συνδυασμό με χαμηλές θερμοκρασίες και αντιμικροβιακές ουσίες καθυστερεί τη διαδικασία της αλλοίωσης επιμηκύνοντας τον

εμπορικό χρόνο ζωής των αλιευτικών προϊόντων (Manju *et al.* 2006, Pezeshk *et al.* 2011). Στη συσκευασία MAP, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία αποτέλεσαν τον κυρίαρχο πληθυσμό στο χρόνο απόρριψης (d8) στα φιλέτα χωρίς το κιτρικό, βρέθηκε να είναι 1,70 log χαμηλότερος την ίδια ημέρα της συντήρησης (d8) στα φιλέτα με το κιτρικό. Τα άλατα του κιτρικού οξέος έχουν μεγάλη επίδραση στην αύξηση των θετικών κατά Gram βακτηρίων (Lee *et al.* 2002). Οι πληθυσμοί των *Pseudomonas* spp., των βακτηρίων που παράγουν H₂S και των Enterobacteriaceae βρέθηκαν να είναι περίπου 1 log χαμηλότεροι στα φιλέτα με το κιτρικό σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το κιτρικό, την 8^η ημέρα. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι λιγότερο ή καθόλου ευαίσθητα σε αντιμικροβιακές ουσίες οι οποίες αντιθέτως είναι ενεργές έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων, λόγω της ύπαρξης της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης (Vaara 1992). Την 9^η ημέρα της συντήρησης, η οποία αποτέλεσε το χρόνο απόρριψης των φιλέτων με το κιτρικό, τα *Pseudomonas* spp. αποτέλεσαν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό. Επομένως, τα φιλέτα με το άλας κιτρικού οξέος απορρίφθηκαν 1 ημέρα αργότερα, όταν οι πληθυσμοί του κυρίαρχου αλλοιωγόνου έφτασαν περίπου στα επίπεδα των 7-8 log cfu/g που χαρακτηρίζουν την αλλοίωση (Gram & Huss 1996, Olafsdottir *et al.* 1997).

Επιπλέον, τα άλατα των οργανικών οξέων δρουν έναντι της αύξησης του *L. monocytogenes* στους ιχθύες (Qvist *et al.* 1994). Πράγματι, στην παρούσα διατριβή, το κιτρικό επέδρασε στην τύχη του παθογόνου αυτού, κυρίως στα φιλέτα στη συσκευασία MAP. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης του παθογόνου ήταν μικρότερος στα φιλέτα με το άλας κιτρικού οξέος σε MAP και ο τελικός πληθυσμός του ήταν 1 log χαμηλότερος σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το κιτρικό. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης των *Pseudomonas* spp. και των βακτηρίων που παράγουν H₂S (κυρίως *Shewanella* spp.) ήταν μικρότερος στα

φιλέτα με το κιτρικό παρουσία παθογόνου και ο τελικός πληθυσμός τους ήταν 1,50 log χαμηλότερος σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το κιτρικό. Δεν υπάρχουν μελέτες για να μπορεί να γίνει σύγκριση.

Στη συσκευασία αέρα, παρουσία παθογόνου, το κιτρικό φάνηκε να μην έχει ουσιαστική επίδραση στην αύξηση των μικροοργανισμών. Παρόλο που ο ειδικός ρυθμός αύξησης του παθογόνου ήταν μικρότερος στα φιλέτα με το κιτρικό, ο τελικός πληθυσμός του δεν παρουσίασε ουσιαστική μεταβολή σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το κιτρικό (5,96 και 6,13 στα φιλέτα με το κιτρικό και το νερό, αντίστοιχα). Το κιτρικό είχε μικρή επίδραση στους τελικούς πληθυσμούς των *Enterobacteriaceae*, *B.thermosphacta* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων, αφού οι πληθυσμοί τους στα φιλέτα με το κιτρικό ήταν 0,40-0,50 log χαμηλότεροι σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς αυτό. Οι τελικοί πληθυσμοί των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas* spp. και των βακτηρίων που παράγουν H₂S βρέθηκαν σε παρόμοια επίπεδα στα φιλέτα που εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα με το κιτρικό και στα φιλέτα που δεν εμβαπτίστηκαν σε αυτό. Δεν υπάρχουν μελέτες για να μπορεί να γίνει σύγκριση.

Η αλλοίωση στα νωπά αλιευτικά προϊόντα είναι αποτέλεσμα μεταβολών κυρίως στην οσμή και τη γεύση που προέρχονται από την παραγωγή ουσιών οι οποίες είναι αποτέλεσμα της μεταβολικής δράσης των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (Gram and Huss, 1996). Η οσμή αποτελεί τον κυριότερο δείκτη αξιολόγησης της φρεσκότητας (Selli et al. 2006; Selli and Cayhan 2009). Σε συνθήκες αέρα, όπου τα *Pseudomonas* spp. και *S. putrefaciens* αποτελούν τους δύο πιο επικρατέστερους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς, παρατηρείται παραγωγή πτητικών αζωτούχων βάσεων, πτητικών οξέων, αύξηση της συγκέντρωσης αμινοξέων, παραγωγή υδροθείου και άλλων ουσιών (Miller et al. 1973 Dalgaard 1995, Drosinos & Nychas 1997,

Koutsoumanis & Nychas 1999). Οι μεταβολίτες που παράγονται από τη δράση αυτών των μικροοργανισμών κατά την αλλοίωση των αλιευμάτων είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές όπως αυτή της αμμωνίας από τριμεθυλαμίνη, του πιπεριού από ισταμίνη, του σάπιου από καδαβερίνη και πουτρεσκίνη, του θείου απόθειούχες πτητικές ενώσεις, της βύνης από μικρού μοριακού βάρους αλκοόλες, αλδεΐδες και κετόνες (Dalgaard *et al.* 2003). Στη συσκευασία MAP, τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό στους ιχθύες της Μεσογείου σε πολλές περιπτώσεις (Drosinos *et al.* 1997, Taoukis *et al.* 1999a,b Koutsoumanis *et al.* 2000). Στην παρούσα διατριβή, τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτέλεσαν τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό στα φιλέτα χωρίς την προσθήκη κιτρικού.. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια και το *B. thermosphacta* σε κυρίαρχους πληθυσμούς σε ένα τρόφιμο είναι υπεύθυνα για την παραγωγή οργανικών οξέων όπως είναι το γαλακτικό, οξικό, φορμικό, ισοβαλερικό και ισοβουτυρικό οξύ, της ακετοΐνης, του διακετυλίου κ.α. (Blickstad 1983, Blickstad & Molin 1984, Nychas & Arkoudelos 1991, Drosinos & Board 1995, Drosinos & Nychas 1997). Η παραγωγή οργανικών οξέων από αυτά έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της οξύτητας στο μέσο της ανάπτυξής τους όταν σε αυτό αποτελούν την κυρίαρχη αλλοιωγόνο σύνθεση (Dainty 1996).

Στην παρούσα μελέτη, οι μεταβολές κυρίως στην οσμή και στην εμφάνιση των φιλέτων με το κιτρικό στη συσκευασία αέρα και οι μεταβολές κυρίως στη γεύση των φιλέτων με το κιτρικό στη συσκευασία MAP, αποτέλεσαν τους ουσιαστικότερους λόγους απόρριψης των προϊόντων μετά από ψήσιμο. Οι μεταβολές στην οσμή και στην εμφάνιση των φιλέτων με το κιτρικό στη συσκευασία αέρα φαίνεται να οφείλονται στα αζωτούχα μεταβολικά προϊόντα των τριών πιο επικρατέστερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (*Pseudomonas* spp., βακτηρίων που παράγουν H₂S και

Enterobacteriaceae). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα προϊόντα αυτά είναι υπεύθυνα για τις δυσάρεστες οσμές και οδηγούν στην οργανοληπτική απόρριψη των αλιευμάτων. Οι μεταβολές στη γεύση στα φιλέτα με το κιτρικό στη συσκευασία MAP πιθανόν να οφείλονται στη χρήση του κιτρικού σε συνδυασμό με την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων από τους θετικούς κατά Gram αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, κυρίως τα οξυγαλακτικά βακτήρια, βρέθηκαν σε πληθυσμούς 5-6 log στο MAP, δηλαδή 1 log υψηλότεροι σε σχέση με τους πληθυσμούς τους στη συσκευασία αέρα. Οι μεταβολές αυτές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φιλέτων που ψήθηκαν έλαβαν χώρα 1 ημέρα μετά την απόρριψη των προϊόντων. Επομένως, η χρήση του κιτρικού σε συγκέντρωση 2% δεν προκάλεσε μεταβολές στα χαρακτηριστικά που οδηγούν στην οργανοληπτική απόρριψη πριν ή/και κατά το χρόνο απόρριψης των φιλέτων τσιπούρας στις συσκευασίες αέρα και MAP.

Συμπερασματικά, το κιτρικό είχε επίδραση στην τύχη του μικροβιακού πληθυσμού στα φιλέτα που εμβαπτίσθηκαν σε αυτό με αποτέλεσμα την επέκταση του εμπορικού χρόνου ζωής των φιλέτων κατά 1 ημέρα και στις δύο συσκευασίες. Επιπλέον, στη συσκευασία MAP, περιορίσε τους πληθυσμούς του *L. monocytogenes* έως 1 log.

Πίνακας 6.1. Χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης, γενική εμφάνιση και επίπεδο ολικού μικροβιακού πληθυσμού στο χρόνο απόρριψης των φιλέτων τσιπούρας υπό διαφορετικές μεταχειρίσεις και συνθήκες ατμόσφαιρας

Προϊόν	Μεταχείριση	Χρόνος απόρριψης (ημέρες)	Γενική εμφάνιση	Επίπεδο μικροβιακού πληθυσμού (log cfu/g)
Φιλέτα σε αερόβιες συνθήκες	Σε απιονισμένο νερό με pH 6	5	2,47±0,42	7,68
	Διάλυμα με tris-sodium citrate 2% (w/v) με pH 6	6	2,27±0,46	7,83
Φιλέτα σε MAP	Σε απιονισμένο νερό με pH 6	8	2,12±0,11	7,34
	Διάλυμα με tris-sodium citrate 2% (w/v) με pH 6	9	2,28±0,41	7,76

Πίνακας 6.2. Κινητικές παράμετροι μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας με ή χωρίς προσθήκη κιτρικών αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες στους 5°C για 10 ημέρες. Οι τιμές εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

Μικροοργανισμοί	Φυσική μικροβιακή σύνθεση							
	Χωρίς κιτρικό				Με tris-sodium citrate 2% (w/v)			
	Αρχικός πληθυσμός (log cfu/g)	Τελικός πληθυσμός Nmax (log cfu/g)	lag (d)	μmax (d ⁻¹)	Αρχικός πληθυσμός (log cfu/g)	Τελικός πληθυσμός Nmax (log cfu/g)	lag (d)	μmax (d ⁻¹)
Βακτήρια που παράγουν H ₂ S	3,50±0,07	8,23±0,14 (8,19±0,06)	0	0,671±0,02	3,46±0,06	8,06±0,06 (8,08±0,06)	1,44±0,11	0,662±0,03
<i>Pseudomonas</i> sp	3,81±0,03	8,94±0,11 (8,94±0,08)	0	0,737±0,04	3,13±0,12	8,92±0,04 (9,02±0,02)	0	0,675±0,02
Enterobacteriaceae	2,69±0,21	8,51±0,06 (8,45)	1,18±0,08	0,894±0,03	3,18±0,11	8,46±0,12 (8,54±0,07)	2,16±0,14	0,747±0,05
Οξυγαλακτικά βακτήρια	2,07±0,12	6,94±0,16 (>6,97)	1,18±0,11	0,548±0,05	2,07±0,04	6,54±0,08 (>6,35)	0,76±0,16	0,463±0,04
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<2,00	6,97±0,12 (>7,26)	2,04±0,14	0,628±0,08	<2,00	6,73±0,08 (>6,44)	0	0,456±0,06
<i>L. monocytogenes</i>	<2,00	<2,00	-	-	<2,00	<2,00	-	-

Πίνακας 6.3. Κινητικές παράμετροι μικροοργανισμών σε φιλέτα ιχθύος τσιπούρας τα οποία εμβολιάσθηκαν με *L. monocytogenes*, με ή χωρίς προσθήκη κιτρικών αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες στους 5°C για 10 ημέρες. Οι τιμές εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

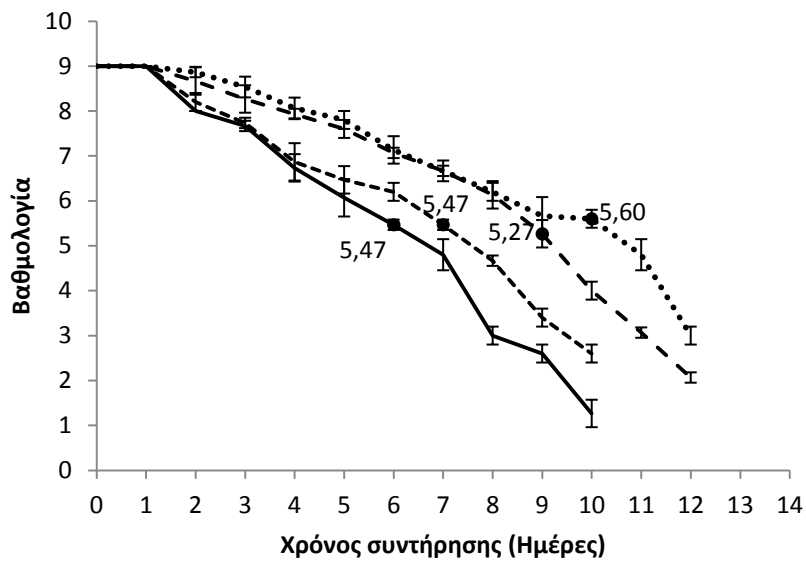
Μικροοργανισμοί	Φιλέτα με <i>L. monocytogenes</i>							
	Χωρίς κιτρικό				Με tris-sodium citrate 2% (w/v)			
	Αρχικός πληθυσμός (log cfu/g)	Τελικός πληθυσμός Nmax (log cfu/g)	lag (d)	μmax (d ⁻¹)	Αρχικός πληθυσμός (log cfu/g)	Τελικός πληθυσμός Nmax (log cfu/g)	lag (d)	μmax (d ⁻¹)
Βακτήρια που παράγουν H ₂ S	3,57±0,11	8,42±0,30 (>8,82)	0	0,520±0,02	3,72±0,11	8,35±0,08 (>8,68)	0	0,503±0,03
<i>Pseudomonas</i> sp	3,19±0,03	9,35±0,08 (9,60±0,09)	0	0,793±0,03	3,39±0,09	9,40±0,03 (9,48±0,07)	1,55±0,09	0,945±0,04
Enterobacteriaceae	3,01±0,17	9,10±0,09 (>9,22)	0	0,652±0,02	2,59±0,24	8,61±0,14 (>8,79)	1,31±0,08	0,698±0,03
Οξυγαλακτικά βακτήρια	2,09±0,09	7,54±0,09 (7,42±0,07)	3,86±0,08	1,215±0,04	2,27±0,14	7,13±0,06 (7,11±0,08)	2,56±0,13	0,805±0,05
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<2,00	7,72±0,09 (7,63±0,06)	2,00±0,07	0,903±0,03	<2,00	7,35±0,06 (7,18±0,09)	2,49±0,16	1,164±0,08
<i>L. monocytogenes</i>	2,75±0,12	6,13±0,12 (>6,29)	3,58±0,09	0,524±0,03	2,43±0,06	5,96±0,12 (>6,15)	0	0,392±0,03

Πίνακας 6.4. Κινητικές παράμετροι μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας με ή χωρίς προσθήκη κιτρικών αποθηκευμένα και αποθηκεύθηκαν σε συνθήκες MAP στους 5°C για 12 ημέρες. Οι τιμές εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

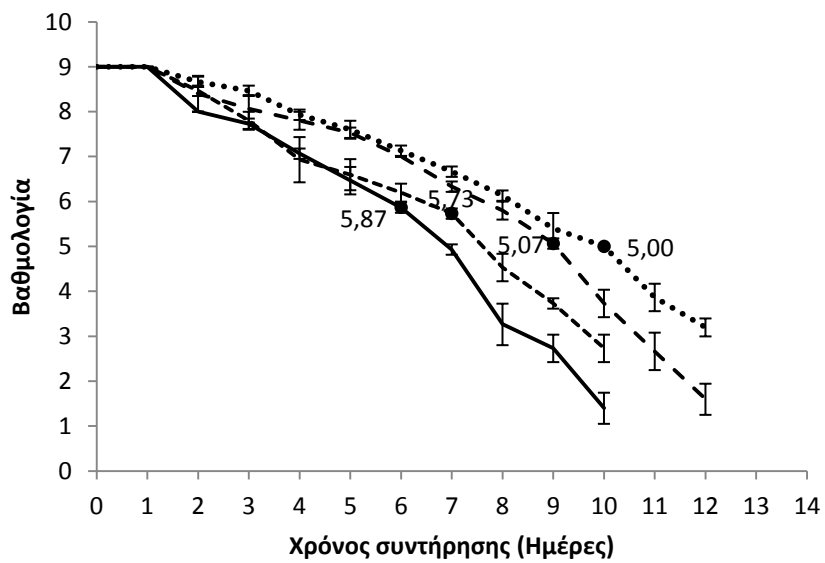
Μικροοργανισμοί	Φυσική μικροβιακή σύνθεση							
	Χωρίς κιτρικό				Με tris-sodium citrate 2% (w/v)			
	Αρχικός πληθυσμός (log cfu/g)	Τελικός πληθυσμός Nmax (log cfu/g)	lag (d)	μmax (d ⁻¹)	Αρχικός πληθυσμός (log cfu/g)	Τελικός πληθυσμός Nmax (log cfu/g)	lag (d)	μmax (d ⁻¹)
Βακτήρια που παράγουν H ₂ S	3,70±0,24	8,13±0,05 (>8,35)	0	0,402±0,03	3,34±0,12	7,14±0,12 (>7,04)	1,68±0,09	0,348±0,03
<i>Pseudomonas</i> sp	3,69±0,17	7,75±0,12 (7,59±0,08)	3,92±0,11	0,661±0,04	3,62±0,14	7,27±0,14 (7,28±0,08)	3,66±0,16	0,536±0,04
Enterobacteriaceae	3,57±0,11	7,35±0,12 (7,38)	3,32±0,14	0,640±0,02	3,69±0,14	7,26±0,04 (7,31)	3,91±0,11	0,564±0,03
Οξυγαλακτικά βακτήρια	3,69±0,19	7,40±0,15 (7,33±0,09)	0	0,428±0,05	3,56±0,09	6,92±0,16 (>6,81)	2,75±0,17	0,327±0,06
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	2,68±0,12	7,62±0,06 (7,49±0,14)	0	0,536±0,06	2,98±0,12	6,99±0,12 (>6,97)	0	0,338±0,04
<i>L. monocytogenes</i>	<2,00	<2,00	-	-	<2,00	<2,00	-	-

Πίνακας 6.5. Κινητικές παράμετροι μικροοργανισμών σε φιλέτα τσιπούρας τα οποία εμβολιάστηκαν με *L. monocytogenes* με ή χωρίς προσθήκη κιτρικών αποθηκευμένα σε συνθήκες MAP στους 5°C για 12 ημέρες. Οι τιμές εκτός της παρένθεσης παρουσιάζουν τα δεδομένα που ελήφθησαν από την απαρίθμηση των μικροοργανισμών, ενώ οι τιμές εντός παρένθεσης παρουσιάζουν την προσαρμογή των μετρήσεων με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994).

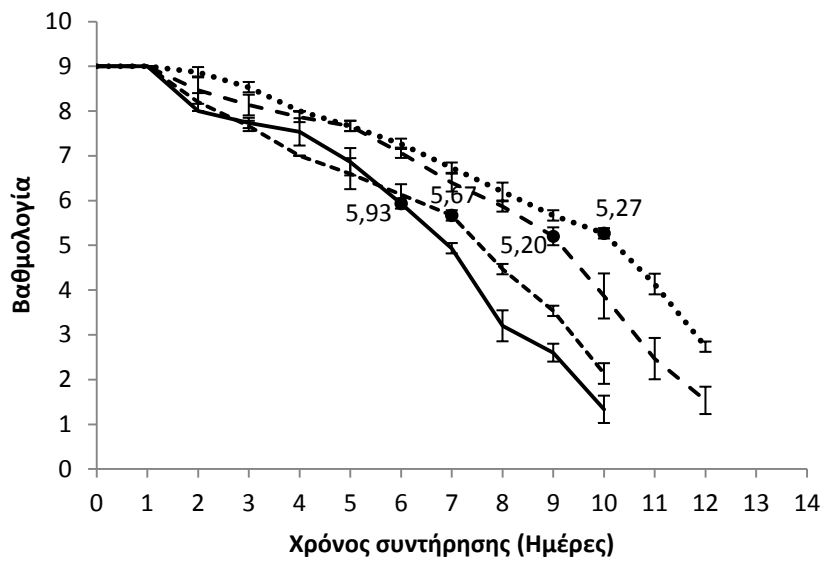
Μικροοργανισμοί	Φιλέτα με <i>L. monocytogenes</i>							
	Χωρίς κιτρικό				Με tris-sodium citrate 2% (w/v)			
	Αρχικός πληθυσμός (log cfu/g)	Τελικός πληθυσμός Nmax (log cfu/g)	lag (d)	μmax (d ⁻¹)	Αρχικός πληθυσμός (log cfu/g)	Τελικός πληθυσμός Nmax (log cfu/g)	lag (d)	μmax (d ⁻¹)
Βακτήρια που παράγουν H ₂ S	3,54±0,11	7,41±0,07 (7,56±0,05)	2,20±0,13	0,454±0,04	3,55±0,10	5,93±0,06 (>5,92)	9,30±0,52	0,750±0,03
<i>Pseudomonas</i> sp	3,93±0,19	6,48±0,24 (6,58±0,19)	5,20±0,17	0,412±0,02	2,73±0,14	5,00±0,11 (4,53±0,13)	0	0,483±0,02
Enterobacteriaceae	3,57±0,10	6,75±0,08 (>6,67)	0	0,265±0,03	3,57±0,12	5,15±0,23 (5,20±0,17)	0	0,142±0,05
Οξυγαλακτικά βακτήρια	3,70±0,17	6,02±0,04 (6,10±0,02)	0	0,222±0,03	3,54±0,23	5,35±0,06 (>5,35)	0	0,123±0,07
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<2,00	7,16±0,05 (7,38±0,07)	0	0,481±0,05	<2,00	7,77±0,11 (8,02±0,09)	0,91±0,08	0,638±0,09
<i>L. monocytogenes</i>	2,88±0,12	5,79±0,10 (6,08±0,08)	0	0,287±0,04	2,89±0,13	4,78±0,10 (>4,72)	0	0,158±0,06



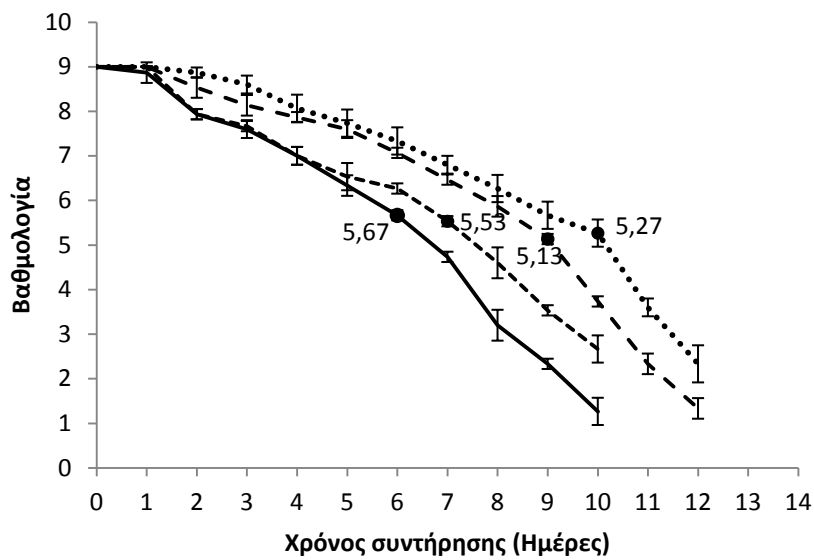
(α)



(β)

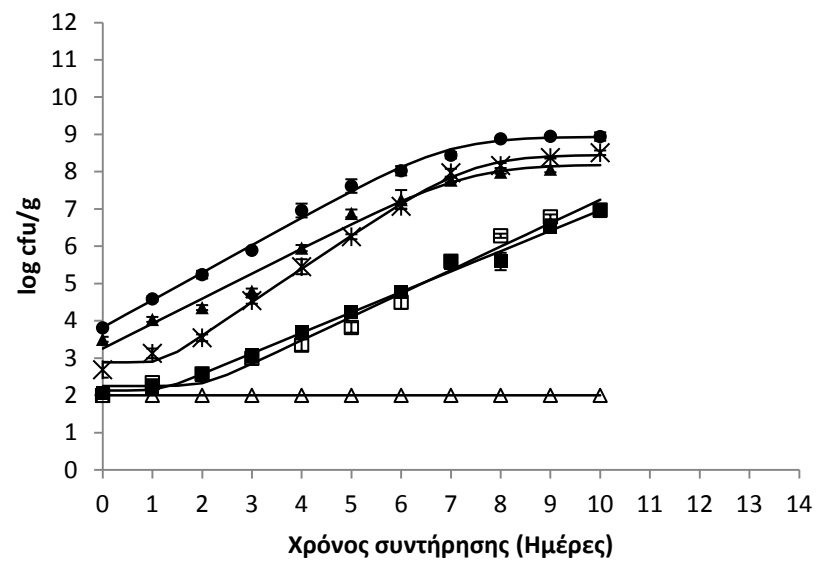


(γ)

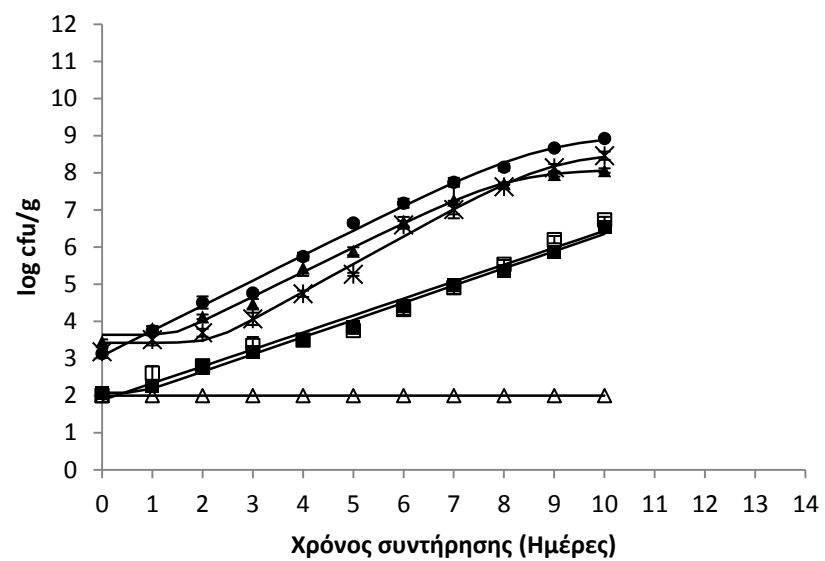


(δ)

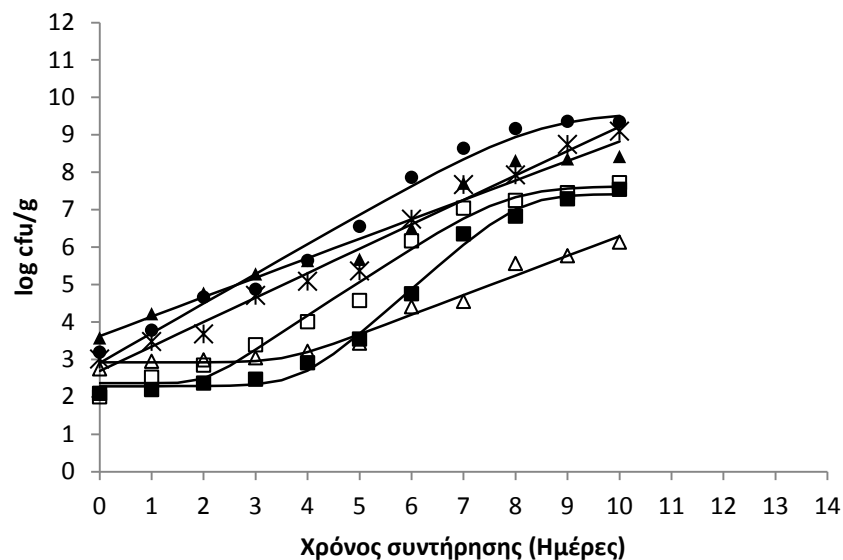
Σχήμα 6.1. Μεταβολές των χαρακτηριστικών οσμή (α), γεύση (β), συνεκτικότητα (γ) και εμφάνιση (δ) των ψημένων φιλέτων, σε συσκευασία αέρα (-) και MAP (- - -) και των ψημένων φιλέτων με την προσθήκη κιτρικών σε συσκευασία αέρα (----) και MAP (.....) στους 5°C. Με το σύμβολο (●) παρουσιάζεται η βαθμολογία που αντιστοιχεί στο χρόνο απόρριψης των φιλέτων.



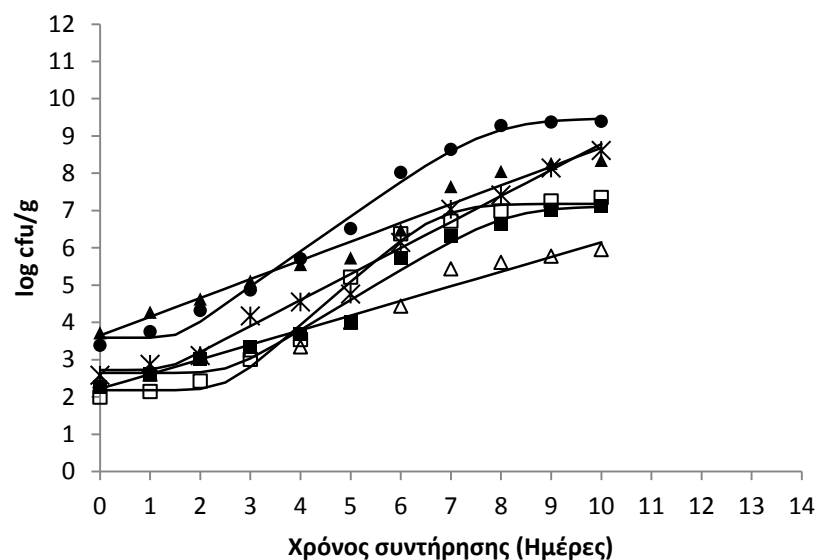
(α)



(β)

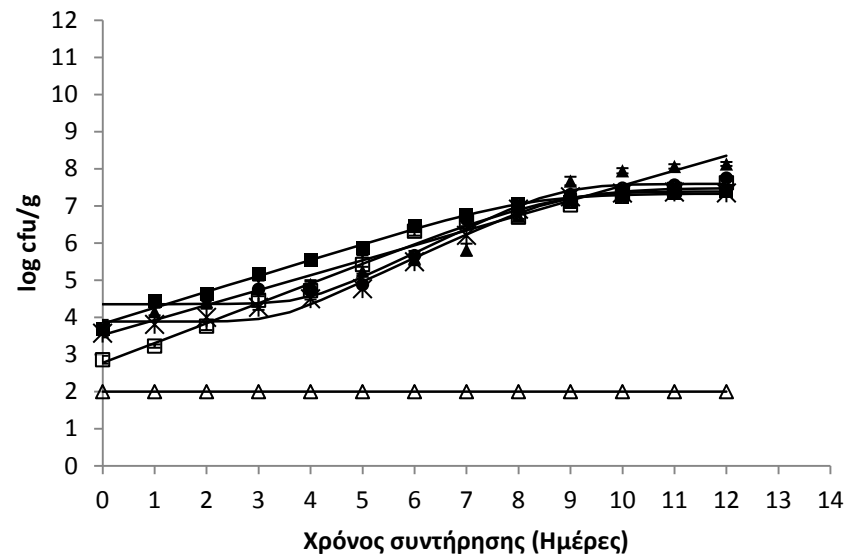


(γ)

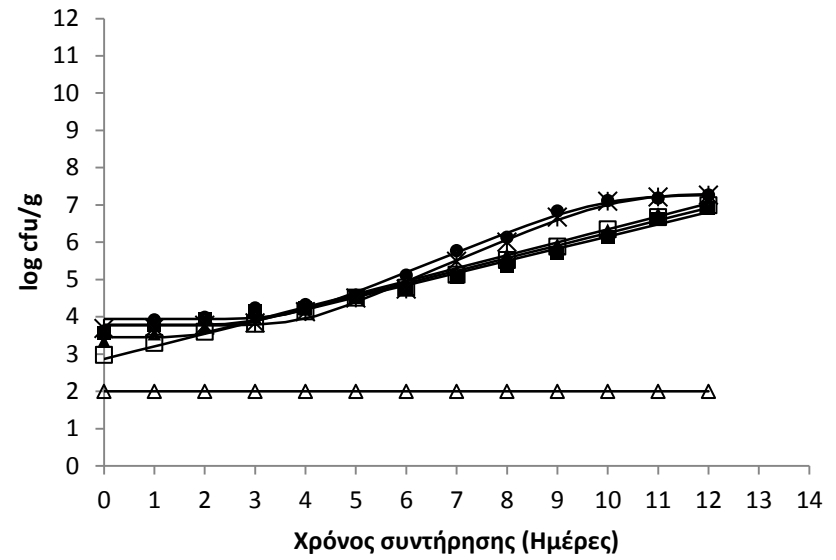


(δ)

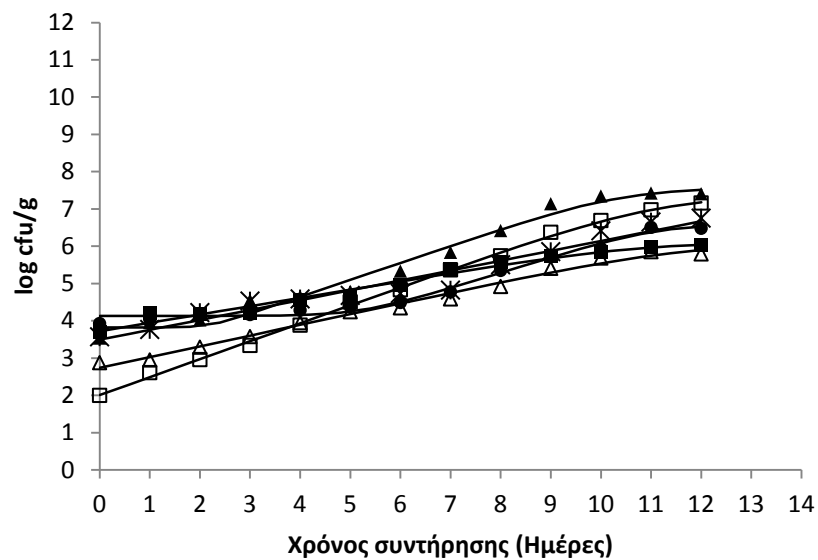
Σχήμα 6.2. Μεταβολές μικροβιακού πληθυσμού σε φιλέτα τσιπούρας (α & β) και σε φιλέτα ενοφθαλμισμένα με *L. monocytogenes* (γ & δ), χωρίς (α & γ) και με την προσθήκη κιτρικών (β & δ) που αποθηκεύθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 5°C για 10 ημέρες. Τα σημεία αντιστοιχούν στον μέσο όρο 3 επαναλήψεων ενώ οι καμπύλες προσαρμογής έγιναν με τη χρήση του μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994). *Pseudomonas* spp. (●), βακτήρια που παράγουν H₂S (▲), *Brochothrix thermosphacta* (□), οξυγαλακτικά βακτήρια (■), Enterobacteriaceae (★) και *L. monocytogenes* (Δ).



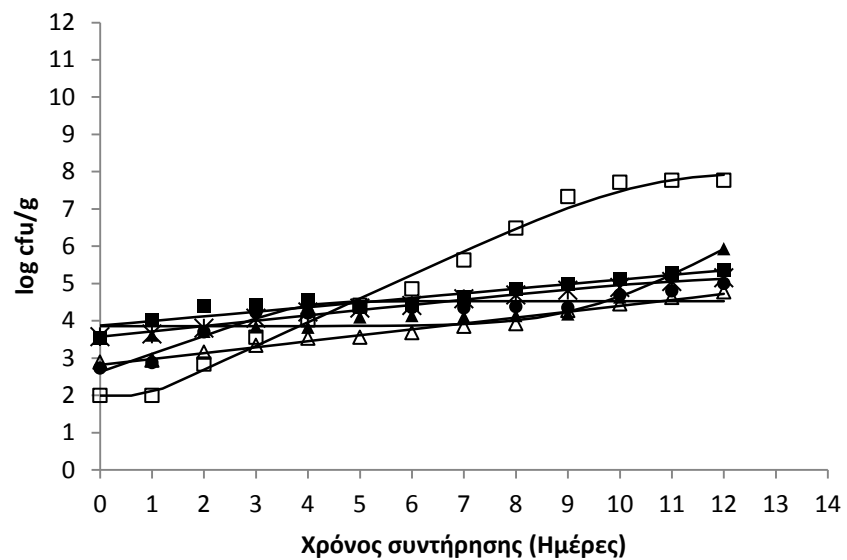
(α)



(β)



(γ)



(δ)

Σχήμα 6.3. Μεταβολές μικροβιακού πληθυσμού σε φιλέτα τσιπούρας (α & β) και σε φιλέτα ενοφθαλμισμένα με *L. monocytogenes* (γ & δ), χωρίς (α & γ) και με την προσθήκη κιτρικών (β & δ) που αποθηκεύθηκαν σε MAP στους 5°C για 12 ημέρες. Τα σημεία αντιστοιχούν στον μέσο όρο 3 επαναλήψεων ενώ οι καμπύλες προσαρμογής έγιναν με τη χρήση του μοντέλου Barranyi (Baranyi & Roberts 1994). *Pseudomonas* spp. (●), βακτήρια που παράγουν H₂S (▲), *Brochothrix thermosphacta* (□), οξυγαλακτικά βακτήρια (■), Enterobacteriaceae (★) και *L. monocytogenes* (Δ).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. Γενική Συζήτηση, Συμπεράσματα και προτάσεις για μελλοντική έρευνα

7.1 Μικροβιολογική αλλοίωση και αλλοιωγόνους μικροοργανισμοί

Η μικροβιακή αλλοίωση αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό υποβάθμισης της ποιότητας στους νωπούς ιχθύες (Gram & Dalgaard 2002). Το υψηλό pH 6–7 και η υψηλή περιεκτικότητα της σάρκας των ιχθύων σε ελεύθερα αμινοξέα και άλλες αζωτούχες ενώσεις (μη πρωτεϊνικό άζωτο) τα καθιστούν κατάλληλα για την γρήγορη αύξηση μικροοργανισμών (Dalgaard 2003). Οι μικροοργανισμοί που απαντώνται στα αλιεύματα προέρχονται από το φυσικό περιβάλλον όπου οι ιχθύες ζουν και από επιμόλυνση (Ashie *et al.* 1996, Gram & Huss 1996). Αρχικά, ο Ολικός Μικροβιακός Πληθυσμός είναι χαμηλός (<3 log cfu/g) στους ολόκληρους ιχθύες και περίπου 1 log υψηλότερος στα φιλέτα. Κατά τη συντήρηση των αλιευμάτων, μόνο ένα μικρό κλάσμα της αρχικής μικροβιακής σύνθεσης φθάνει σε υψηλά αριθμητικά επίπεδα των 7-9 log cfu/g που προκαλούν την αλλοίωση (Dalgaard *et al.* 1993, Gram & Huss 1996, Huis in't Veld 1996, Olafsdottir *et al.* 1997). Οι μικροοργανισμοί αυτοί, γνωστοί ως Ειδικοί Αλλοιωγόνους Μικροοργανισμοί (EAM), παράγουν τους μεταβολίτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές στα τρόφιμα και επομένως την οργανοληπτική τους απόρριψη (Dalgaard *et al.* 1993, Gram & Huss 1996, Huis in't Veld 1996).

Η επιλογή των μικροοργανισμών που θα αποτελέσουν τους EAM εξαρτάται κυρίως από τις επικρατούσες συνθήκες κατά τη συντήρηση-αποθήκευση όπως είναι η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα (Leisner & Gram 1999, Dalgaard 2003). Διαφορετικοί μικροοργανισμοί επικρατούν σε αερόβιες συνθήκες σε σχέση με αυτούς που επικρατούν σε συνθήκες MAP (Lannelonque *et al.* 1982, Dalgaard 1995a, Drosinos &

Nychas 1996, Dalgaard *et al.* 1997, Drosinos *et al.* 1997, Koutsoumanis & Nychas 1999, Taoukis *et al.* 1999a,b, Koutsoumanis *et al.* 2000). Το ποσοστό οξυγόνου αλλά και διοξειδίου του άνθρακα στη συσκευασία MAP είναι οι κύριοι παράγοντες επιλογής των EAM. Σε σχετικά υψηλά ποσοστά οξυγόνου όπως 10% είναι δυνατόν να επικρατούν οι ίδιοι μικροοργανισμοί που επικρατούν και στη συσκευασία αέρα (Pournis *et al.* 2005, παρούσα διατριβή).

Για τη βαθύτερη κατανόηση της διαδικασίας της αλλοίωσης πρωταρχική ανάγκη είναι ο προσδιορισμός των 'πραγματικά' αλλοιωγόνων μικροοργανισμών. Στο παρελθόν διάφοροι ερευνητές ασχολήθηκαν με τη μελέτη των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα. Οι ερευνητές αυτοί μελέτησαν τη μικροβιακή σύνθεση των ιχθυερών είτε σε εκλεκτικά ή σε γενικής χρήσης θρεπτικά υλικά με τον έλεγχο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών κάθε αποικίας (Gram *et al.* 1987, Gennari & Tomaselli 1988, Heinsz *et al.* 1988, Jorgensen & Huss 1989, Dalgaard 1995, Gennari *et al.* 1999, Rodriguez *et al.* 2003). Ωστόσο, η χρήση των φαινοτυπικών δοκιμών (μορφολογικές, βιοχημικές) σε καθαρές καλλιέργειες δεν επαρκεί για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών κυρίως εξαιτίας της χαμηλής διακριτικής τους ικανότητας. Όπως είναι γνωστό και από τη βιβλιογραφία αλλά και τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, τα *Pseudomonas* spp. και τα *Shewanella* spp. βρέθηκε να αποτελούν τους κυρίαρχους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς στους ιχθύες που συντηρούνται σε αερόβιες συνθήκες σε χαμηλές θερμοκρασίες, με τα *Pseudomonas* spp. να αποτελούν τους EAM. Παρόλα αυτά, η εφαρμογή μοριακών καλλιεργητικών τεχνικών έδειξε ότι ένα ποσοστό των βακτηρίων αυτών ταυτοποιήθηκε εσφαλμένα με τις κλασσικές τεχνικές ως *Pseudomonas* spp. Τα βακτήρια αυτά τα οποία αποτελούσαν ένα σημαντικό ποσοστό της μικροβιακής σύνθεσης στην ολόκληρη τσιπούρα στον

πάγο, με την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA, ταυτοποιήθηκαν ως *Psychrobacter immobilis* και *Psychrobacter cryohalolentis*. Στη συσκευασία MAP, το *Carnobacterium maltaromaticum* strain MMF-32 βρέθηκε να συγκυριαρχεί με το *Pseudomonas fragi* στους 5°C, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που έδωσαν οι μοριακές καλλιεργητικές τεχνικές. Το *C. maltaromaticum* είχε ταυτοποιηθεί εσφαλμένα ως *Lactobacillus* spp. με τις φαινοτυπικές δοκιμές. Οι μοριακές τεχνικές έχουν αναγνωρισθεί ως το πιο χρήσιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα (Martinez *et al.* 2011). Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται στα θρεπτικά υλικά μπορούν εύκολα να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν με αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA λαμβάνοντας μόνο μία μικρή ποσότητα DNA. Το αποτέλεσμα το οποίο λαμβάνεται με την αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA είναι μακράν ακριβέστερο σε σχέση με αυτό το οποίο λαμβάνεται με τις φαινοτυπικές δοκιμές κυρίως λόγω της φυλογενετικής πληροφορίας που παρέχει το γονίδιο αυτό.

Παρόλα αυτά, η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που έχουν αναπτυχθεί στα τρυβλία δε σημαίνει ότι περιγράφει τη μικροβιακή σύνθεση στα αλιεύματα αλλά τους μικροοργανισμούς της μικροβιακής σύνθεσης που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν αποικίες στα συγκεκριμένα θρεπτικά υλικά. Ωστόσο, ο αριθμός και τα είδη των μικροοργανισμών που αναπτύσσεται στα θρεπτικά γενικής χρήσης δίνει μια γενική εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας η οποία εξαρτάται από το περιβάλλον από το οποίο προέρχονται οι πρώτες ύλες, τις συνθήκες υγιεινής που επικρατούν στο χώρο επεξεργασίας και των συνθηκών αποθήκευσης του τροφίμου (Huss 1995, Dalgaard 2003). Στην πραγματικότητα, με τον τρόπο αυτό, ταυτοποιούνται οι μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να αναπτύσσονται στα θρεπτικά υλικά και δεν είναι σίγουρο ότι μόνο αυτοί υπάρχουν στη σάρκα ενός αλιευτικού προϊόντος και κατ' επέκταση μόνο αυτοί

συμμετέχουν στην αλλοίωση. Οι Ward *et al.* (1990) αναφέρουν ότι στα τρυβλία είναι δυνατόν να αναπτυχθεί μικρότερο ποσοστό του 1% των ειδών των μικροοργανισμών που απαρτίζουν τη μικροβιακή σύνθεση ενός περιβαλλοντικού δείγματος, λόγω της ύπαρξης μικροοργανισμών που δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικά υλικά (non culturable microorganisms). Επιπλέον, οι Broekaert *et al.* (2011) αναφέρουν ότι αρκετοί σημαντικοί μικροοργανισμοί που δύναται να καλλιεργηθούν (culturable microorganisms) αδυνατούν ωστόσο να αναπτυχθούν σε ορισμένα θρεπτικά υλικά γενικής χρήσης. Οι μοριακές μη καλλιεργητικές τεχνικές αποτελούν την εναλλακτική προσέγγιση για τη διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης στα τρόφιμα διότι έχουν το πλεονέκτημα έναντι των καλλιεργητικών να περιγράφουν όχι μόνο τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στα θρεπτικά υλικά αλλά και αυτούς οι οποίοι είναι αδύνατον να καλλιεργηθούν ή γενικότερα αυτούς που διαφεύγουν των καλλιεργητικών τεχνικών (Olofsson *et al.* 2007, Schirmer *et al.* 2009, Rasolofa *et al.* 2010). Πράγματι, η εφαρμογή της τεχνικής αυτής στην παρούσα μελέτη έδειξε ότι τα *Pseudomonas* spp. συγκυριαρχούν με άλλους μικροοργανισμούς οι οποίοι διαφεύγουν της ταυτοποίησης με καλλιεργητικές τεχνικές όπως το *A. salmonicida* στην ολόκληρη τσιπούρα στον πάγο. Η αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των βακτηρίων καθώς και για τον εντοπισμό των άγνωστων βακτηρίων σε επίπεδο γένους ή είδους (Sacchi *et al.* 2002).

Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία αλλά όπως προέκυψε και από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, η μικροβιακή σύνθεση των αλιευτικών προϊόντων είναι διαφορετική υπό διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και ατμόσφαιρας. Λαμβάνοντας υπόψη τη μοριακή ταυτοποίηση ως πλέον ακριβέστερη, το

P. fragi αποτέλεσε τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό στα φιλέτα τσιπούρας στη συσκευασία αέρα σε χαμηλές θερμοκρασίες (0 και 5 °C), ενώ το *P. veronii* στους 0 °C και το *C. maltaromaticum* στους 5 °C στα φιλέτα στη συσκευασία MAP. Το *P. migulae* αποτέλεσε τον κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροοργανισμό στους 15 °C στα φιλέτα και στις δύο ατμόσφαιρες. Πράγματι, η συσκευασία MAP δεν επιδρά στη μικροβιακή σύνθεση σε υψηλές θερμοκρασίες. Επιπλέον, ο υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στη συσκευασία αέρα και MAP, δείχνει ότι η αποθήκευση σε MAP επηρεάζει την αύξηση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε σχέση με την αποθήκευση σε αερόβιες συνθήκες. Η εφαρμογή του MAP σε σχέση με τη συντήρηση στον αέρα κυρίως στις χαμηλές θερμοκρασίες έχει ως γενικότερο αποτέλεσμα: i) την αύξηση του ρυθμού αύξησης των θετικών κατά Gram βακτηρίων (*B. thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια), ii) τη μείωση του ρυθμού αύξησης των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, iii) την αύξηση του τελικού πληθυσμού των θετικών κατά Gram βακτηρίων και iv) τη μείωση του τελικού πληθυσμού των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.

7.2 Χημικοί δείκτες αλλοίωσης

Η αλλοίωση γίνεται αντιληπτή εξαιτίας των αλλαγών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των αλιευτικών προϊόντων. Ουσίες οι οποίες παράγονται κυρίως από μικροβιακή δραστηριότητα όπως είναι το TVB-N, TMA-N, οι βιογενείς αμίνες κ.ά. έχουν προταθεί ή/και χρησιμοποιηθεί ως δείκτες αλλοίωσης έως σήμερα. Η χρήση του TVB-N στα αλιεύματα και των άλλων αζωτούχων μεταβολιτών (TMA-N, βιογενείς αμίνες κτλ), ενώ αποτελούν έναν καλό δείκτη για την αποδοχή ή όχι αυτών των προϊόντων, ωστόσο δεν επαρκούν για να χαρακτηρίσουν την 'φρεσκότητα' του

προϊόντος και να βοηθήσουν στην αξιολόγησή της. Αυτό κυρίως οφείλεται στο γεγονός ότι οι τιμές τους δεν μεταβάλλονται κατά το πρώτο ήμισυ ή ακόμη και τα 2/3 του εμπορικού χρόνου ζωής, με αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο ως δείκτες αλλοίωσης-απόρριψης και όχι φρεσκότητας. Είναι λοιπόν προφανές ότι για τον γρήγορο προσδιορισμό της φρεσκότητας θα πρέπει να ανατρέξουμε στη μελέτη άλλων μικροβιακών μεταβολιτών. Αρκετή έρευνα έχει πραγματοποιηθεί στην παραγωγή οργανικών οξέων αλλά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να θεωρηθούν ικανοποιητικά μόνο στις περιπτώσεις συντήρησης σε MAP, όπου επικρατούν μικροοργανισμοί με μεταβολισμό προς παραγωγή οξέων, όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η αναζήτηση πιο αξιόπιστων μεθόδων από διάφορους ερευνητές αλλά και από την παρούσα μελέτη ανέδειξε αρκετές ουσίες οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιούνται ως χημικοί δείκτες αλλοίωσης μικροβιακής προέλευσης στα αλιευτικά προϊόντα. Οι ουσίες που έχουν αναφερθεί ως πιθανοί χρήσιμοι χημικοί δείκτες κατά την αλλοίωση των αλιευμάτων στη βιβλιογραφία είναι η ethanol, 2-methyl-butanal, 1-Penten-3ol, 1-Propanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 3-hydroxy-1-butanone, 2-butanone και το acetic acid σε καπνιστό σολομό σε κενό στους 5 και 10°C (Jorgensen et al. 2001, Jonsdottir et al. 2008), η 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-butanal, 3-methyl-butanal και η 3-hydroxy-1-butanone σε ολόκληρους ιχθύες τσιπούρας και σε προ-ψημένες γαρίδες στον πάγο (Soncin et al. 2008), η 3-methyl-1-butanol και η Pentadecane σε τόνο στους 30 °C και στον πάγο (Edirisinghe et al. 2007). Πράγματι, αρκετές από τις ουσίες αυτές προέκυψε από την παρούσα διδακτορική διατριβή ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χημικοί δείκτες νωπότητας/αλλοίωσης, κυρίως μικροβιακής προέλευσης, των ιχθύων. Η 3-methyl-butanal αποτέλεσε την σημαντικότερη ουσία η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως χημικός δείκτης νωπότητας/αλλοίωσης μικροβιακής προέλευσης.

Επιπλέον, οι ουσίες Ethyl-2-methylbutyrate, Ethyl tiglate, Ethyl isovalerate, Isoamyl alcohol και η 2-ethyl-1-hexanol που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως χημικοί δείκτες αλλοίωσης μικροβιακής προέλευσης για την τσιπούρα.

7.3 Μικροβιακές αλληλεπιδράσεις

Η τύχη των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης δεν εξαρτάται μόνο από τις συνθήκες αποθήκευσης αλλά και από τις μικροβιακές αλληλεπιδράσεις. Οι αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των ΕΑΜ επιδρά στον ειδικό ρυθμό αύξησης και στο μέγεθος του τελικού πληθυσμού τους (Tsigarida *et al.* 2003, παρούσα διατριβή). Σε περίπτωση επιμόλυνσης με κάποιο παθογόνο, η τύχη του παθογόνου εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις αυτές (Buchanan & Bagi 1999).

Το *L. monocytogenes* είναι ένα παθογόνο βακτήριο με το οποίο επιμολύνονται τα αλιεύματα κυρίως κατά τις διαδικασίες φιλετοποίησης, συσκευασίας κτλ., από τις επιφάνειες και τον εξοπλισμό επεξεργασίας (Jay *et al.* 2005). Η αύξηση ή όχι των παθογόνων μικροοργανισμών εξαρτάται από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις με τους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (Buchanan & Bagi 1999, Gram *et al.* 2002, Skandamis & Nychas 2002). Ιδιαίτερα σε συνθήκες μειωμένου οξυγόνου, όπως στη συσκευασία MAP, η παρεμπόδιση των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία πιο ευνοϊκού περιβάλλοντος για την αύξηση παθογόνων μικροοργανισμών (Farber 2001, παρούσα διατριβή). Διάφορα φυσικά και χημικά αντιμικροβιακά έχουν εκτενώς μελετηθεί με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα εμπόδια. Η μελέτη της

επίδρασης των συνθηκών επεξεργασίας και συντήρησης στην μικροβιακή οικολογία των αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών των αλιευμάτων οδηγεί στην εξαγωγή συμπερασμάτων τα οποία θα χρησιμεύσουν για την παραγωγή και διάθεση υγιεινών και ποιοτικών αλιευτικών προϊόντων.

7.4 Προσθήκη κιτρικών αλάτων

Οι μικροοργανισμοί της φυσικής μικροβιακής σύνθεσης των φιλέτων ιχθύος τσιπούρας επιδρούν στην τύχη του *L. monocytogenes* τόσο σε συσκευασία αέρα όσο και σε MAP. Ιδιαίτερα στη συσκευασία MAP, η πτώση των πληθυσμών των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που ευνοούνται σε αερόβιες συνθήκες, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του πληθυσμού του παθογόνου σε μεγαλύτερα επίπεδα από αυτά που παρατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες. Επομένως, μια ενδεχόμενη επιμόλυνση των προϊόντων με το *L. monocytogenes* κατά τα στάδια της παραγωγικής αλυσίδας αυξάνει τον κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Μία λύση για το παραπάνω πρόβλημα αποτελεί η χρήση πρόσθετων εμποδίων όπως είναι τα αντιμικροβιακά συστήματα.

Έχει αναφερθεί ότι τα άλατα των οργανικών οξέων δρουν έναντι της αύξησης του *L. monocytogenes* στους ιχθύες (Qvist *et al.* 1994). Πράγματι, η χρήση κιτρικού έδειξε ότι επιδρά στην τύχη του παθογόνου αυτού, κυρίως στα φιλέτα στη συσκευασία MAP. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης του παθογόνου ήταν μικρότερος στα φιλέτα με το άλας κιτρικού οξέος σε MAP και ο τελικός πληθυσμός του 1 log χαμηλότερος σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το αντιμικροβιακό. Επιπλέον, η χρήση κιτρικού (2,5%) έχει αποδειχθεί ότι έχει αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση έναντι των *Pseudomonas* spp. και των *Shewanella* spp. (Sallam 2007). Στην παρούσα διατριβή αποδείχθηκε ότι η χρήση κιτρικού σε συγκέντρωση τέτοια ώστε να μην επηρεάζει δυσμενώς τα οργανοληπτικά

χαρακτηριστικά των φιλέτων, π.χ. έντονα ξινή γεύση κτλ., είχε μικρή αντιμικροβιακή δράση επιμηκώνοντας τον χρόνο ζωής κατά 1 ημέρα.

7.5 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Οι πληροφορίες που συλλέχθηκαν από τη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή θα μπορούσαν να αποτελέσουν αφετηρία για περαιτέρω μελέτη:

α) του δυναμικού και της ικανότητας αλλοίωσης (spoilage potential and spoilage activity) των μικροοργανισμών οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν με τις μοριακές τεχνικές που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη όπως το *Aeromonas salmonicida*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Psychrobacter immobilis* και *Psychrobacter cryohalolentis*, αλλά και άλλων μικροοργανισμών που πιθανόν να συμμετέχουν στην αλλοίωση. Η αλλοιωγόνος δυναμική των μικροοργανισμών αυτών μπορεί να μελετηθεί με τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη διατριβή ή και άλλων αναλυτικών τεχνικών.

β) της διερεύνησης της ανάπτυξης βιοαισθητήρων με πρακτική εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων. Με ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών οι οποίες αναφέρθηκαν στην παρούσα διατριβή ως πιθανοί χημικοί δείκτες αλλοίωσης, θα μπορεί να διερευνηθεί η ανάπτυξη βιοαισθητήρων ο οποίοι θα ανιχνεύουν τους μικροβιακούς μεταβολίτες (πηκτικές ουσίες στην παρούσα μελέτη) και θα τους συσχετίζουν με την ποιότητα του προϊόντος και τον εναπομείναντα εμπορικό χρόνο ζωής. Για παράδειγμα, οι Alimelli et al (2007) χρησιμοποίησαν χημικούς αισθητήρες, ευαίσθητους στις πηκτικές ενώσεις οι οποίες παράγονταν κατά την αλλοίωση αλιευτικών προϊόντων. Τα δεδομένα των βιοαισθητήρων λαμβάνονταν σε μια οθόνη υπολογιστή.

γ) Νέοι μικροοργανισμοί που πιθανόν να συνεισφέρουν στην αλλοίωση των ιχθύων αποκαλύπτονται συνεχώς με την εφαρμογή των μοντέρνων τεχνικών (μοριακών). Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδίου 16S rRNA (περίπου 1500 bp) μετά από κλωνοποίηση δίνει μακράν την ακριβέστερη φυλογενετική πληροφορία σε σχέση με άλλες μη καλλιεργητικές τεχνικές (DGGE, TGGE, T-RFLP, SSCP) που στοχεύουν μόνο σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου 16S rRNA (έως 700 bp, τις περισσότερες φορές 200-400 bp). Παρόλα αυτά ελάχιστες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με την τεχνική αυτή στα τρόφιμα και ιδιαίτερα στα αλιευτικά προϊόντα (Rudi *et al.* 2004, Olofsson *et al.* 2007, Schirmer *et al.* 2009, Rasolofo *et al.* 2010, Parlapani *et al.* 2013). Οι ερευνητές συνεχίζουν να βελτιώνουν συνεχώς τις τεχνικές και τα πρωτόκολλα με σκοπό τη διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης σε ένα δείγμα. Πρόσφατα, η εισαγωγή μοριακών τεχνικών, μέσω των οποίων οι γενετικές πληροφορίες προκύπτουν κατευθείαν από τα δείγματα, παρέχει ένα νέο τρόπο ανάλυσης της «γενετικής ποικιλομορφίας» (phylotypes) των οργανισμών σε ένα δείγμα. Τέτοιου τύπου τεχνική αποτελεί το “Pyrosequencing” κατά την οποία η φυλογενετική πληροφορία των οργανισμών προκύπτει από τη μελέτη μόνο 400 bp περίπου. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται στα τρόφιμα τα τελευταία χρόνια. Από το 2010 έως σήμερα υπάρχουν περίπου 11 μελέτες στην παγκόσμια βιβλιογραφία με σκοπό τη διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης σε ένα τρόφιμο (Roh *et al.* 2010, Ercolini *et al.* 2011, Koyanagi *et al.* 2011, Lopez-Velasco *et al.* 2011, Nam *et al.* 2012a,b,c, Park *et al.* 2012, Rossmann *et al.* 2012, Ercolini 2013, Jung *et al.* 2013). Από αυτές, οι 4 αφορούν τα αλιεύματα (Roh *et al.* 2010, Koyanagi *et al.* 2011, Ercolini 2013, Jung *et al.* 2013). Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής σε σχέση με άλλες μη καλλιεργητικές τεχνικές είναι ότι αποκαλύπτουν χιλιάδες αλληλουχίες οι οποίες κάποιες φορές αντιστοιχούν σε

βακτήρια τα οποία δεν έχουν βρεθεί ποτέ σε τρόφιμα. Οι Ercolini *et al.* (2011) αναφέρουν βακτήρια τα οποία συμμετέχουν στην αλλοίωση του κρέατος σε συσκευασία κενού και δεν έχουν απομονωθεί ποτέ από τρόφιμα.

δ) Τα πρωτόκολλα εκχύλισης του προκαρυωτικού DNA απευθείας από τη σάρκα των αλιευμάτων ή κρέατος βελτιώνονται συνεχώς. Η εκχύλιση DNA των μικροοργανισμών σε όλες τις μελέτες που αναφέρθηκαν στην παρούσα διατριβή, έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως λαμβάνοντας 1ml δείγματος μετά από δεκαδική αραιώση. Παρόλο που στην παρούσα διατριβή η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε απευθείας από περίπου 1g σάρκας χωρίς να γίνει καμία αραιώση, η εκχύλιση DNA από μεγαλύτερη ποσότητα ενός δείγματος (25-40 g) αποτελεί άμεση προτεραιότητα. Επομένως, η διερεύνηση της μικροβιακής σύνθεσης στα αλιευτικά προϊόντα με την τεχνική του Pyrosequencing με DNA που θα προκύψει από μεγαλύτερη ποσότητα ενός δείγματος, τουλάχιστον 25 g, θα συμβάλλει στην καλύτερη περιγραφή των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε ένα δείγμα.

ε) μιγμάτων με χαμηλότερο οξυγόνο που να ευνοούν τα οξυγαλακτικά με σκοπό να αντικαταστήσουν το υπάρχον εμπορικό μίγμα ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερος εμπορικός χρόνος και το κυριότερο να παρεμποδίσει την αύξηση παθογόνων όπως το *L. monocytogenes*.

στ) της επίδρασης καινοτόμων αντιμικροβιακών συστημάτων στην τύχη των αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών. Η χρήση μοντέρνων αντιμικροβιακών συστημάτων όπως τα αντιμικροβιακά σε εδώδιμες μεμβράνες (edible films) και σε επικαλυπτικά στρώματα (Coatings) αποτελούν τα νέα όπλα του μέλλοντος εναντίον της αύξησης των μικροοργανισμών στους ιχθύες (Min *et al.* 2005, Fan *et al.* 2009, Gómez-Estaca *et al.* 2010). Επιπλέον, διάφορες φυσικές ουσίες όπως είναι τα εκχυλίσματα

φυτών εγκλωβισμένα μέσα σε νανοσωματίδια όπως είναι τα λιποσώματα δοκιμάζονται σε αρκετά εργαστήρια τροφίμων στον κόσμο με σκοπό την εύρεση κατάλληλων αντιμικροβιακών συστημάτων. Οι καινοτόμες αυτές τεχνολογίες αποσκοπούν στη διάθεση ασφαλών και μεγαλύτερης διάρκειας προϊόντων.

7.6 Συμπεράσματα

Η ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA αποδεικνύεται αποτελεσματικότερη για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, σε αντίθεση με τη χρήση των κλασσικών μεθόδων. Η διερεύνηση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών με μοριακές τεχνικές επιβεβαιώνει την ύπαρξη και άλλων κυρίαρχων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα όπως τα *Aeromonas salmonicida*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens*, *Vagococcus fluvialis*, *Psychrobacter immobilis*, *Psychrobacter cryohalolentis*, *Pseudomonas migulae*, *Pseudomonas vranovensis*. Οι μοριακές-μη καλλιεργητικές τεχνικές (απευθείας εκχύλιση DNA από τη σάρκα του ιχθύος) αναδεικνύουν μικροοργανισμούς οι οποίοι διαφεύγουν της ταυτοποίησης με τις μοριακές καλλιεργητικές τεχνικές όπως το *Aeromonas salmonicida*.

Διάφορες πτητικές ουσίες όπως Ethyl-2-methylbutyrate, Ethyl isovalerate, Ethyl tiglate, 3-hydroxy-1-butanone, 3-methyl-1-butanal, 2-methyl-1-butanal, Isoamyl alcohol και η 2-ethyl-1-hexanol που παράγονται από τη δράση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της συντήρησης αυξάνονται μεταξύ της πρώτης ημέρας και της ημέρας απόρριψης, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Οι ουσίες αυτές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως χημικοί δείκτες αλλοίωσης μικροβιακής προέλευσης των ιχθύων της Μεσογείου. Η ανάπτυξη βιοαισθητήρων που θα ανιχνεύουν τις μεταβολές των πτητικών μεταβολιτών

κατά τη συντήρηση θα έχει σημαντική πρακτική εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων καθώς θα είναι δυνατή η άμεση εκτίμηση της ποιοτικής κατάστασης και του εναπομείναντα εμπορικού χρόνου ζωής

Η αποθήκευση σε MAP με το εμπορικό μίγμα αερίων επηρεάζει την αύξηση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε σχέση με την αποθήκευση σε αερόβιες συνθήκες, διότι προκαλεί i) μείωση του ρυθμού αύξησης των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, ii) αύξηση του ρυθμού αύξησης των θετικών κατά Gram βακτηρίων (*B. thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια) iii) αύξηση του τελικού πληθυσμού των θετικών κατά Gram βακτηρίων και iv) μείωση του τελικού πληθυσμού των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη, η εφαρμογή του MAP έχει ως αποτέλεσμα την επικράτηση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων με EAM τα *Pseudomonas* spp. στις χαμηλές θερμοκρασίες.

Οι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί των φιλέτων ιχθύος τσιπούρας επιδρούν στην τύχη του *L. monocytogenes* τόσο σε συσκευασία αέρα όσο και σε MAP. Η αύξηση του *L. monocytogenes* ευνοείται στα φιλέτα σε συνθήκες αέρα όπου τα *Pseudomonas* spp. αποτελούν τον κυρίαρχο μικροοργανισμό. Επίσης, και τα *Shewanella* spp. και οξυγαλακτικά βακτήρια, ευνοούν την αύξηση του παθογόνου στις συνθήκες αυτές. Η πτώση των πληθυσμών των *Pseudomonas* spp. και των *Shewanella* spp. εξαιτίας της επίδρασης του MAP στην ανάπτυξή τους επιτρέπει την αύξηση του *L. monocytogenes* σε επίπεδα μεγαλύτερα από αυτά που παρατηρούνται σε αερόβιες συνθήκες. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρεμποδίζουν την αύξηση του παθογόνου στις συνθήκες MAP.

Η προσθήκη κιτρικού αποτελεί έναν επιπλέον τρόπο παρεμπόδισης της αύξησης των αλλοιωγόνων και των παθογόνων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την επέκταση

του εμπορικού χρόνου ζωής και τη βελτίωση της ποιότητας, ιδιαίτερα στη συσκευασία MAP. Τα άλατα του κιτρικού οξέος φάνηκε να δρουν έναντι της αύξησης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την επέκταση του εμπορικού χρόνου ζωής των ιχθύων κατά 1 ημέρα. Επιπλέον, τα άλατα του κιτρικού οξέος φάνηκε να δρουν έναντι της αύξησης του *L. monocytogenes* κυρίως στη συσκευασία MAP με αποτέλεσμα ο τελικός πληθυσμός του παθογόνου να είναι 1 log χαμηλότερος σε σχέση με τα φιλέτα χωρίς το αντιμικροβιακό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ackman R.G., Gunnlaugsdottir H. (1992) Seafood and Fishery by-products: Natural and unnatural environments for longer-chain omega-3 fatty acids. In: Angelo A. J. St. (ed.) *Lipid Oxidation in Food*. Vol. 500, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC p. 208-230.

Acosta-Gonzalez A., Rossello-Mora R., Marques S. (2013) Characterization of the anaerobic microbial community in oil-polluted subtidal sediments: aromatic biodegradation potential after the Prestige oil spill. *Environmental Microbiology*, 15 (1): 77-92.

Adams, M.R., Nicolaides, L. (1997) Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, 8: 227– 239.

Al-Dagal, M.M., Bazaraa, W.A. (1999) Extension of shelf life of whole and peeled shrimp with organic acid salts and bifidobacteria. *Journal of Food Protection*, 62: 51-56.

An C., Takahashi H., Kimura B., Kuda T. (2010) Comparison of PCR-DGGE and PCR-SSCP analysis for bacterial flora of Japanese traditional fermented fish products, *ajinarezushi* and *iwashi-nukazuke*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 1796–1801.

Anders R.J., Cervený J.G., Milkowski A.L. (1989) Method for delaying *Clostridium botulinum* growth in fish and poultry. United States Patent: 4,888,191. Appl. No. 287252 (19881220). Oscar Mayer Foods Corporation, Madison, WI, USA.

Andersen L. (1995) New meat culture applications. In: *The World of Ingredients*, p. 52.

Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H., Oyaizu H. (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (PT 4): 1563-1589.

Ariyapitipun T., Mustapha A., Clarke A.D. (2000) Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid, and nisin. *Journal of Food Protection*, 63: 131-136.

Ashie I. N. A., Smith J. P., Simpson B. K. (1996) Spoilage and self-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36 (1-2): 87-121.

Baumann P., L. Baumann M. Mandel, R. Allen (1972) Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 110:402-429.

Ben Embarek P.K. (1994) Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 23: 17-34.

Blickstad E., Molin G. (1984) Growth and end-product formation in fermenter cultures of *Brochothrix thermosphacta* ATCC 11509T and two psychrotrophic *Lactobacillus* spp. in different gaseous atmospheres. *Journal of Applied Bacteriology*, 57: 213-220.

Boddy L., Wimpenny J.W.T. (1992) Ecological concepts in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology - Symposium Supplement* 73: 23S-38S.

Borch, E., Molin, G. (1989) The aerobic growth and product formation of *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochothrix*, and *Carnobacterium* in batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30: 81-88.

Boskou G., Debevere J. (1997) Reduction of trimethylamine oxide by *Shewanella* spp under modified atmospheres in vitro. *Food Microbiology*, 14:543-53.

Boskou G., Debevere J. (2000) Shelf life extension of cod fillets with an acetate buffer spray prior to packaging under modified atmosphere. *Food Additives and Contaminants*, 17: 17-25.

Boziaris I.S., Adams M.R. (2000) Transient sensitivity to nisin in cold-shocked Gram negatives Letters in Applied Microbiology, 31: 233-237.

Boziaris I.S., Adams M.R. (2001) Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. Journal of Applied Microbiology, 91: 715-724.

Boziaris I. S., Kordila A., Neofitou C. (2011) Microbial spoilage analysis and its effect on chemical changes and shelf-life of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored in air at various temperatures. International Journal of Food Science and Technology, 46: 887-895.

Boziaris I.S., Humpheson L., Adams M.R. (1998) Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. International Journal of Food Microbiology, 43: 7-13.

Brillet A., Pilet M. F., Prevost H., Bouttefroy A., Leroi F. (2004) Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. Journal of Applied Microbiology, 97: 1029-1037.

Brocklehurst T.F., Mitchell G.A., Smith A.C. (1997) A model experimental gel surface for the growth of bacteria on foods. Food Microbiology, 14: 303 – 311.

Broekaert K., Heyndrickx M., Herman L., Devlieghere F., Vlaemynck G. (2011) Seafood quality analysis: molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media. Food Microbiology, 28: 1162-1169.

Broekaert K., Nosedá B., Heyndrickx M., Vlaemynck G., Devlieghere F. (2012) The spoilage microbiota of ray (*Raja* sp.) during ice storage under different conditions: Molecular identification and characterisation of the spoilage potential. In: Broekaert K. (2012) Molecular identification of the dominant microbiota and their spoilage potential of *Crangon crangon* and *Raja* sp. pp. 93-118.

Brownsell V.L., Griffith C.J., Jones E. (1989) Applied Science for Food Studies. Longman Scientific & Technical, Longman Group, Harlow, UK, p. 192.

Buchanan R.L., Bagi L.K. (1997) Microbial competition: effect of culture conditions on the suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A by *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Food Protection*, 60: 254–261.

Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. (2005) Quantitative real-time RT PCR a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34: 597-601.

Caglak E., Cakli S., Kilinc B. (2008) Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. *European Food Research and Technology*, 226: 1293–1299.

Cakli S., Kilinc B., Cadun A., Dincer T., Tolasa S. (2007) Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*, 18: 391–397.

Chouliara I., Savvaidis I.N., Panagiotakis N., M.G. Kontominas (2004) Preservation of salted, vacuum-packaged, refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) fillets by irradiation: microbiological, chemical and sensory attributes. *Food Microbiology*, 21: 351–359.

Christensen, H., Boye M., Poulsen L. K., Rasmussen O. F. (1994) Analysis of fluorescent pseudomonads based on 23S ribosomal DNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2196–2199.

Chung H. Y., Yung I. K. S., Ma W. C. J., Kim J.-S. (2002) Analysis of volatile components in frozen and dried scallops (*Patinopecten yessoensis*) by gas chromatography/mass spectrometry. *Food Research International*, 35: 43–53.

Colburn K.G., Kaysner C.A., Abeyta C., Wekell M.M. (1990) *Listeria* species in a California coast estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2007–2011.

Colinon C., Deredjian A., Hien E., Brothier E., Bouziri L., Cournoyer B., Hartman A., Henry S., Jolivet C., Ranjard L., Nazaret S. (2013) Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in soil and manure assessed by an ecfX qPCR assay. *Journal of Applied Microbiology*, 114 (6): 1734-1749.

Colwell R. R., Liston J. (1962) Bacterial flora on seven species of fish collected at Rongelap and Eninetok Atols. *Pacific Science*, 16: 264-270.

Connell J. J. (1995) Method of assessing and selecting for quality. In: Conell J. J. (ed.) *Control of Fish Quality*. Fishing News Books, Ltd. 4th edition, pp. 133-164.

Connell J.J. (1990) Methods of assessing and selecting for quality. In: Connell, J.J. (ed.), *Control of Fish Quality*. Fishing News Books, Oxford, pp. 122–150.

Corbo M. R., Altieri C., Bevilacqua A., Campaniello D., D'Amato D., Sinigaglia M. (2005) Estimating packaging atmosphere–temperature effects on the shelf life of cod fillets. *European Food Research and Technology*, 220:509–513.

Dainty R.H. (1971) The control and evaluation of spoilage. *Journal of Food Technology*, 6: 209.

Dainty R.H. (1996) Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 19-33.

Dainty, R.H., Edwards, R.A., Hibbard C.M. (1989) Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 49: 473-486.

Dalgaard P. (1995a) Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26: 319-333.

Dalgaard P. (1995b) Modelling of microbial activity and prediction of shelf life of packed fresh fish. *International Journal of Food Microbiology*, 19: 305-318.

Dalgaard P., Gram L., Huss H.H. (1993) Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 19: 283–294.

Dalgaard P., Mejlholm O., Christiansen T.J., Huss H.H. (1997) Importance of *Photobacterium Phosphoreum* in relation to spoilage of modified atmosphere packed fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 24: 373-378.

Dalgaard, P., Jørgensen L.V. (1998) Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 40: 105-115.

Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L. (2005) *Antimicrobials in Food*. 3rd Edition, CRC Press.

Davies A.R. (1995) Fate of food-borne pathogens on MAP meat and fish. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 36: 407-410.

Davies A.R. (1997) Modified-atmosphere packaging of fish and fish products. In: Hall, G.M. (ed.) *Fish processing technology*. 2nd edition, Blackie Academic & Professional, London, pp 200-223.

De Gelder L., Vandecasteele F.P., Brown C.J., Forney L.J., Top E.M. (2005) Plasmid donor affects host range of promiscuous IncP-1beta plasmid pB10 in an activated-sludge microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9): 5309-5317.

DE Koning A.J., Mol T.H. (1990) Rates of free fatty acid formation from phospholipids and neutral lipids in frozen cape hake (*Merluccius* spp.) mince at various temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50(3): 391–398.

Debevere J., Boskou G. (1996) Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA producing microflora of cod fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 31: 221-229.

Deschaght P., Janssens M., Vanechoutte M., Wauters G. (2012) Psychrobacter isolates of human origin, other than *Psychrobacter phenylpyruvicus*, are predominantly *Psychrobacter faecalis* and *Psychrobacter pulmonis*, with emended description of *P. faecalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62 (PT 3): 671-674.

Devlieghere F., Geeraerd A.H., Versyck K.J., Vandewaetere B., Van Impe J., Debevere J. (2001) Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiology*, 18: 53-66.

Dickinson J. R., Lanterman M. M., Danner D. J., Pearsoni B. M., Sanz P., Harrison S. J., Hewlins M. J. E. (1997) A ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Investigation of the Metabolism of Leucine to Isoamyl Alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (43): 26871–26878.

Disney J.G. (1976) The spoilage of fish in the tropics. Paper presented at *The First Annual Tropical Fisheries Technological Conference*, Corpus Christi, Texas, USA.

Disney J.G., Cameron J.D., Hoffmann A., Jones N.R.(1969) Quality assessment in *Tilapia* species. In: *Fish Inspection and Quality Control*, 71-72. Fishing News (ed.) Kreuzer, RBooks, Ltd. London, England.

Drider D., Fimland G., Hechard Y., McMullen L.M., Prevost H. (2006) The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70:564–582.

Drosinos E. H., Nychas G.-J. E. (1996) *Brochothrix thermosphacta*, the climax micro-organism on Greek fish tsipoura (*Sparus aurata*) and gopa (*Boops boops*) stored under a modified atmosphere at 0-4°C. *Italian Journal of Food Science and Technology*, 4: 323-330.

Drosinos E.H., Board R.G. (1994). Metabolic activities of pseudomonads in batch cultures in extract of minced lamb. *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 613-620.

Drosinos E.H., Lambropoulou K., Mitre E., Nychas G-J.E. (1997) Attributes of fresh gilt Seabream (*Sparus aurata*) fillets treated with potassium sorbate, sodium gluconate and stored under a modified atmosphere at 0±1°C. *Journal of Applied Microbiology*, 83: 569-575.

Duflos G., Coin V.M., Cornu M., Antinelli J.F., Malle P. (2006) Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/ gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 600–611.

Eberl L., Molin S., Givskov M. (1999) Surface motility in *Serratia liquefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 181: 1703–1712.

Economou T., Pournis N., Ntzimani A., Savvaidis I.N. (2009) Nisin-EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf life. *Food Chemistry*, 114: 1470-1476.

Edirisinghe R. K.B., Graham A. J., Taylor S.J. (2007) Characterisation of the volatiles of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) during storage by solid phase microextraction

and GC–MS and their relationship to fish quality parameters. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 1139–1147.

Edwards R.A., Dainty R.H., Hibbard C.M. (1987) Volatile compounds produced by meat pseudomonads and related reference strains during growth on beef stored in air at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 62: 403–412.

EEC (1995) Total volatile basic nitrogen (TVB-N) limit values for certain categories of fishery products and specifying the analysis methods to be used. Commission Decision 95/149/EEC of 8 March 1995. *Official Journal of European Communities*, L97, 84–87.

Ellis D.I., Goodacre R. (2001) Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: current status and future trends. *Trends in Food Science and Technology*, 12: 414–424.

Ellis R.J., Timms-Wilson T.M., Bailey M.J. (2000) Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. *Environmental Microbiology*, 2: 274–284.

El-Marrakchi A., Bennour M., Bouchriti N., Hamama A., Tagafait H. (1990) Sensory, chemical, and microbiological assessments of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *Journal of Food Protection*, 53 (7): 600–605.

Emborg J., B.G. Laursen, T. Rathjen, P. Dalgaard (2002) Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2°C. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 790–799.

Ercolini D. (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. Review article. *Journal of Microbiological Methods*, 56: 297–314.

Ercolini D., Ferrocino I., Nasi A., Ndagijimana M., Vernocchi P., La Storia A., Laghi L., Mauriello G., Guerzoni M.E., Villani F. (2011) Monitoring of Microbial Metabolites

and Bacterial Diversity in Beef Stored under Different Packaging Conditions. *Applied of Environmental Microbiology*, 77 (20): 7372–7381.

Ercolini D. (2013) High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Applied of Environmental Microbiology*, 79: 3148-3155.

Ericsson I.L., Eklow 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2904-2907.

Erkan N., Ö. Özden (2006) Gutted and Un-Gutted Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*) Stored in Ice: Influence on Fish Quality and Shelf-Life. *International Journal of Food Properties* 9: 331–345.

Erkan N., O. Ozden, M. Inugur (2007). The effects of modified atmosphere and vacuum packaging on quality of chub mackerel. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 1297–1304.

Erkan N., Ozden O., Ucok D., Alakavuk S., Yildirim Y., Inugur M. (2006) Spoilage and shelf life of sardines (*Sardina pilchardus*) packed in modified atmosphere. *European Food Research and Technology*, 222: 667–673.

Etienne M. (2005) SEAFOODplus – Traceability – Valid – Methods for chemical quality assessment Volatile amines as criteria for chemical quality assessment. Ifremer, Nantes, France. <http://archimer.ifremer.fr/doc/2005/rapport-6486.pdf>

Facinelli B., Varaldo P.E., Toni M., Casorali C., Fabio U. (1989) Ignorance about *Listeria*. *British Medical Journal*, 299: 38.

Fall P. A., Pilet M.F., Leduc F., Cardinal M., Duflos G., Guérin C., Joffraud J-J., Leroi F. (2012) Sensory and physicochemical evolution of tropical cooked peeled shrimp

inoculated by *Brochothrix thermosphacta* and *Lactococcus piscium* CNCM I 4031 during storage at 8 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 152: 82–90.

Farber J.M. (1991) Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology-a review. *Journal of Food Protection*, 54: 58-70.

Fernandez J., Perez-Alvarez J.A., Fernandez-Lopez J.A. (1997). Thiobarbituric acid test monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 99: 345-353.

Fernandez-Salguero J., I. M. Mackie (1987) Technical note: Preliminary survey of the content of histamine and other higher amines in some samples of Spanish canned fish. *International Journal of Food Science and Technology*, 22 (4): 409–412.

Field C.E., Pivarnic L.F., Barnett S.M., Rand A.G. (1986) Utilization of glucose oxidase for extending the shelf life of fish. *Journal of Food Science*, 51: 66-70.

Fonnesbech Vogel B., Venkateswaran K., Satomi M., Gram L. (2005) Identification of *Shewanella baltica* as the most important H₂S-producing species during iced storage of Danish marine fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (11): 6689-6697.

Food and Drug Administration-FDA (2009) Listing of food additives status. Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodAdditives/FoodAdditiveListings/ucm091048.htm>.

Fuqua C., Winans S.C., Greenberg E.P. (1996) Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR–LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology*, 50: 727– 751.

Ghalfi H., Allaoui A., Destain J., Benerroum N., Thonart P. (2006) Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4°C storage. *Journal of Food Protection*, 69: 1066-1071.

Gennari, M., and F. Dragotto (1992) A study of the incidence of different fluorescent *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. *J. Appl. Bacteriol.* **72**:281–288.

Giacomazzi S., Leroi F., L'Henaff C., Joffraud J.J. (2004) *rpoB*-PCR amplified gene and temporal temperature gradient gel electrophoresis: a rapid tool to analyse bacterial strains representative of cold-smoked salmon microflora. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 130–134.

Gibson D.M., Davis H.K. (1995) Fish and shellfish products in sous vide and modified atmosphere packs. In: *Principles of Modified-Atmosphere and Sous-Vide Product Packaging* (edited by J.M. Farber & K.L. Dodds). Pp. 153–174. Lancaster, Penn: Technomic Publishing Co.

Gill C. D., Molin G. (1991). Modified atmospheres and vacuum packaging. In: Russell N.S., Gould G.W. (eds.) *Food preservatives*. Blackie and Son Limited, Glasgow, London, pp. 172-199.

Gillespie N.C., Macrae C. (1975) The bacterial flora of some Queensland fish and its ability to cause spoilage. *Journal of Applied Bacteriology*, 39: 91-100.

Gimenez B., Roncales P., Beltran J.A. (2002) Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 1154-1159.

Gimenez B., Dalgaard P. (2004) Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 96-109.

Gomes H.A., Silva E.N., Nascimento M.R.L., Fukuma H.T. (2003) Evaluation of the 2-thiobarbituric acid method for the measurement of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chicken meat. *Food Chemistry*, 80: 433–437.

Gonzalez C.J., Santos J.S.A., Garcia-Lopez M.-L., Gonzalez N., Otero A. (2001) Mesophilic aeromonads in wild and aquacultured freshwater fish. *Journal of Food Protection*, 64: 687-691.

Gonzalez-Fandos E., Dominguez J.L. (2007) Effect of potassium sorbate washing on the growth of *Listeria monocytogenes* on fresh poultry. *Food Control*, 18: 842-846.

Goulas A.E., Kontominas M.G. (2007) Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 100: 287-296.

Goulas A.E., Chouliara I., Nessi E., Kontominas M.G., Savva I.N. (2005) Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 752–760.

Howgate P., Johnston A., Whittle K.J. (1992) *Multilingual Guide to EC Freshness Grades for Fishery Products*. Torry Research Station, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, UK, Aberdeen, Scotland.

Gram L. (1989) *Identification, Characterization and Inhibition of Bacteria Isolated from Tropical Fish*. Ph.D. Thesis. Technological Laboratory. Lyngby, and The Royal Veterinary and Agricultural University of Copenhagen, Denmark.

Gram L., Dalgaard P. (2002) Fish spoilage bacteria: Problems and solutions. *Current Opinion in Microbiology*, 13: 262-266.

Gram L., Huss H.H. (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 121-137.

Gram L., Melchiorson J. (1996) Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 589-595.

Gram L., Ravn L., Rasch M., Bartholin Bruhn J., Christensen A.B., Givskov M. (2002) Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 79– 97.

Gram L., Oundo J.O., Bon J. (1989) Storage life of Nile perch (*Lates niloticus*) in relation to temperature and initial bacterial load. *Tropical Science*, 29: 221-236.

Gram L., Trolle G., Huss H. H. (1987) Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 4: 65-72.

Gram L., Wedell-Neergaard C., Huss H.H. (1990) The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *International Journal of Food Microbiology*, 10: 303-316.

Gram L. (1993) Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2197– 2203.

Gram L. (1994) Siderophore-mediated iron sequestering by *Shewanella putrefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2132– 2136.

Guizani N., Al-Busaidy M. A., Al-Belushi I. M., Mothershaw A., Shafiur Rahman M. (2005) The effect of storage temperature on histamine production and the freshness of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Research International*, 38: 215–222.

Gutierrez J., Rodriguez G., Barry-Ryan C., Bourke P. (2008) Efficacy of plant essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat

vegetables: Antimicrobial and sensory screening. *Journal of Food Protection*, 71 (9): 1846–1854.

Guymon J.F., Ingraham J.L., Crowell E.A. (1961) Influence of aeration upon the formation of higher alcohols by yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 12: 60-66.

Herbert R.A., Hendrie M.D., Gibson D.M., Shewan J.M. (1971) Bacteria active in the spoilage of certain seafoods. *Journal of Applied Bacteriology*, 34: 41-50.

Hovda M.B., Sivertsvik M., Lunestad B.T., Lorentzen G., Rosnes J.T. (2007a) Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE. *Food Microbiology*, 24: 362–37.

Hovda M.B., Lunestad B.T., Sivertsvik M., Rosnes J.T. (2007b). Characterisation of the bacterial flora of modified atmosphere packaged farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) by PCR-DGGE of conserved 16S rRNA gene regions. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 68-75.

Hozbor M.C., Saiz A.I., Yeannes M.I., Fritz R. (2006) Microbiological changes and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). *LWT-Food Science and Technology*, 39: 99-104.

Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R. (1998) Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180: 4765-4774.

Huidobro A., Pastor A., Tejada M. (2000) Quality index method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Food Science*, 65: 1202-1205.

Huis in't Veld J. H. J. (1996) Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 1-18.

Huss H.H. (1995) *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO, Rome, 195.

Hwang. K.T., Regenstein J.M. (1988). Protection of menhaden mince lipids from rancidity during frozen storage. *Journal of Food Science*, 54: 1120-1124.

Iglesias J., Gallardo M.J., Medina I. (2010) Determination of carbonyl compounds in fish species samples with solid phase microextraction with on-fibre derivatization. *Food Chemistry*, 123: 771–778.

Jaffrès E., Sohier D., Leroi F., Pilet M. F., Prévost H., Joffraud J.- J., Dousset X. (2009) Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 131: 20–29.

Jung J.Y., Lee S.H., Lee H.J., Jeon C.O. (2013) Microbial succession and metabolite changes during fermentation of saeu-jeot: Traditional Korean salted seafood. *Food Microbiology*, 34: 360-368.

Jay J.M. (1996) Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers. *Meat Science*, 43: S59-S66.

Jemmi T. (1993) *Listeria monocytogenes* in smoked fish: an overview. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 44: 10–13.

Joffraud J.J., Leroi F., Roy C., Berdague J.L. (2001) Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 66: 175-181.

Jonsdottir R., Olafsdottir G., Chanie E., Haugen J.E. (2008) Volatile compounds suitable for rapid detection as quality indicators of cold smoked salmon (*Salmo salar*). *Food Chemistry*, 109:184–195.

Jorgensen L.V., Huss H.H., Dalgaard P. (2001) Significance of volatile compounds produced by spoilage bacteria in vacuum-packed cold-smoked salmon (*Salmo salar*) analysed by GC-MS and Multivariate Regression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2376-2381.

Jorgensen LV, Huss HH. (1998) Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 42:127-31.

Jorgensen B.R., Huss H.H. (1989) Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. *International Journal of Food Microbiology*, 9: 51–62.

Josephson D.B., Lindsay R.C., Stuibler D.A. (1984) Biogenesis of lipid-derived volatile aroma compounds in the emerald shiner (*Notropis atherinoides*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 1352–1354.

Josephson D.B., Lindsay R.C., Stuibler D.A. (1983) Identification of compounds characterizing the aroma of fresh whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31: 326–330.

Juste A., Thomma B.P., Lievens B. (2008) Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*, 25: 745-761.

Kakasis S., Parlapani F., Boziaris I.S. (2011) Performance and selectivity of media used for the enumeration of bacterial populations on seafood. In: Proceedings of the 33rd Scientific Conference of Hellenic Society for Biological Sciences, Edessa, Greece, May 19-21, 2011, pp.100-101.

Karabagias I., Badeka A., Kontominas M.G. (2011) Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. *Meat Science*, 88: 109–116.

Karmas E., Mietz J.L. (1978) Polyamine and histamine content of tuna fish and the relationship to decomposition. *Lebensmittel - Wissenschaft and Technologie*, 11: 333-337.

Khanjari A., Karabagias I.K., Kontominas M.G. (2013) Combined effect of N,O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 53: 94-99.

Kirchman D., Knees E., Hodson R. (1985) Leucine Incorporation and Its Potential as a Measure of Protein Synthesis by Bacteria in Natural Aquatic Systemst Applied and Environmental Microbiology, 49 (3): 599-607.

Klingshirn L. M., Liu J. R., Gallander J. F. (1987) Higher alcohol formation in wines as related to the particle size profiles of juice insoluble solids. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38: 207-210.

Kostaki M., Giatrakou V., Savvaidis I. N., Kontominas M.G. (2009) Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology*, 26: 475–482.

Kotakowska A., Domiszewski Z., Kozlowski D., Gajowniczek M. (2006) Effects of rainbow trout freshness on n-3 polyunsaturated fatty acids in fish offal. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108: 723–729.

Koutsoumanis K. (2001). Predictive Modeling of the Shelf Life of Fish under Nonisothermal Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1821–1829.

Koutsoumanis K., Giannakourou M.C., Taoukis P.S., Nychas G.J.E. (2002) Application of shelf life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality *International Journal of Food Microbiology*, 73: 375– 382.

Koutsoumanis K., Lampropoulou K., Nychas G.-J.E. (1999). Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream stored aerobically at 0, 8 and 15 °C. *Journal of Food Protection*, 62: 398-402.

Koutsoumanis, K., Nychas, G.-J.E. (2000). Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf-life predictions. *International Journal of Food Microbiology*, 60: 171-184.

Koutsoumanis K., Nychas G.-J. E. (1999) Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean boque (*Boops boops*) stored aerobically at 0, 3, 7, and 10°C. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 698–706.

Koutsoumanis K., Lampropoulou K., Nychas G.-J.E. (1999) Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream stored aerobically at 0, 8 and 15°C. *Journal of Food Protection*, 62: 398-402.

Koyanagi T., Kiyohara M., Matsui H., Yamamoto K., Kondo T., Katayama T., Kumagai H. (2011) Pyrosequencing survey of the microbial diversity of ‘narezushi’, an archetype of modern Japanese sushi. *Letters in Applied Microbiology*, 53: 635–640.

Kucukgulmez A., Kadak A.E., Gokcin M. (2013) Antioxidative and antimicrobial activities of shrimp chitosan on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during refrigerated storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 48: 51–57.

Kyranas V.R., Lougovois V.P. (2002) Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(3): 319–328.

Kyranas V. R., Lougovois V. P., Valsamis D. S. (1997) Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 32: 339-347.

Lafarge V., Ogier J.C., Girard V., Maladen V., Leveau J., Delacroix-Buchet A. (2004) Le potentiel de la TTGE pour l'étude bactérienne de quelques laits crus. *Le Lait* 84: 169–178.

Lalitha K.V., Sonaji E.R., Manju S., Jose L., Gopal T.K.S., Ravisankar C.N. (2005) Microbiological and biochemical changes in pearl spot (*Etroplus suratensis* Bloch) stored under modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 1222–1228.

Lambropoulou K. A., Drosinos E. H., Nychas G.-J. E. (1996) The effect of glucose supplementation on the spoilage microflora and chemical composition of minced beef stored aerobically or under a modified atmosphere at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*, 30:281–291.

Lampitt, L. H. 1919. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 13:459–486.

Lane D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In Stackenbrandt E., Goodfellow M. (Eds) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester: John Wiley & Sons, pp. 115-175.

Lannelongue M., Finne G., Hanna M.O., Nickelson R., Vanderzani C. (1982) Microbiological and Chemical changes during storage of Swordfish (*Xiphias gladius*) steaks in retail packages containing CO₂ –Enriched atmospheres. *Journal of Food Protection*, 45: 1197-1203.

Lebert, I., C. Begot, and A. Lebert. 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8–7.0), water activity (0.97–1.00) and temperature (7–25). *Int. J. Food Microbiol.* 39:53–60.

Lee Y.-L., Cesario T., Owens J., Shanbrom E., Thrupp L. D. (2002) Antibacterial activity of citrate and acetate. *Nutrition*, 18: 665–666.

Lee J.-E., Hong Y.-S., Lee C.-H. (2009) Characterization of Fermentative Behaviors of Lactic Acid Bacteria in Grape Wines through ¹H NMR- and GC-Based Metabolic Profiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 4810–4817.

Leisner J.J., Gram L. (2000) Spoilage of fish. In: Robinson R.K., Batt C.A., Patel P.D. (eds) *Encyclopedia of Food Microbiology*. San Diego: Academic Press, pp. 813–820.

Leistner L. (1992) Food preservation by combined methods. *Food Research International*, 25: 151-158.

Lewis C.B., Kaiser A., Montville T.J. (1991) Inhibition of food-limits bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1683-1688.

Lievens B., Brouwer M., Vanachter A.C.R.C., Levesque C.A., Cammue B.P.A., Thomma B.P.H.J. (2005) Quantitative assessment of phytopathogenic fungi in various substrates using a DNA macroarray. *Environmental Microbiology*, 7: 1698–1710.

Lima dos Santos C.A.M. (1981) The storage of tropical fish in ice - A review. *Tropical Science*, 23 (2) : 97-127.

Liston J. (1980) Microbiology in fishery science. In Connell J.J. (ed) *Advances in Fish Science and Technology*. Fishing News Books, Ltd, Farnham, Surrey, UK 138-157.

Lo Giudic A., Brilli M., Bruni V., De Domenico M., Fani R., Michaud L. (2007) Bacterium-bacterium inhibitory interactions among psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawater (Terra Nova Bay, Ross Sea). *FEMS Microbiology Ecology*, 60 (3): 383-396.

Loch T.P., Kumar R., Xu W., Faisal M. (2011) *Carnobacterium maltaromaticum* infections in feral *Oncorhynchus* spp. (Family Salmonidae) in Michigan. *Journal of Microbiology*, 49 (5): 703-713.

Lopez-Velasco G., Welbaum G.E., Boyer R.R., Mane S.P., Ponder M.A. (2011) Changes in spinach phylloepiphytic bacteria communities following minimal processing and refrigerated storage described using pyrosequencing of 16S rRNA amplicons. *Journal of Applied Microbiology*, 110: 1203–1214.

Lougovois V. P., Kyranas E. R., Kyrana V.R. (2003) Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Research International*, 36: 551–560.

Lucquin I., Zagorec M., Champomier-Verges M., Chaillou S. (2012) Fingerprint of lactic acid bacteria population in beef carpaccio is influenced by storage process and seasonal changes. *Food Microbiology*, 29 (2): 187-196.

Maca J. V., Miller R. K., Acuff G. R. (1997) Microbiological, sensory and chemical characteristics of vacuum-packaged ground beef patties treated with salts of organic acids. *Journal of Food Science*, 62: 591–596.

Macé S., Cornet J., Chevalier F., Cardinal M., Pilet M.- F., Dousset X., Joffraud J.-J. (2012) Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR-TTGE. *Food Microbiology*, 30: 164-172.

Malle P., Nowogrocki G., Tailliez R. (1983) Corrélation entre l'indice d'altération et l'azote basique volatil total pour divers poissons marins. *Sciences des Aliments*, 3: 311-322.

Malle P., Poumeyrol M. (1989) A new chemical criterion for the quality control of fish: trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%). *Journal of Food Protection*, 52: 419-423.

Manju S., Jose L., Sriivasa Gopal T.K., Ravishankar C.N., Lalitha K.V. (2006) Effects of sodium acetate dip treatment and vacuum-packaging on chemical, microbiological,

textural and sensory changes of pearlspot (*Etroplus suratensis*) during chill storage. *Food Chemistry*, 102:27–35.

Martin-Creuzburg D., Beck B., Freese H.M. (2011) Food quality of heterotrophic bacteria for *Daphnia magna*: evidence for a limitation by sterols. *FEMS Microbiology Ecology*, 76 (3): 592-601.

Martinez N., Martin M.C., Herrero A., Fernandez M., Alvarez M.A., Ladero V. (2011) qPCR as a powerful tool for microbial food spoilage quantification: Significance for food quality. Review. *Food Science and Technology*, 22: 367-376.

Masniyom P., Benjakul S., Visessanguan W. (2002) Shelf-life extension of refrigerated sea bass slices under modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 873-880.

Mexis S.F., Chouliara E., Kontominas M.G. (2009) Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4°C. *Food Microbiology*, 26: 598–605.

Mietz J.L., Karmas E. (1977) Chemical quality index of canned tuna as determined by HighPressure Liquid Chromatography. *Journal of Food Science*, 42:155-158.

Mietz J.L., Karmas E. (1978) Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster, and shrimp as an indicator of decomposition. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 61: 139-145.

Miller A., Scanlan R.A., Lee J.S., Libbey L.M. (1973a) Volatile compounds produced in ground muscle tissue of canary rockfish (*Sebastes pinniger*) stored on ice. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 29: 1125–1129.

Miller A., Scanlan R.A., Lee J.S., Libbey L.M. (1973b) Identification of the volatile compounds produced in sterile muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas*

putrefaciens *Pseudomonas fluorescens* and an *Achromobacter* species. *Applied Microbiology*, 26(1): 18-21.

Miller A., Scanlan R.A., Lee J.S., Libbey L.M., Morgan M.E. (1973c) Volatile compounds produced in sterile muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas perolens*. *Applied Microbiology*, 25(2): 257-261.

Min S., Harris L.J., Krochta J.M. (2005b) *Listeria monocytogenes* inhibition by whey protein films and coatings incorporating the lactoperoxidase system. *Journal of Food Science*, 70: M317-M324.

Mohan C.O., Ravishankar C.N., Srinivasagopal K. (2008) Effect of O₂ scavenger on the shelf-life of catfish (*Pangasius sutchi*) steaks during chilled storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 442–448.

Mol S., Erkan N., Ücok D., Tosun S. Y. (2007) Effect of psychrophilic bacteria to estimate fish quality. *Journal of Muscle Foods*, 18: 120–128.

Molin G. (1985) Mixed carbon source utilization of meat-spoiling *Pseudomonas fragi* 72 in relation to oxygen limitation and carbon dioxide inhibition. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 1442-1447.

Molin G., Ternstrom A. (1986) Phenotypically based taxonomy of psychrotrophic *Pseudomonas* isolated from spoiled meat, water and soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36: 257–274.

Monfort P., Minet J., Rocourt J., Piclet G., Cormier M. (1998) Incidence of *Listeria* spp. in Breton live shellfish. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 205–208.

Morishita T., Uno K., Araki T., Takahashi T. (1989) Comparison of the fatty acid composition in cultured red sea bream differing in the localities and culture methods and those in the wild fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 847–852.

- Morita R.Y. (1975) Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 39: 144-167.
- Mossel D. A.A., Corry J. E.L., Struijk Corry B. and Baird R. M. (1995) *Essentials of the Microbiology of Foods: A Textbook of Advanced Studies*. John Wiley & Sons, London.
- Muratore G., Licciardello F. (2005) Effect of Vacuum and Modified Atmosphere Packaging on the Shelf-life of Liquid-smoked Swordfish (*Xiphias gladius*) Slices. *Journal of Food Science*, 70 (5): 359-363.
- Nakae, T., Elliott J.A. (1965) Production of volatile fatty acids by some lactic acid bacteria. II. Selective formation of volatile fatty acids by degradation of amino acids. *Journal of Dairy Science*, 48:293–299.
- Nam Y.-D., Yi S.-H., Lim S.-I. (2012a) Bacterial diversity of cheonggukjang, a traditional Korean fermented food, analyzed by barcoded pyrosequencing. *Food Control* 28: 135-142.
- Nam Y.-D., Park S.-L., Lim S.-I. (2012b) Microbial Composition of the Korean Traditional Food “*kochujang*” Analyzed by a Massive Sequencing Technique. *Journal of Food Science*, 77 (4): M250-M256.
- Nam Y.-D., Lee S.-Y., Lim S.-I. (2012c) Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing. *International Journal of Food Microbiology*, 155: 36–42.
- Neetoo H., Ye M., Chen H. (2008) Potential antimicrobials to control *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged cold-smoked salmon pâté and fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 220–227.
- Neubauer O., Fromherz K. (1911) Hoppe-Seyler’s *Z. Physiological Chemistry*, 70: 326–350.

Nilsson L., Gram L., Huss H.H. (1999) Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *Journal of Food Protection*, 62: 336-342.

Nilsson L., Ng Y.Y., Christiansen J.N., Jorgensen B.L., Grotnum D., Gram L. (2004) The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 133-143.

Nosedá B., Tariqul Islam Md., Eriksson M., Heyndrickx M., De Reu K., Van Langenhove H., Devlieghere F. (2012) Microbiological spoilage of vacuum and modified atmosphere packaged Vietnamese *Pangasius hypophthalmus* fillets. *Food Microbiology*, 30: 408-419.

Nychas G.J.E., Skandamis P., Tassou C.C. (2003) Antimicrobials from herbs and spices. In: Roller S. (ed) *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge UK, pp. 176-200.

Nychas, G.-J.E., Arkoudelos J.S. (1991) The influence of *Brochothrix thermosphacta* on the quality of minced meat. *Agricultural Research*, 15: 103-115.

Nychas G.-J. E., Drosinos E. H., Board R.G. (1998) Chemical changes in stored meat. In: Board R. G., Davies A. R. (ed.) *The Microbiology of Meat and Poultry*. Blackie Academic and Professional, London, UK, pp.288-326.

Oehlenschläger J. (1992) Evaluation of some well established and some underrated indices for the determination of freshness and / or spoilage of ice stored wet fish. *Proceedings of the International Conference "Quality assurance in the fish industry"*, pp. 339-345.

Oehlenschläger J. (1997) Suitability of ammonia-N, dimethylamine-N, trimethylamine-N, trimethylamine oxygen-N and total volatile basic nitrogen as freshness indicators in

seafood. In: Olafsdottir G. et al. (eds.) Methods to determine the freshness of fish in research and industry. International Institute of Refrigeration, Paris, pp. 92-99.

Oehlenschläger J. (1997a) Suitability of ammonia-N, dimethylamine-N, trimethylamine-N, trimethylamine oxygen-N and total volatile basic nitrogen as freshness indicators in seafood. In: Olafsdottir G. et al. (eds.) Methods to determine the freshness of fish in research and industry. International Institute of Refrigeration, Paris, pp. 92-99.

Oehlenschläger J. (1997b) Volatile amines as freshness/spoilage indicators. A literature review. In: Luten J.B. et al. (eds.) Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality. Elsevier, Amsterdam, pp. 571-588.

Olafsdottir G., Martinsdottir E., Jonsson E.H. (1997). Gas sensor and GC measurements of volatile compounds in capelin. In: Luten J.B., Borresen T., Oehlenschläger J. (ed.) Seafood From Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality, Development in Food Science. Elsevier, New York, NY., p. 507-520.

Olofsson T. C., Ahrne S., Molin G. (2007) The bacterial flora of vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 7°C, identified by direct 16S rRNA gene analysis and pure culture technique. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1364-5072.

Özogul F., Kuley E., Özogul Y. (2007) Sensory, chemical and microbiological quality parameters in sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice or wrapped in cling film or in aluminium foil at 2 ± 1 °C. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 903-909.

Ozogul F., Taylor K.D.A., Quantick P., Ozogul Y. (2000) Chemical, microbiological and sensory evaluation of Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored in ice, modified atmosphere and vacuum pack. *Food Chemistry*, 71: 267-273.

Ozogul F., Polat A., Ozogul Y. (2004) The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). Food Chemistry, 85: 49–57.

Ozogul Y., Ozogul F., Kuley E., Ozkutuk A.S., Gokbulut C., Kose S. (2006). Biochemical, sensory and microbiological attributes of wild turbot (*Scophthalmus maximus*), from the Black Sea, during chilled storage. Food Chemistry 99, 752–758.

Ozogul Y., Ozyurt G., Ozogul F., Kuley E., Polat A. (2005) Freshness assessment of European eel (*Anguilla anguilla*) by sensory, chemical and microbiological methods. Food Chemistry, 92: 745–751.

Papadopoulos V., Chouliara I., Badeka A., Savvaidis I.N., Kontominas M.G., (2003) Effect of gutting on microbiological, chemical and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. Food Microbiology, 20: 411–420.

Park E.-J., Chun J., Cha C.-J., Park W.-S, Jeon C. O., Bae J.-W. (2012) Bacterial community analysis during fermentation of ten representative kinds of kimchi with barcoded pyrosequencing. Food Microbiology, 30: 197-204.

Parlapani F. F., Meziti A., Kormas K. Ar., Boziaris I. S. (2013) Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. Food Microbiology, 33: 85-89.

Pastoriza L., Sampedro G., Herrera J.R., Cabo M.L. (1996a) Effect of modified atmosphere packaging on shelf- life of iced fresh hake slices. Journal of the Science of Food Agriculture, 71: 541-547.

Pastoriza, L., Sampedro, G., Herrera, J. R. and Cabo, M. L. (1996b) Effect of carbon dioxide atmosphere on microbial growth and quality of salmon slices. Journal of the Science of Food Agriculture 72, 348-352.

Pastoriza L., Sampedro G., Herrera J.J., Cabo M.L. (1998) Influence of sodium chloride and modified atmosphere packaging on microbiological, chemical and sensorial properties in ice storage of slices of hake (*Merluccius merluccius*). Food Chemistry, 61: 23-28.

Paulus K., Zacharias R., Robinson L., Geidel H. (1979) Kritische betrachtungen zur "Bewetenden prüfung mit skale" als Einem Wesentlichen Verfahren der Sensorischen Analyse. LWT, 12(1): 52-61.

Pérez-Villarreal B., Pozo R. (1990) Chemical composition and ice spoilage of albacore (*Thunnus alalunga*). Journal of Food Science, 55: 678-682.

Pezeshk S., Rezaei M., Hosseini H. (2011) effects of turmeric, shallot extracts, and their combination on quality characteristics of vacuum-packaged rainbow trout stored at 4± 1 °C. Journal of Food Science, 76: M387–M391.

Phetrong K., H-Kittikun A., Maneerat S. (2008) Production and characterization of bioemulsifier from a marine bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. anitratus SM7. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 30: 297-305.

Pin C., Garcia de Fernando G.D., Ordonez J.A. (2002) Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. Applied and Environmental Microbiology, 68: 4441–4447.

Pournis N., Papavergou A., Badeka A., Kontominas M.G., Savvaidis I.N. (2005) Shelf-Life Extension of Refrigerated Mediterranean Mullet (*Mullus surmuletus*) Using Modified Atmosphere Packaging. Journal of Food Protection, 68: 2201–2207.

Proctor M. R. M., Dorgan M., McLoughlin J. V. (1992) The concentrations of adenosine triphosphate, creatine phosphate, glucose-6-phosphate, lactate and glycogen in skeletal muscle of marine and freshwater fish species anaesthetised with MS-222. Proceedings of the Royal Irish Academy, 92b: 45-51.

Qvist S., Sehested K., Zeuthen P. (1994) Growth suppression of *Listeria monocytogenes* in a meat product. *International Journal of Food Microbiology*, 24: 283–293.

Raats D., Offek M., Minz D., Halpern M. (2011) Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiology*, 28 (3): 465-471.

Rasolofo E.A., St-Gelais D., LaPointe G., Roy D. (2010) Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International Journal of Food Microbiology*, 138: 108–118.

Reddy N. R., Paradis A., Roman M. G., Solomon H. M., Rhodehamel E. J. (1996) Toxin development by *Clostridium botulinum* in modified atmosphere-packaged fresh tilapia fillets during storage. *Journal of Food Science*, 61: 632-635.

Reddy N. R., Schreiber C. L., Buzard K. S., Skinner G. E., Armstrong D. J. (1994) Shelf life of fresh tilapia fillets packaged in high barrier film with modified atmospheres. *Journal of Food Science*, 59: 260-264.

Refsgaard J.C., Hansen, L.K., Vahman M. (2000) Groundwater zonation in Copenhagen County –Intercomparison of thematic results from different consultants. Seminar on groundwater zonation, November 7, 2000. County of Copenhagen. (In Danish).

Reynisson E., Lauzon H. L., Magnusson H., Hreggvidsson G. O., Marteinson V.T. (2008) Rapid quantitative monitoring method for the fish spoilage bacteria *Pseudomonas*. *Journal of Environmental Monitoring*, 10: 1357-1362.

Reynisson E., Lauzon H.L, Hannes M., Rósa J., Ólafsdóttir G., Marteinson V., Hreggviðsson G. Ó. (2009) Bacterial composition and succession during storage of North-Atlantic cod (*Gadus morhua*) at superchilled temperatures. *BMC Microbiology*, 9: 250.

Robins M.M., Brocklehurst T. F., Wilson P. (1994) Food structure and the growth of pathogenic bacteria. *Food Technology International Europe*, 31-36.

Rodriguez O., Barros-Velazquez J., Ojea A., Pineiro C., Aubourg S.P. (2003) Evaluation of Sensory and Microbiological Changes and Identification of Proteolytic Bacteria during the Iced Storage of Farmed Turbot (*Psetta maxima*). *Journal of Food Science* 68 (5), 2764-2771.

Roh S.W., Kim K.H., Nam Y.D, Chang H.W., Park E.J., Bae J.W. (2010) Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing. *The Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 4: 1–16.

Romano P., Suzzi G., Comi G., Zironi R. (1992) Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 73: 126-130.

Rossmann B., Møller H., Smalla K., Mpiira S., Baptist Tumuhairwe J., Staver C., Berga. G. (2012) Banana-Associated Microbial Communities in Uganda Are Highly Diverse but Dominated by *Enterobacteriaceae*. *Applied of Environmental Microbiology*, 78(14): 4933–4941.

Rosnes J.T., Kleiberg G. H., Sivertsvik M., Lunestad B.T., Lorentzen G. (2006) Effect of Modified Atmosphere Packaging and Superchilled Storage on the Shelf-life of Farmed Ready-to-cook Spotted Wolf-fish (*Anarhichas minor*). *Packaging Technology and Science*, 19: 325–333.

Rudi K., Maugesten T., Hannevik E.S., Nissen H. (2004) Explorative Multivariate Analyses of 16S rRNA Gene Data from Microbial Communities in Modified-Atmosphere-Packed Salmon and Coalfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (8): 5010–5018.

Ruiz-Capillas, C., Moral A. (2005) Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres. *Food Chemistry*, 89: 347–354.

Rustad T. (1992) Muscle chemistry and the quality of wild and farmed cod. In: Huss H.H., Jakobsen M., Liston J. (eds.) *Quality assurance in the fish industry*. Elsevier, London, pp. 19-27.

Sallam K. I. (2007) Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon *Food Control*, 18: 566–575.

Sallam Kh. I., Samejima K. (2004) Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/LWT-Food Science and Technology*, 37: 865–871.

Sanchez J.I., Rossetti L., Martinez B., Rodriguez A., Giraffa G. (2006) Application of reverse transcriptase PCR-based T-RFLP to perform semi-quantitative analysis of metabolically active bacteria in dairy fermentations. *Journal of Microbiological Methods*, 65: 268–277.

Sanchez L.M., Wong W.R., Riener R.M., Schulze C.J., Linington R.G. (2012) Examining the fish microbiome: vertebrate-derived bacteria as an environmental niche for the discovery of unique marine natural products. *PLoS ONE*, 7 (5): E35398.

Satomi M., Vogel B.F., Gram L., Venkateswaran K. (2006) *Shewanella hafniensis* sp. nov. and *Shewanella morhuae* sp. nov., isolated from marine fish of the Baltic Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56 (PT 1): 243-249.

Scherer R., Augusti P. R., Bochi V. C., Steffens C., Martins Fries L. L., Daniel A. P., Kubota E. H., Neto J. R., Emanuelli T. (2006) Chemical and microbiological quality of

grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) slaughtered by different methods. *Food Chemistry*, 99: 136–142.

Schirmer B.C., Heir E., Langsrud S. (2009) Characterization of the bacterial spoilage flora in marinated pork products. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 2106–2116.

Schreier P. (1979) Flavour composition of wines: a review. *CRC Critical Review in Food Science and Nutrition*, 12: 59 – 111.

Selli S., Rannou C., Prost C., Robin J., Serot T. (2006) Characterization of aroma active compounds in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eliciting an off-odor, *J. Agric. Food Chemistry*, 54: 9496–9502.

Shewan J.M. (1962) The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. *Recent Advances in Food Science*, 1: 167-193.

Shewan J.M. (1977) The bacteriology of fresh fish and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. *Proceedings of the Conference on “Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish”*. pp. 51-66.

Shewfelt R.L. (1981) Fish muscle lipolysis. A review. *Journal of Food Biochemistry*, 5: 79-100.

Sivertsvik M., Rosnes J.T., Kleiberg G.H. (2003) Effect of Modified Atmosphere Packaging and Superchilled Storage on the Microbial and Sensory Quality of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fillets. *Journal of Food Science*, 68 (4): 1467-1472.

Sivertsvik M., Jeksrud W.K., Rosnes J.T. (2002) Review. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 107-127.

Skandamis P. N., Nychas G.-J. E. (2002) Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 79: 35–45.

Skandamis P. N., Davies K.W., McClure P. J., Koutsoumanis K., Tassou C. (2002b) Avitalistic approach for non-thermal inactivation of pathogens in traditional Greek salads. *Food Microbiology*, 19: 405-421.

Skandamis P., Tsigarida E., Nychas G.-J. E. (2002a) The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology*, 19: 97-103.

Smid E.J., Gorris L.G.M. (1999) Natural antimicrobials for food preservation. In: Rahman M.S. (Ed.) *Handbook of Food Preservation*. Marcel Dekker, New York, pp. 285-308.

Soncin S., Chiesa M. L., Panseri S., Biondi P., Cantoni C. (2008) Determination of volatile compounds of precooked prawn (*Penaeus vannamei*) and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice as possible spoilage markers using solid phasemicroextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89: 436–442.

Stamatis N., Arkoudelos J. (2007) Quality assessment of *Scomber colias japonicus* under modified atmosphere and vacuum packaging. *Food Control*, 18: 292–300.

Sumner J., Orejana F., Cordial N. (1986) Keeping quality in ice of tilapia from warm and cold waters. *Asean Food Journal*, 2(2): 71–73.

Surekha M., Reddy S.M. (2000) Preservatives. Classification and properties. In: Robinson R.K., Batt C.A., Patel C. (Eds.) *Encyclopedia of Food Microbiology*. New York Academic Press, pp. 1710-1717.

Svanevik C. M., Lunestad B. T. (2011) Characterisation of the microbiota of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). International Journal of Food Microbiology, 151: 164–170.

Sveinsdottir K., Martinsdottir E., Hyldig G., Jorgensen B., Kristbergsson K. (2002) Application of Quality Index Method (QIM) Scheme in Shelf-life Study of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). Journal of Food Science, 67 (4): 1570-1579.

Taliadourou D., Papadopoulos V., Domvridou E., Savvaidis I.N., Kontominas M.G. (2003) Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filleted Mediterranean aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83:1373–1379.

Taoukis P.S., Koutsoumanis K. and Nychas G.-J.E. (1999a). Modelling of spoilage microflora of boque (*Boops boops*) as a basis for chilled distribution monitoring with time-temperature indicators. In: Bourgeois C.M., Roberts T.A (Eds.) Predictive Microbiology Applied to Chilled Food Preservation (Proceedings of the International Symposium, Quimper, France. June 16-18, 1997). Refrigeration Science and Technology Proceedings, Series, International Institute of Refrigeration (IIR), Paris, France, pp. 316-325.

Taoukis P.S., Koutsoumanis K., Nychas G.-J.E. (1999b) Use of Time Temperature Integrators and Predictive Modelling for Shelf Life Control of Chilled Fish under Dynamic Storage Conditions. International Journal of Food Microbiology, 53: 21-31.

Ten Bring. B., Damink C., Joosten H.M.L.J., Huis In 'T Veld, J.H.J. (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. International Journal of Food Microbiology, 11: 73-84.

Thomas V.L., Delves-Broughton J. (2005) Nisin. In: Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L. (eds.) Antimicrobials in Food. 3rd Edition, CRC Press, pp. 237-274.

Thomas L.V. (2000) Preservatives. Sorbic acid. In: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, C. (Eds.) Encyclopedia of Food Microbiology. New York Academic Press, pp. 1769-1776.

Thorne R. S. W. (1937) The assimilation of nitrogen from amino acids by yeast. Journal of The *Institute of Brewing*, 43:288–293.

Thorne R. S. W. (1941) The growth and fermentation of a strain of *S. cerevisiae* with amino acids as nutrients. Journal of The *Institute of Brewing*, 47: 255–272.

Torrieri E., S. Cavella, F. Villani, P. Masi (2006) Influence of modified atmosphere packaging on the chilled shelf life of gutted farmed bass (*Dicentrarchus labrax*). Journal of Food Engineering, 77: 1078–1086.

Tokur B., Çaklı Ş., Polat A. (2006) The Quality Changes of Trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) with a Vegetable Topping During Frozen Storage (-18°C). EU Journal of Fisheries and Aquatic Science, 23 (3-4): 345-350.

Tryfinopoulou P., Tsakalidou E., Nychas G.- J. E. (2002) Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions. Applied and Environmental Microbiology, 68: 65-72.

Tryfinopoulou P., Tsakalidou E., Vancanneyt M., Hoste B., Swings J., Nychas G.- J. E. (2007) Diversity of *Shewanella* population in fish *Sparus aurata* harvested in the Aegean Sea. Journal of Applied Microbiology, 103: 711-721.

Tsigarida E. Skandamis P., Nychas G.-J.E. (2000) Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. Journal of Applied Microbiology, 89: 901-909.

Tsigarida E., Boziaris I.S., Nychas G.-J.E. (2003) Bacterial Synergism or Antagonism in a Gel Cassette System. Applied and Environmental Microbiology, 69: 7204-7209.

Tzikas Z., Ambrosiadis I., Soutos N., Georgakis Sp. (2007) Quality assessment of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) and blue jack mackerel (*Trachurus picturatus*) during storage in ice. *Food Control*, 18: 1172–1179.

Uchiyama H., Kato N. (1974) Partial freezing as a means of preserving fish freshness. 1. Changes in amino acid, TMA-N, ATP and its related compounds, and nucleic acid during storage. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 40: 1145.

Vaara M (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews*, 56: 395-411.

Vaitilingom, M., Attard, E., Gaiani, N., Sancelme, M., Deguillaume, L., Flossmann, A.I., Amato, P., Delort, A.-M. (2012) Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dome (France). *Atmospheric Environment*, 56: 88-100.

Vallenet D., Nordmann P., Barbe V., Poirel L., Mangenot S., Bataille E., Dossat C., Gas S., Kreimeyer A., Lenoble P., Oztas S., Poulain J., Segurens B., Robert C., Abergel C., Claverie J.M., Raoult D., Medigue C., Weissenbach J., Cruveiller S. (2008) Comparative analysis of Acinetobacters: three genomes for three lifestyles. *PLoS ONE*, 3 (3): E1805.

Vatavali K., Karakosta L., Nathanailides C., Georgantelis D., Kontominas M.G. (2012) Combined Effect of Chitosan and Oregano Essential Oil Dip on the Microbiological, Chemical, and Sensory Attributes of Red Porgy (*Pagrus pagrus*) Stored in Ice Food Bioprocess Technol. DOI 10.1007/s11947-012-1034-z.

Vold L., Holck A. Wasteson Y., Nissen H. (2000) High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *International Journal of Food Microbiology*, 56: 219-225.

Wan Norhana M.N., Poole S. E., Deeth H. C., Gary A. (2012) Dykes Effects of nisin, EDTA and salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and native

microflora on fresh vacuum packaged shrimps stored at 4°C. *Food Microbiology*, 31: 43-50.

Ward D.R., Bai N.J. (1988) Factors affecting microbiological quality of seafoods. *Food Technology*, 42: 85 – 93.

Ward D.M., Weller R., Bateson M. M. (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature (London)*, 345: 63–65.

Weagant S.D., Sado P.N., Colbu KG., Torkelson J.D., Stanley F.A., Krane M.H., Shields S.C., Thayer C.F. (1988) The incidence of *Listeria* species in frozen seafood. *Journal of Food protection*, (51): 655-657.

Williams S. K., Phillips K. (1998) Sodium lactate affects sensory and objective characteristics of tray-packed broiler chicken breast meat. *Poultry Science*, 77: 765–769.

Wimpenny J.W.T., Leistner L., Thomas L.V., Mitchell A.J., Katsaras K., Peetz P. (1995) Submerged bacterial colonies within food and model systems: their growth, distribution and interactions. *International Journal of Food Microbiology*, 28: 299 – 315.

Wood E. J. F. (1953) Heterotrophic bacteria in marine environments in eastern Australia. *Australian Journal of Marine & Freshwater Research*, 4: 160-200.

World Health Organization-WHO (2000) Surveillance Programme for control of food-borne infection and intoxication in Europe 7th Report.

Yamada M. (1932α) Decomposition of amino acids by yeast I. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 8:428–432.

Yamada M. (1932 β) Decomposition of amino acids by yeast II. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 8:498–505.

Yamada M. (1932 γ) Decomposition of amino acids by yeast III. Nippon Nogeikagaku Kaishi 8:506–508.

Yashiro E., McManus P.S. (2012) Effect of streptomycin treatment on bacterial community structure in the apple phyllosphere. PLoS ONE, 7 (5): E37131.

Zhang S.S., Mustapha A. (1999) Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 numbers on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin or nisin combined with EDTA. Journal of Food Protection, 62: 1123-1127.

Zhang J., Zhang E., Scott K., Burgess J.G. (2012) Enhanced electricity production by use of reconstituted artificial consortia of estuarine bacteria grown as biofilms. Environmental Science and Technology, 46 (5): 2984-2992.

Zhuang R.-Y., Huang Y.-W., Beuchat L.R. (1996) Quality changes during refrigerated storage of packaged shrimp and catfish fillets treated with sodium acetate, sodium lactate or propyl gallate. Journal of Food Science, 61: 241–244, 261.

Zorrilla I., Chabrilón M., Arijo S., Díaz-Rosales P., Martínez-Manzanares E., Balebona M.C., Moriñigo M.A. (2003) Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain. Aquaculture 218, 11-20.

ABSTRACT

Microbial spoilage is the main mechanism of quality deterioration of fresh chilled fish. During the storage, only a small fraction of fish microbiota is responsible for spoilage, known as “specific spoilage organisms” or SSOs. Undoubtedly physical and chemical parameters are the most important factors that influence the growth and selection of microorganisms in a food ecosystem. However, the selection of the microbiota during food spoilage is not depended only on the environmental conditions, but also on microbial interactions. Microbial interaction among SSOs affects the growth of microorganisms and the fate of pathogens such as *Listeria monocytogenes* in foods.

The purpose of the PhD thesis was to study the identity of the dominant spoilage microorganisms, their ability to produce metabolites that causing spoilage, the interaction among spoilage microorganisms and *L. monocytogenes* and the effect of antimicrobial adjuncts on safety and quality of fish products under storage at various temperature and atmosphere conditions.

Initially, the spoilage profile of whole sea bream and sea bream fillets under different temperature conditions (0, 5, 15°C) and atmosphere (air and MAP) was investigated. The microbiota was studied by employing classical and molecular (culture dependent and culture independent) techniques. In the molecular-culture dependent techniques, bacterial isolates from the plates were identified by the 16S rRNA gene analysis and sequencing, while in the molecular culture independent techniques, prokaryotic DNA obtained directly from the fish flesh was determined by the gene 16S rRNA analysis, cloning and sequencing. Metabolic products (total volatile nitrogen, trimethylamine, biogenic amines and volatile metabolites) analysis was performed by using not only classical chemical analysis but also modern equipment such as HPLC

and SPME GC-MS to evaluate the potential chemical spoilage indicators of fish deterioration. The fate of *L. monocytogenes* alone or in co-culture with the main spoilage microorganisms was studied under air and MAP at 5°C, using model fish juice agar substrate. Finally, the fate of spoilage microbiota and *L. monocytogenes* was studied in presence of citrates as antimicrobial compounds.

Pseudomonas spp. was found to be the dominant microorganisms on spoiled whole sea bream stored under air and MAP using both approaches. However, the molecular approach, based on 16S rRNA gene analysis, revealed that *Pseudomonas fragi* co-dominate with *Carnobacterium maltaromaticum* strain MMF-32 in fillets under MAP at 5°C as well as *Psychrobacter immobilis* and *Psychrobacter cryohalolentis* in iced stored whole fish by molecular-culture dependent techniques. Moreover, *Aeromonas* clustering phylotypes found to co-dominate with *Pseudomonas* phylotypes by molecular-culture independent techniques. Therefore, molecular methods, such as 16S rRNA gene analysis is a powerful tool for studying food microbial ecology.

Several volatile compounds were found to change during storage in both packages (air and MAP). Various compounds such as ethyl-2-methylbutyrate, ethyl isovalerate and ethyl tiglate were increased during storage in model fish substrate inoculated with *Pseudomonas* spp., while 3-hydroxy-1-butanone, 3-methyl-1-butanal, 2-methyl-1-butanal, Isoamyl alcohol and 2-ethyl-1-hexanol were increased in model fish substrate inoculated with Lactic Acid Bacteria. The volatile compounds detected could be used as potential chemical indices of sea-bream fillets spoilage/freshness.

Different atmospheric conditions affected the shelf-life and also the growth of SSOs in sea bream product. However, *Pseudomonas* spp. was found to be dominant microorganisms on spoiled sea bream under air and MAP conditions.

SSOs found to affect the fate of *L. monocytogenes* in sea bream products under air and MAP conditions. *L. monocytogenes* was increased in cases where *Pseudomonas* spp. dominated. Inhibition of spoilage bacteria under MA conditions found to allow better growth of *L. monocytogenes*. Therefore, MAP conditions seem to allow this pathogen to reach higher numbers compared to package under air.

The dipping of sea bream fillets in sodium citrate solution was found to affect the growth of food spoilage bacteria in both packages and exhibited antibacterial activity against *L. monocytogenes* in fillets under MAP conditions. Shelf-life of sea bream fillets extended by 1 day in both packages. Additionally, the final population of *L. monocytogenes* found to be 1 log lower in fillets with citrate in contrast to fillets without citrate under MAP.

Keywords: Specific Spoilage Organisms, sea bream, 16S rRNA, spoilage, chemical spoilage indices, microbial interaction, *Listeria monocytogenes*

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ (Journals of Science Citation Index)

1. **Parlapani F. F.**, Meziti A., Kormas Ar. K. and I. S. Boziaris (2013). Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis, *Food Microbiology* 33, 85-89.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΥΠΟ ΣΥΓΓΡΑΦΗ

1. **Parlapani F. F.**, Kormas Ar. K. and I. S. Boziaris (2013). Analysis of 16S rRNA gene reveals different dominant species in spoiled Mediterranean Sea bream fillets. *In preparation.*

2. **Parlapani F. F.**, Malouchos A., Haroutounian A. Serko and I. S. Boziaris (2013). Microbial spoilage association and volatiles production during the storage of sea-bream fillets under various conditions. *In preparation.*

3. **Parlapani F. F.**, Haroutounian A. Serko and I. S. Boziaris (2013). Volatiles production during the storage of model sea-bream juice agar inoculated with Specific Spoilage Organisms under various conditions. *In preparation.*

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

1. **Parlapani F. F.**, Kormas Ar. K. and I. S. Boziaris (2012). Use of 16S rRNA gene analysis for the identification of dominant microbiota in sea-bream fillets stored at various conditions. FOOD MICRO Conference, Istanbul 3-7 September.

2. **Parlapani F. F.** & I.S. Boziaris (2012). Interaction between *Listeria monocytogenes* and spoilage microorganisms in sea bream fillets and model fish substrate stored in air and MA package at 5°C. FOOD MICRO Conference, Istanbul 3-7 September.

3. **Parlapani F. F.**, Haroutounian A.S. & I.S. Boziaris (2011). Microbial spoilage association and volatiles production during the storage of sea-bream fillets stored aerobically and under MAP at 0°C. Society for Applied Microbiology, UK — Summer Conference 2011, Dublin, Ireland, 4-7 July.

4. **Parlapani F. F.**, Meziti A., Kormas Ar. K. & I. S. Boziaris (2011). Spoilage microbiota of sea-bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. Society for Applied Microbiology, UK — Summer Conference 2011, Dublin, Ireland 4-7 July.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΕΘΝΙΚΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

- 1. Παρλαπάνη Φ. Φ.,** Κορμάς Αρ. Κ. & Ι. Σ. Μποζιάρης (2012). Διερεύνηση ποικιλότητας αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα και ολόκληρη τσιπούρα υπό ψύξη με ανάλυση γονιδίου 16S rRNA. 5^ο Συνέδριο της Επιστημονικής εταιρείας Μικροβιόκοσμος, Αθήνα 14-16 Δεκεμβρίου.
- 2. Παρλαπάνη Φ. Φ.,** Χαρουτουγιάν Σ. & Ι. Σ. Μποζιάρης (2011). Μικροβιακή αλλοίωση και παραγωγή πτητικών ουσιών κατά την συντήρηση υπό ψύξη φιλέτων τσιπούρας (*Sparus aurata*) σε συνθήκες αέρα και τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Ένωση Ελλήνων Χημικών, Αθήνα, 4-5 Νοεμβρίου.