

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΖΩΙΚΟΥ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΩΝ ΤΟΥ ΑΧΙΝΟΥ ΚΑΙ Η
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΤΟΝ ΕΜΠΟΡΙΚΟ ΧΡΟΝΟ ΖΩΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥΣ ΣΕ ΧΑΜΗΛΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ»**

ΣΑΒΒΑ ΜΑΡΙΑ

ΒΟΛΟΣ 2010

**«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΩΝ ΤΟΥ ΑΧΙΝΟΥ ΚΑΙ Η
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΤΟΝ ΕΜΠΟΡΙΚΟ ΧΡΟΝΟ ΖΩΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥΣ ΣΕ ΧΑΜΗΛΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

- 1) Μποζιάρης Ιωάννης**, Επίκουρος Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*,
- 2) Δημήτριος Βαφείδης**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπονδύλων και άμεση - έμμεση χρησιμότητά τους, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*,
- 3) Κωνσταντίνος Κορμάς**, Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής, Οικολογία Υδάτινης Στήλης με έμφαση στα Μικροβιακά και Τροφικά Είδη, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

**«Στους γονείς μου για την
συμπράσταση τους
και στον Χάρη»**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, τον καθηγητή κύριο Μποζιάρη Ιωάννη για την βοήθειά του και την υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους Κορμά Κωνσταντίνο και Βαφείδη Δημήτριο, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους κατά την διάρκεια φοίτησης μου στο Τμήμα.

Την βαθιά μου ευγνωμοσύνη θα ήθελα να εκφράσω απέναντι στους γονείς μου, **Μιχάλη** και **Χριστίνα** για την πίστη τους σε έμένα όλα αυτά τα χρόνια και για την συμπαράστασή τους σε κάθε μου απόφαση.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον **Χάρη** για την ατελείωτη συμπαράστασή του και το κουράγιο που μου έδινε σε κάθε αναποδιά.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα νωπά ιχθυηρά είναι ευαλλοίωτα προϊόντα με σχετικά σύντομο εμπορικό χρόνο ζωής. Έτσι είναι σαφές ότι γίνονται προσπάθειες να αναπτυχθούν μέθοδοι οι οποίες θα διασφαλίσουν την ασφάλεια του προϊόντος και θα προσφέρουν στον καταναλωτή ένα τρόφιμο υψηλής ποιότητας με όσο το δυνατό μεγαλύτερο εμπορικό χρόνο ζωής.

Ο προσδιορισμός της σύνθεσης του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού και του πληθυσμού στο σημείο αλλοίωσης σε επίπεδο γένους ή οικογένειας, καθώς και ο ρυθμός αύξησης του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού πραγματοποιήθηκε για γονάδες αχινού (*Paracentrotus lividus*) συντηρημένες σε θερμοκρασίες ψύξης και περιβάλλοντος.

Ο αχινός απαντάται στον Ατλαντικό και στη Μεσόγειο. Είναι εδώδιμο είδος με χαρακτηριστική μυρωδιά και πολύ καλή γεύση. Απαντάται σε υδατοσυλλογές που σχηματίζονται σε βράχους. Είναι τρόφιμο εκμεταλλεύσιμο από την αρχαιότητα.

Η χημική σύσταση των ιχθυηρών, η υψηλή περιεκτικότητά τους σε νερό (75% κατά μέσο όρο) καθώς και το σχετικά υψηλό pH τους (6.2-6.8 τα περισσότερα) τα καθιστούν ένα πολύ καλό υπόστρωμα ανάπτυξης μιας ευρείας ποικιλίας μικροοργανισμών. Οι χαμηλές θερμοκρασίες παρατείνουν τους ρυθμούς αύξησης των μικροοργανισμών και επιπλέον παίζουν σημαντικό ρολό στον χρόνο που χρειάζονται για να αναπτυχθούν. Αυτό έχει σημαντική επίδραση στον ρυθμό αλλοίωσης των μονάδων του αχινού.

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική των τρυβλίων για την καταμέτρηση των μικροοργανισμών και την ταυτοποίησή τους. Η τεχνική αυτή είναι χρονοβόρα, παρόλα αυτά παρουσιάζει έγκυρα αποτελέσματα. Εκτός από τις κλασσικές μέθοδοι για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται και

νέες μέθοδοι, ταχύτερες με μεγαλύτερη ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Η χρήση της ATP και η τεχνική της ELISA είναι κάποιες από αυτές.

Η αρχική χλωρίδα αποτελείται, κυρίως από βάκιλλους Gram θετικούς του γένους *Bacillus* αλλά και από Gram αρνητικούς ψυχρότροφους μικροοργανισμούς. Το επίπεδο μικροβιακού πληθυσμού στο σημείο αλλοίωσης φθάνει τους 7 λογαρίθμους σε 24 και 60 ώρες για τις γονάδες που αποθηκεύθηκαν στους 20 °C και τους 5°C αντίστοιχα. Η σύνθεση της μικροχλωρίδας αλλοίωσης εξαρτάται κυρίως από την θερμοκρασία συντήρησης με αποτέλεσμα αυτή να κυριαρχείται από Gram αρνητικούς ψυχρότροφους και Gram αρνητικούς *Aeromonas* και της οικογένειας *Enterobacteriaceae* για τις γονάδες που αποθηκεύθηκαν στους 5°C και τους 20°C αντίστοιχα.

Η θερμοκρασία αποθήκευσης φαίνεται να έχει καταλυτικό ρόλο στον εμπορικό χρόνο ζωής του αχινού. Σε ότι αφορά την αποθήκευση του αχινού ο εμπορικός χρόνος ζωής της ήταν μεγαλύτερος στις χαμηλές θερμοκρασίες (5°C) σε σχέση με αυτές που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20°C). Στους αχινούς που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20°C) η μικροβιακή χλωρίδα αναπτύχθηκε με ταχύτατους ρυθμούς (0.175 h^{-1} στους 20°C και 0.087 h^{-1} τους 5°C), μειώνοντας τον εμπορικό χρόνο ζωής τους, σε λιγότερο από 24 ώρες.

Η μελέτη της μικροβιολογίας συντήρησης των ευπαθών προϊόντων είναι πολύ σημαντική για την κατανόηση των μηχανισμών αλλοίωσης με σκοπό την εφαρμογή των κατάλληλων στρατηγικών για την αύξηση του εμπορικού χρόνου ζωής. Για την αύξηση του εμπορικού χρόνου ζωής θα πρέπει να δοκιμασθεί η εφαρμογή της τεχνολογίας εμποδίων με την μορφή της συσκευασίας τροποποιημένων ατμοσφαιρών καθώς και άλλων εμποδίων όπως το χαμηλότερο pH, η προσθήκη φυσικών αντιμικροβιακών. Όμως είναι ανάγκη να βρεθούν τεχνικές πιο γρήγορες και

εξελιγμένες ώστε να αποφευχθεί η πολύωρη αναμονή για την εξαγωγή αποτελεσμάτων καθώς και για να αντιμετωπιστούν σε σύντομο χρονικό διάστημα τα ψάρια που είναι εξαιρετικά ευαλλοίωτο προϊόν.

Λέξεις-Κλειδιά: μικροβιακή αλλοίωση, *Paracentrotus lividus*, χλωρίδα αλλοίωσης, εμπορικός χρόνος ζωής

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	11
1.1 Γενικά.....	11
1.2 Αλλοίωση αλιευμάτων.....	12
1.3 Μικροβιακή αλλοίωση.....	12
1.4 Κυριότερες μέθοδοι καταμέτρησης, ανίχνευσης και ταυτοποίησης μικροοργανισμών.....	14
1.4.1 Κλασσικές μέθοδοι.....	15
1.4.2 Έμμεσος προσδιορισμός του μικροβιακού πληθυσμού με μέτρηση του ATP.....	15
1.4.3 Ανοσολογικές τεχνικές.....	16
1.5 Αχινός.....	16
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	19
2.1 Παραλαβή και αποθήκευση αχινών.....	19
2.2 Πειραματική διαδικασία (γενικά).....	19
2.3 Πειραματική διαδικασία (ειδικά).....	21
2.3.1 Προσδιορισμός Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας.....	21
2.4 pH.....	22
2.5 Οργανοληπτικά Χαρακτηριστικά.....	22
2.6 Ταυτοποίηση αποικιών.....	23
2.6.1 Χρώση Gram, σχήμα του μικροβιακού κυττάρου και παρουσία σπορίων.....	25
2.6.2 Δοκιμή της οξειδάσης.....	26
2.6.3 Δοκιμή της καταλάσης.....	27
2.6.4 Δοκιμή αερόβιου και αναερόβιου μεταβολισμού της γλυκόζης σε Hugh and Leifson μέσο.....	27
2.6.5 Ικανότητα κίνησης.....	28
2.6.6 Μετατροπή του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης σε τριμεθυλαμίνη και παραγωγή υδρόθειου.....	28
3. Αποτελέσματα.....	31
3.1 Οργανοληπτικές μεταβολές.....	31
3.2 Επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης στη μεταβολή της ολικής μικροβιακής χλωρίδας και στο χρόνο αλλοίωσης των γονάδων του αχινού.....	32
3.3 Μεταβολή του pH στις γονάδες του αχινού.....	34
3.4 Ταυτοποίηση αποικιών.....	35
4. Συζήτηση.....	40
5. Συμπεράσματα.....	47
Βιβλιογραφία.....	48
Abstract.....	59

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ-ΕΙΚΟΝΩΝ-ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Εικόνα 1. Πλαστικό δοχείο μεταφοράς αχινών.....	19
Εικόνα 2. Μικροβιολογική διαδοχική αραίωση.....	22
Εικόνα 3. Ομαδοποίηση των αποικιών με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά.....	23
Εικόνα 4. Μέθοδος γραμμωτής ράβδωσης.....	24
Εικόνα 5. Δοκιμή της καταλάσης.....	27
Εικόνα 6. Δοκιμή μετατροπής του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (TMAO) σε τριμεθυλαμίνη (TMA).....	29
Πίνακας 1. Οργανοληπτική εκτίμηση των γονάδων κατά την αποθήκευσή της στους 5°C.....	31
Πίνακας 2. Οργανοληπτική εκτίμηση των γονάδων κατά την αποθήκευσή της στους 20°C.....	31
Πίνακας 3. Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, διάρκεια φάσης προσαρμογής και μέγιστος πληθυσμός της ολικής μικροβιακής χλωρίδας σε TSA των γονάδων του αχινού αποθηκευμένων στους 5 και στους 20°C.....	34
Πίνακας 4. Χρόνος αλλοίωσης των γονάδων του αχινού και επίπεδο αλλοίωσης...34	
Πίνακας 5. Μεταβολή του pH των γονάδων του αχινού στους 5°C.....	35
Πίνακας 6. Σύνθεση της αρχική μικροχλωρίδας των γονάδων του αχινού.....	36
Πίνακας 7. Σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού των γονάδων του αχινού σε συντήρηση.....	37

Πίνακας 8. Σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού των γονάδων του αχινού σε συντήρηση στους 20°C στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.....	38
Σχήμα 1. Μεταβολή και καμπύλη ανάπτυξης του ολικού μικροβιακού πληθυσμού των γονάδων του αχινού αποθηκευμένου στους 5 °C.....	33
Σχήμα 2. Μεταβολή και καμπύλη ανάπτυξης του ολικού μικροβιακού πληθυσμού των γονάδων του αχινού αποθηκευμένου στους 20 °C.....	33
Σχήμα 3. Σύνθεση της αρχικής μικροχλωρίδας των γονάδων του αχινού.....	37
Σχήμα 4. Σύνθεση της μικροχλωρίδας των γονάδων του αχινού σε αποθήκευση στους 5 °C στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.....	38
Σχήμα 5. Σύνθεση της μικροχλωρίδας των γονάδων του αχινού σε αποθήκευση στους 25 °C στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.....	39

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Οι ιχθύες και τα θαλασσινά αποτελούν ένα βασικό μέρος της διατροφής του ανθρώπου από αρχαιοτάτων χρόνων. Είναι πλούσια σε πολύτιμα για τον οργανισμό λιπαρά οξέα, βιταμίνες, ανόργανα άλατα και ιχνοστοιχεία τα οποία είναι απαραίτητα για την σωστή διατροφή του ανθρώπου. Αποτελούν προϊόντα με υψηλή διατροφική αξία, καθώς περιέχουν πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας, λιπαρά οξέα της σειράς ω-3 ενώ οι βιταμίνες που περιέχουν προστατεύουν τον άνθρωπο από παθήσεις όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Κωνσταντίνου-Κόκοτου και συν., 2005).

Τα νωπά ιχθυηρά είναι ευαλλοίωτα προϊόντα με σχετικά σύντομο εμπορικό χρόνο ζωής. Έτσι είναι σαφές ότι γίνονται προσπάθειες να αναπτυχθούν μέθοδοι οι οποίες θα διασφαλίσουν την ασφάλεια του προϊόντος και θα προσφέρουν στον καταναλωτή ένα τρόφιμο υψηλής ποιότητας με όσο το δυνατό μεγαλύτερο εμπορικό χρόνο ζωής (McDonald and Sun, 1999).

Η χημική σύσταση των ιχθυηρών, η υψηλή περιεκτικότητά τους σε νερό (75% κατά μέσο όρο) καθώς και το σχετικά υψηλό pH τους (6.2-6.8 τα περισσότερα) τα καθιστούν ένα πολύ καλό υπόστρωμα ανάπτυξης μιας ευρείας ποικιλίας μικροοργανισμών. Τα αλιεύματα ως άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, αλλοιώνονται σε μικρό χρονικό διάστημα από την αλίευση τους (Gram and Huss 1996).

Ο πληθυσμός και η σύνθεση της μικροχλωρίδας των ψαριών και των θαλασσινών εξαρτάται από τη θερμοκρασία του νερού στο οποίο έχουν αλιευθεί, την περίοδο του έτους στην οποία αυτό συνέβη, το επίπεδο των μέτρων υγιεινής που εφαρμόζονται κατά την αλίευση τους, τη μεταχείριση και την επεξεργασία τους (Huss 1995). Τα αλιεύματα επιμολύνονται με μικροοργανισμούς κατά την αλίευση τους από

το περιβάλλον, τον άνθρωπο, τον εξοπλισμό και τους χώρους επεξεργασίας. Είναι κατανοητό ότι το μικροβιακό φορτίο των αλιευμάτων μπορεί να είναι πολύ αυξημένο τη στιγμή της εμπορίας σε σχέση με την στιγμή αλίευσης (Huss 1995).

1.2 Αλλοίωση Αλιευμάτων

Η ποιότητα των ιχθύων και των θαλασσινών εξαρτάται από το βαθμό αλλοίωσης ή τον βαθμό υποβάθμισης του προϊόντος. Έχουν ερευνηθεί διάφορες μέθοδοι για τον έλεγχο της ποιότητας τους οι οποίες αξιολογούν διάφορα ποιοτικά χαρακτηριστικά είτε οργανοληπτικά, φυσικοχημικά ή μικροβιολογικά (Botta 1995, Olafsdottir et al. 1997).

Ως αλλοίωση των αλιευμάτων ορίζεται η αλλαγή στις οργανοληπτικές ιδιότητες (οσμή, χρώμα, συνεκτικότητα σάρκας κτλ) των προϊόντων που τα καθιστά ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση (Gram 1993, Gram and Huss 1995). Ως συντήρηση ορίζεται η λήψη μέτρων που συμβάλουν στη σταθεροποίηση των τροφίμων σε σχέση με τους παράγοντες που προκαλούν την ποιοτική υποβάθμιση ή αλλοίωση τους (Jay 1992).

Αλλοίωση αλιευμάτων μπορεί να θεωρηθεί ως οποιαδήποτε αλλαγή που καθιστά το προϊόν απαράδεκτο για ανθρώπινη κατανάλωση (Hayes 1985, Huis in't Veld 1996). Για τα νωπά αλιεύματα η μικροβιακή δράση είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας υποβάθμισης της ποιότητας και τις περισσότερες φορές αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα στην διάρκεια ζωής τους (Gram and Huss 1996).

1.3 Μικροβιακή Αλλοίωση

Η μικροβιακή αλλοίωση των τροφίμων ορίζεται σαν κάθε σύμπτωμα ή ομάδα συμπτωμάτων που εκδηλώνονται με αλλαγές στην οσμή, στο άρωμα ή γενικά στην

εμφάνιση του τροφίμου λόγω μικροβιακής δραστηριότητας (Gill 1986). Η εκδήλωση της μικροβιακής αλλοίωσης όπως :

- Η ανίχνευση ανεπιθύμητων οσμών
- Ο σχηματισμός "βλέννας"
- Η παραγωγή αερίων
- Αλλαγές στο χρώμα
- Αλλαγές στην υφή

Εξαρτάται κυρίως από τις συνθήκες που επικρατούν κατά την επεξεργασία του προϊόντος, την αποθήκευση και τη διανομή του (Gram and Huss 1996). Η ευαισθησία των νωπών αλιευμάτων στη μικροβιολογική αλλοίωση οφείλεται: i) στην ποικιλόθερμη φύση των αλιευμάτων, ii) στο υψηλό pH της σάρκας τους ($\text{pH} > 6$), iii) στην υψηλή ποσότητα του μη-πρωτεϊνικού αζώτου (NPN-Non Protein Nitrogen) που οφείλεται το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) και άλλες ουσίες, iv) το μικρό ποσοστό υδατανθράκων που περιέχεται στον μυϊκό ιστό των αλιευμάτων και v) την χαμηλή συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος. Όλα αυτά επιτρέπουν την ανάπτυξη βακτηρίων ευαίσθητα στο pH όπως το *Shewanella putrefaciens* (Gram et al. 1987, Daalgaard et al. 1993). Επίσης η ποικιλόθερμη φύση των αλιευμάτων επιτρέπει στα βακτήρια που διαβιούν σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, να αναπτυχθούν (Gram and Huss 1996). Στα αλιεύματα της Μεσογείου που συντηρούνται αερόβια σε χαμηλές θερμοκρασίες οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί αλλά και αυτοί που χαρακτηρίζονται ως ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί είναι κυρίως οι *Pseudomonas spp.* εξαιτίας των μεγάλων τους πληθυσμών και της υψηλής περιεκτικότητας των ψαριών σε TMAO (Koutsoumanis and Nychas 1999).

Ως «ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί» (EAM) ορίζεται συγκεκριμένη ομάδα μικροοργανισμών που παράγουν τις χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές κατά

την αλλοίωση. Κατά την διάρκεια της συντήρησης, οι ΕΑΜ αναπτύσσονται με γρηγορότερους ρυθμούς σε σχέση με τους ρυθμούς ανάπτυξης της υπόλοιπης μικροβιακής χλωρίδας του τροφίμου. Η σημαντικότερη πρόκληση είναι να βρεθεί η σχέση μεταξύ της σύνθεσης των αλλοιογόνων μικροοργανισμών και της παρουσίας μικροβιακών μεταβολιτών, σχετικών με την αλλοίωση ώστε να είναι έτσι δυνατή και η πρόβλεψη της μικροβιακής αλλοίωσης και του εναπομείναντος εμπορικού χρόνου ζωής (Borch and Agerhem 1992, Drosinos and Board 1994).

Οι νέες μικροβιακές μέθοδοι που βασίζονται σε ανοσολογικές και μοριακές τεχνικές, έχουν αναπτυχθεί ήδη για την ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών (Huis in't Veld et al. 1994, Fung 1994, Van der Vossen and Hofstra 1996). Αυτές οι τεχνικές θα μπορούσαν επίσης να εφαρμοστούν για την έγκαιρη ανίχνευση των ΕΑΜ. Εντούτοις, προτού να μπορέσουν τέτοιες τεχνικές να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση των ΕΑΜ, αυτοί οι μικροοργανισμοί πρέπει πρώτα να προσδιοριστούν για κάθε τύπο προϊόντος και η επίδρασή τους στα αλλοιογόνα χαρακτηριστικά του τροφίμου πρέπει να καθοριστεί (Huis in't Veld 1996).

1.4 Κυριότερες μέθοδοι καταμέτρησης, ανίχνευσης και ταυτοποίησης μικροοργανισμών

Εξαιτίας του παγκόσμιου εμπορίου τροφίμων, υπάρχει ανησυχία για την διασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων, της παγκόσμιας υγείας, της διασφάλισης ποιότητας για αποφυγή της αλλοίωσης των τροφών και της ανάπτυξης και εξάπλωσης παθογόνων στελεχών. Όλοι αυτοί είναι σημαντικοί παράγοντες για την ανάπτυξη μεθόδων μικροβιολογικών για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των μικροοργανισμών (Wilson 2008).

Οι σύγχρονες μέθοδοι και ο αυτοματισμός που εισάγονται στην μικροβιολογία των τροφίμων και έχουν σαν αντικείμενο την απομόνωση, την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών, ολοένα και αυξάνονται. Οι συμβατικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στα εργαστήρια ανά τον κόσμο έχουν να κάνουν με υγρά και στερεά θρεπτικά υλικά και αντιδραστήρια. Είναι όμως χρονοβόρες διαδικασίες τόσο στην προετοιμασία όσο και στην συλλογή δεδομένων. Παρόλα αυτά, παραμένουν οι βάσεις για την εφαρμοσμένη μικροβιολογία και την μικροβιολογία των τροφίμων και τα δεδομένα πάνω στα οποία βασίζονται για την ανακάλυψη νέων μεθόδων (Griffiths et al. 2000).

1.4.1 Κλασσικές μέθοδοι

Για την απομόνωση, ταυτοποίηση, ανίχνευση και απαρίθμηση μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται κλασσικές αλλά και μοντέρνες μικροβιολογικές μέθοδοι. Κύρια κλασσική μέθοδος απαρίθμησης μικροοργανισμών αποτελεί η μέθοδος με τη χρήση των τρυβλίων. Είναι απλή και εύκολη στην εφαρμογή. Καταμετρά ζωντανά κύτταρα με ενεργό μεταβολισμό. Μετρά όμως μόνο τα κύτταρα εκείνα που έχουν την ικανότητα δημιουργίας αποικιών και αυτό είναι ένα σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου.

1.4.2 Έμμεσος προσδιορισμός του μικροβιακού πληθυσμού με μέτρηση του ATP

Καθώς αναπτύσσονται οι τεχνικές και οι μέθοδοι για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, τα όρια μεταξύ οργάνων χρήσης και διαγνωστικών δοκιμών μεγαλώνουν. Οι επιστήμονες προσπάθησαν να χρησιμοποιήσουν την ATP για να εκτιμήσουν τους ολικούς βιώσιμους μικροοργανισμούς στα τρόφιμα και τα αλιεύματα, αφού όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί

χρησιμοποιούν την ATP. Τα αποτελέσματα δεν είναι πάντα αντιπροσωπευτικά του πληθυσμού γιατί:

1. Διαφορετικοί οργανισμοί έχουν διαφορετική ποσότητα ATP ανά κύτταρο
2. Ακόμα και για τον ίδιο τον μικροοργανισμό η ποσότητα ATP ανά κύτταρο είναι διαφορετική σε κάθε στάδιο ανάπτυξης
3. Η ποσότητα ATP από βιομάζα αίματος ή βιολογικών υγρών από το κάθε τρόφιμο ανακατεύεται με την ATP του βακτηρίου-στόχος (Fung, 2008).

1.4.3 Ανοσολογικές τεχνικές

Η αλληλεπίδραση αντιγόνου και αντισώματος χρησιμοποιούνται πολλές δεκαετίες για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών. Υπάρχουν πολλοί τρόποι για να εκτελεστεί η αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος αλλά η πιο διαδεδομένη τεχνική είναι η ένζυμο-ανοσολογική ή ELISA. Τα αντισώματα τοποθετούνται σε στερεό μέσο. Το διάλυμα που περιέχει τα αντιγόνα του εξεταζόμενου βακτηρίου τοποθετείται στα κελιά της μικροπλάκας (Microtiter plate) και τότε τα αντισώματα δεσμεύονται στα βακτήρια όπου και ανιχνεύονται (Tortorello and Gendel 1993, Robinson et al. 2000, Walser 2000).

1.5 Αχινός

Ο αχινός *P. lividus* (Lamarck) είναι μορφότυπος που απαντάται στον Ατλαντικό και στη Μεσόγειο σε μεγάλους αριθμούς στην παράκτια ζώνη, ειδικά στην υποπαραλιακή ζώνη έως τα είκοσι μέτρα. Πολλές γνώσεις από τη βιολογία και τις παραμέτρους του πληθυσμού του είναι ελάχιστα γνωστά, αν και είναι ένα εδωδιμο είδος με εμπορικό ενδιαφέρον. Είναι σκούρος πορφυρός, σχεδόν μαύρος. Φέρει μυζιτικούς ποδίσκους που τακτοποιούνται σε τόξα των πέντε-έξι, με ορατά πέντε-έξι

ζευγάρια πόρων κάτω από τους ποδίσκους, πάνω στο κέλυφος. Φτάνει μέχρι τα επτά εκατοστά στη διάμετρο (Turon et al. 1995). Το εδώδιμο μέρος του είναι οι γονάδες του, που έχουν σχήμα ημικυκλικό και κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα (Pineiro-Sotelo et al. 2002). Οι γονάδες του έχουν την μέγιστη αύξηση τους μήνες Ιανουάριο έως τη μέση του Απριλίου (Ramonell 1985). Οι γονάδες αυτού είναι εδώδιμες και είναι βραβευθέν προϊόν ως λιχουδιά στις μεσογειακές χώρες.

Απαντάται συχνά στις υδατοσυλλογές που σχηματίζονται στους βράχους, στους βράχους ασβεστόλιθων όπου τα ζώα ζουν στις κοιλότητες. Περιστασιακά βρίσκεται στα ρηχά νερά κάτω από τους βράχους και σπάνια στα πιο μεγάλα θαλάσσια βάθη.

Ο αχινός είναι τρόφιμο που το εκμεταλλεύονταν από την αρχαιότητα ακόμα (Voultsiadou and Vafidis 2007). Σήμερα ο αχινός είναι δημοφιλές τρόφιμο στην Ιαπωνία, Ιρλανδία, Ιταλία, Ισπανία και Ελλάδα κυρίως για την χαρακτηριστική μυρωδιά και την εξαιρετική του γεύση (Kelly 2005). Στην Ελλάδα, το εμπόριο του αχινού περιορίζεται στα νησιά και στις παράκτιες περιοχές εξαιτίας της ευαλλοίωτης φύσης του προϊόντος. Τρώγεται φρέσκος αρτυσμένος με ελαιόλαδο και χυμό λεμονιού (Stamatis and Vafidis 2009).

Εξαιτίας της υψηλής ζήτησης για εξαιρετικής ποιότητας γονάδες, τα φυσικά αποθέματα του αχινού έχουν μειωθεί (Gianguzza et al. 2006). Στην Ελλάδα, ο κοινός αχινός *P. lividus*, ήταν κάποτε σε αφθονία στις ακτές του Ιονίου και του Αιγαίου πελάγους όπως επίσης ήταν και σημαντικό απόθεμα της προσπάθειας των αλιέων στα τέλη της δεκαετίας του 1980 με αρχές του 1990 (Tzanatos et al., 2005).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία έχει σαν σκοπό:

I) την διερεύνηση της κινητικής της ανάπτυξης της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας και της επίδρασης αυτής στον εμπορικό χρόνο ζωής κατά την συντήρηση του προϊόντος σε διάφορες θερμοκρασίες.

II) τον προσδιορισμό της σύνθεσης της αρχικής μικροβιακής χλωρίδας των γονάδων του αχινού καθώς και τις χλωρίδας στο χρονικό σημείο αλλοίωσης με χρήση κλασσικών μεθόδων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Παραλαβή και Αποθήκευση των αχιών

Για την διεξαγωγή του πειράματος συλλέχτηκαν αχινοί (*P. lividus Lamarck 1816*) από τον Παγασητικό κόλπο κατά τους μήνες Νοέμβριο 2007 και Μάρτιο 2008. Μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε ειδικό πλαστικό δοχείο σταθερού όγκου γεμάτο με θαλασσινό νερό. Με την χρήση ειδικού εργαλείου αφαιρέθηκε το εξωτερικό κέλυφος με τους άκανθες και συλλέχτηκαν οι γονάδες. Χρησιμοποιήθηκαν γονάδες από τριάντα αχινοί κάθε φορά για την διεξαγωγή του πειράματος. Από κάθε αχινό, η συλλογή των γονάδων έγινε με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην συλλεχτούν και υπολείμματα από το εσωτερικό του κελύφους. Η συλλογή γονάδων έγινε υπό στείρες συνθήκες.



Εικόνα 1. Πλαστικό δοχείο μεταφοράς αχιών (Λόλας Αλέξιος, 2008)

2.2 Πειραματική διαδικασία (γενικά)

Οι γονάδες χωρίστηκαν σε δυο μέρη των είκοσι γραμμαρίων, τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους περιέκτες (χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία) και στη συνέχεια

μεταφέρθηκαν το ένα μέρος στο ψυγείο στους 5°C και το άλλο σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 20°C.

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (κάθε οχτώ ώρες) λαμβάνονταν δείγμα 1 γραμμαρίου για μικροβιακή ανάλυση. Το εξεταζόμενο δείγμα ομογενοποιήθηκε σε αποστειρωμένο ισοτονικό πεπτονόχο σαλίνη με χρήση του μηχανήματος Vortex, αραιώθηκε διαδοχικά, με σκοπό τη μείωση των κυττάρων σε τέτοιο επίπεδο, ώστε οι αποικίες που θα σχηματιστούν στο θρεπτικό υλικό να είναι αραιά κατανεμημένες και εύκολο να μετρηθούν. Τα τρυβλία επώαστηκαν για ορισμένο χρονικό διάστημα προκειμένου να αυξηθεί το μέγεθος των αποικιών και να είναι ορατές μακροσκοπικά. Από τον αριθμό των μετρούμενων αποικιών στα τρυβλία και τον αριθμό των διαδοχικών αραιώσεων υπολογίζεται ο λογάριθμος των βιώσιμων αποικιών ανά γραμμάριο δείγματος.

Από τα τρυβλία που λήφθηκαν στην έναρξη του πειράματος (αρχική δειγματοληψία στον χρονικό σημείο μηδέν) και τα τρυβλία που λήφθηκαν στο χρονικό σημείο της οργανοληπτικής απόρριψης-αλλοίωσης των γονάδων του αχινού (εικοσιτέσσερις ώρες στους 20°C και εξήντα δύο ώρες στους 5°C), για την κάθε θερμοκρασία, οι αποικίες αρχικά απομονώθηκαν και ομαδοποιήθηκαν μορφολογικά και κατόπιν ταυτοποιήθηκαν ως ένα βαθμό (μέχρι οικογένεια ή γένος) για να προσδιοριστεί η σύνθεση του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού και του μικροβιακού πληθυσμού αλλοίωσης, αντίστοιχα.

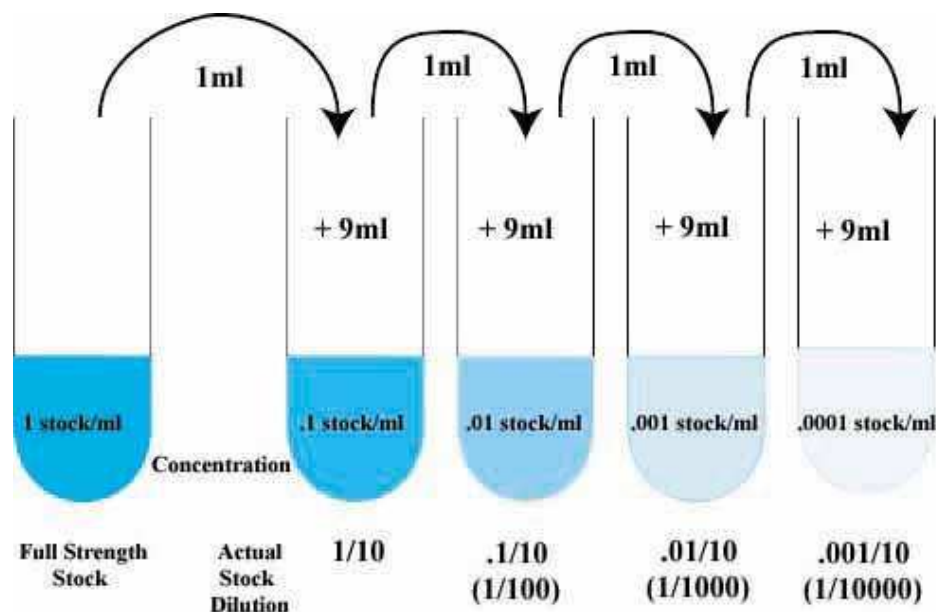
Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές με λήψη διπλών δειγμάτων κάθε φορά, σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα. Οι συνθήκες εκτέλεσης του πειράματος ήταν οι ίδιες και στις δύο περιπτώσεις. Καμία παράμετρος δεν τροποποιήθηκε κατά τη διάρκεια των επαναλήψεων.

Τα μικροβιολογικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της LAB M (Lancashire, UK).

2.3 Πειραματική Διαδικασία (ειδικά)

2.3.1 Προσδιορισμός Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX)

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (κάθε οχτώ ώρες) και υπό ασηπτικές συνθήκες λαμβάνονταν εις διπλούν δείγμα ενός γραμμαρίου γονάδων και μεταφέρονταν σε αποστειρωμένο ισοτονικό πεπτονόχο σαλίνη (Maximum Recovery Diluent-MRD, 0.85% w/v NaCl, 0.1% w/v βακτηριολογική πεπτόνη). Πραγματοποιούνταν ομογενοποίηση του δείγματος σε Vortex για ένα λεπτό και ακολουθούσαν διαδοχικές αραιώσεις σε εννέα μιλίμετρα MRD (Εικ. 2). Με τη χρήση πιπέτας λαμβάνονταν 0,1 μιλίμετρα από το δείγμα. Ακολουθούσε επίστρωση με τη χρήση ειδικού αποστειρωμένου εργαλείου επίστρωσης σε διπλά τρυβλία με Tryptone Soy Agar-TSA (η σύσταση του είναι: δεκαπέντε γραμμάρια (γρ.) τρυπτόνη (tryptone), πέντε γρ. χλωριούχο νάτριο (sodium chloride), πέντε γρ. βακτηριολογική πεπτόνη (bacteriological peptone), ένα γρ εκχύλισμα κρέατος (meat extract), δύο γρ. εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), δεκατέσσερα γρ. άγαρ (σε χίλια μιλιλίτρα απιονισμένου νερού). Κατόπιν τα τρυβλία μεταφέρονταν για επώαση στους 25°C για σαρανταοκτώ ώρες και ακολουθούσε καταμέτρηση των αποικιών.



Εικόνα 2. Μικροβιολογική διαδοχική αραίωση (Pfenning, 2007)

2.4 Μέτρηση pH

Το pH των γονάδων συμβατικά ορίστηκε το pH που μετρούνταν κατά την πρώτη αραίωση. Μετρούνταν το pH της πρώτης αραίωσης που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά για επίστρωση του τρυβλίου, με βοήθεια ηλεκτρονικού πεχάμετρου, (pH 730, inoLab, WTW series). Το πεχάμετρο καθαριζόταν με απιονισμένο νερό κάθε φορά κατά τη χρήση του, για να αποφευχθεί η μεταφορά δείγματος που θα μπορούσε να επηρεάσει το pH του μετρούμενου δείγματος. Επίσης δοκιμάζονταν κάθε φορά σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα-δείγματα γνωστού pH για να γίνει η βαθμονόμηση.

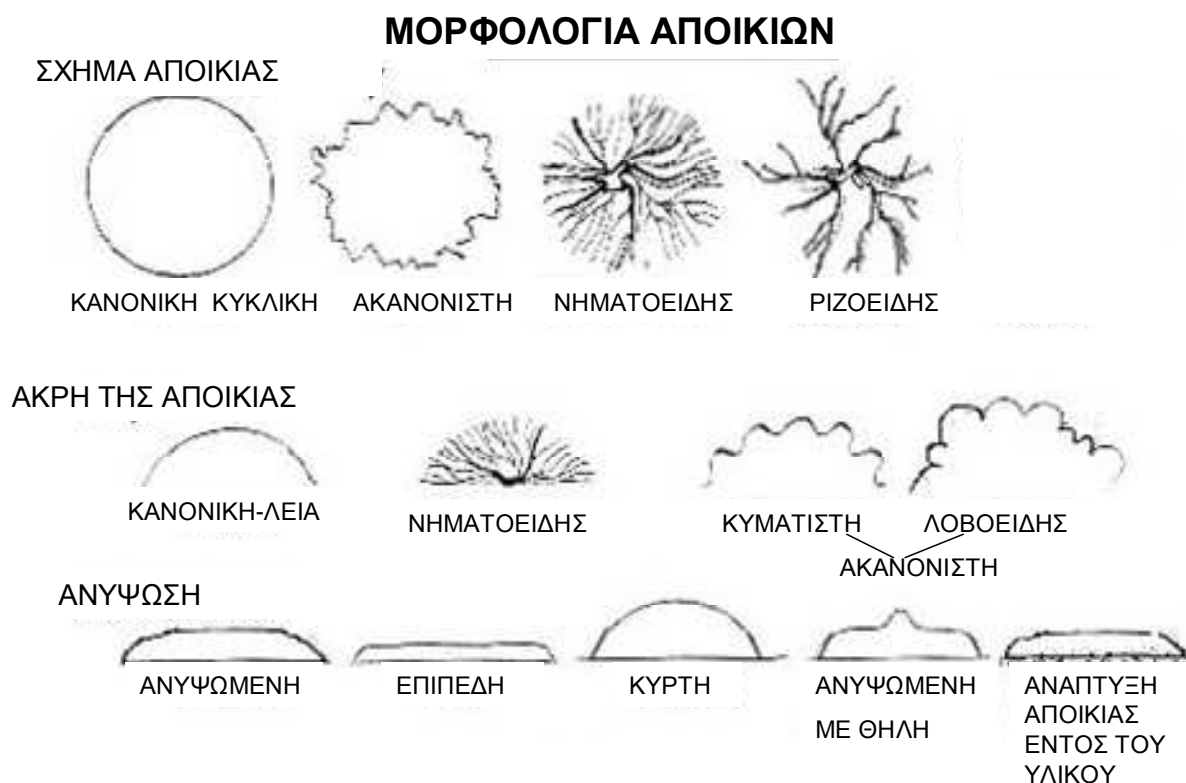
2.5 Οργανοληπτικά Χαρακτηριστικά

Η ποιότητα των δειγμάτων των γονάδων του αχινού σε ότι αφορά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά εκτιμήθηκε σύμφωνα με τη μυρωδιά και το χρώμα των γονάδων κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του στους 5°C και 20°C.

Πιο αναλυτικά, αξιολογήθηκε από πάνελ τριών κριτών η μυρωδιά και το χρώμα των γονάδων των αχινών. Η αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών έγινε με βάση τις ακόλουθες κατηγορίες: 1 (Άριστο), 2 (Αποδεκτό), 3 (Απαράδεκτο).

2.6 Ταυτοποίηση αποικιών

Οι αποικίες στα τρυβλία της έναρξης του πειράματος καθώς και στα τρυβλία των δειγμάτων της πρώτης και της τρίτης ημέρας αποθήκευσης στους 20°C και 5°C αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών. Οι αποικίες ομαδοποιήθηκαν με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, χρώμα, μέγεθος, σχήμα κτλ (Εικ. 3).

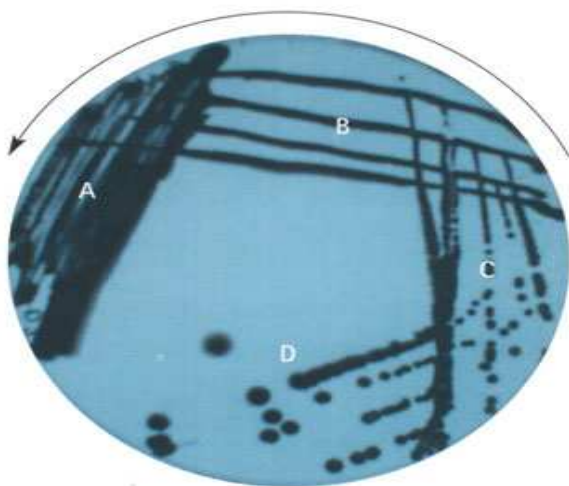


Εικόνα 3. Ομαδοποίηση των αποικιών με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά

Με την χρήση αποστειρωμένου ραβδίου λαμβάνονταν μικρή ποσότητα από τις επιλεγόμενες αποικίες και μεταφέρονταν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννέα

μιλιλίτρα Tryptone Soy Broth (TSB δεκαπέντε γρ. τρυπτόνη (tryptone), πέντε γρ. χλωριούχο νάτριο (sodium chloride), πέντε γρ. βακτηριολογική πεπτόνη (bacteriological peptone), ένα γρ. εκχύλισμα κρέατος (meat extract), δυο γρ. εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), δύομιση γρ. γλυκόζη (glucose ή dextrose), στα χίλια μιλίμετρα απιονισμένου νερού.

Κατόπιν τοποθετούνταν για επώαση στους 25°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, από κάθε ομάδα με τη μέθοδο γραμμωτής επίστρωσης (streaking) μεταφέρονταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε νέα τρυβλία TSA (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Μέθοδος γραμμωτής επίστρωσης. Α. Πυκνή γραμμωτή επίστρωση, Β. Διαδοχική λιγότερο πυκνή επίστρωση, C. Διαδοχική αραιή επίστρωση, D. Διαδοχική πιο αραιή επίστρωση (Sharipo, 2007)

Τα τρυβλία αυτά μεταφέρθηκαν για επώαση στους 25°C για 48-72 ώρες. Αφού επώαστηκαν, πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω δοκιμές για την ταυτοποίηση τους:

1. Χρώση Gram, σχήμα του μικροβιακού κυττάρου (κόκκος, βάκιλος κτλ) και παρουσία σπορίων (Harrigan & McCance 1976).
2. Δοκιμή της οξειδάσης (Harrigan & McCance 1976).

3. Δοκιμή της καταλάσης (Harrigan & McCance 1976).
4. Δοκιμή αερόβιου και αναερόβιου μεταβολισμού της γλυκόζης σε Hugh and Leifson medium (Hugh & Leifson 1953)
5. Ικανότητα κίνησης (Harrigan & McCance 1976).
6. Μετατροπή του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης σε τριμεθυλαμίνη και παραγωγή υδρόθειου, σύμφωνα με Gram et al. (1987).

Περιγραφή δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν

2.6.1 Χρώση Gram, σχήμα του μικροβιακού κυττάρου (κόκκος, βάκιλος κτλ) και παρουσία σπορίων

Από τις ανανεωμένες και καθαρές αποικίες σε θρεπτικό υλικό, επιλέγονταν μια αποικία και υπό ασηπτικές συνθήκες προσηλωνόταν πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα με τη βοήθεια του εργαστηριακού λύχνου Bunsen και στη συνέχεια ακολουθούσε χρώση. Τα βακτήρια διακρίνονται ανάλογα με την αντίδραση τους στη χρώση σε Gram(-), τα βακτήρια τα οποία εμφάνιζαν χρώμα ροζ και σε Gram(+), βακτήρια τα οποία εμφάνιζαν χρώμα μπλε προς μωβ. Η διαφορετική χρώση οφείλεται στην διαφορετική δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος. Η μικροσκοπική παρατήρηση γίνεται με την βοήθεια μικροσκοπίου φωτεινού πεδίου. Μέσα από τη μικροσκοπική παρατήρηση για την χρώση Gram παρατηρείται και το σχήμα του μικροβιακού κυττάρου αν είναι δηλαδή κόκκος, βάκιλος ή κοκκο-βάκιλος.

Διαδικασία

- Σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετείται δείγμα από αποικίες που είναι το λιγότερο εικοσιτέσσερις και το περισσότερο εβδομήντα δυο ωρών.
- Η αντικειμενοφόρος πλάκα ξεπλένεται με διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet) για ενα-δυο λεπτά.

- Καθαρίζεται προσεκτικά με απιονισμένο νερό και γίνεται προσθήκη διαλύματος ιωδίου Lugol για ένα λεπτό.
- Αφαιρείται το διάλυμα, γίνεται προσεκτικό στέγνωμα και ξεπλένεται με αιθανόλη 95%.
- Στη συνέχεια η αποικία ξεπλένεται με διάλυμα σαφρανίνης για είκοσι δευτερόλεπτα.
- Ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και ακολουθεί προσεκτικό στέγνωμα της πλάκας.
- Κατόπιν μεταφέρεται στο μικροσκόπιο και παρατηρείται το αποτέλεσμα της χρώσης.

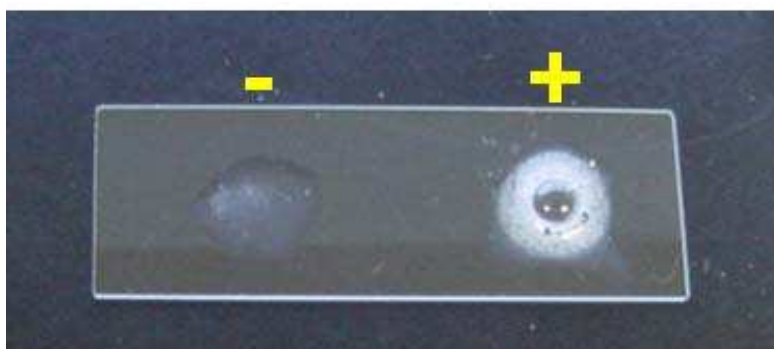
2.6.2 Δοκιμή της οξειδάσης

Η δοκιμή αυτή είναι πολύ χρήσιμη στο διαχωρισμό αερόβιων βακτηρίων. Χρησιμοποιήθηκε διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με διάλυμα 1% w/v τετραμεθυλο-πφαινυλενοδιαμίνης και 0.1% ασκορβικό οξύ το οποίο ανιχνεύει το ένζυμο κυτόχρωμα της οξειδάσης (Harrigan and McCance, 1976). Με τη βοήθεια αποστειρωμένου ραβδίου μεταφέρονταν μικρή ποσότητα μάζας από την εξεταζόμενη αποικία στο διηθητικό χαρτί το οποίο έχει εμποτιστεί με το αντιδραστήριο οξειδάσης και γίνεται επίχρισμα.. Η θετική αντίδραση ολοκληρώνεται σε δέκα-δεκαπέντε δευτερόλεπτα και οδηγεί σε ανάπτυξη ιώδους χρώματος, ενώ στην αρνητική αντίδραση δεν εκδηλώνεται μεταβολή του χρώματος. Η παραγωγή ιώδους χρώματος συνεπάγεται παρουσία στην κυτταρική μεμβράνη του ενεργού κυτοχρώματος c .

2.6.3 Δοκιμή της καταλάσης

Η καταλάση είναι ένζυμο το οποίο μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε οξυγόνο και νερό, γι'αυτό την παράγουν οι αερόβιοι μικροοργανισμοί προκειμένου να προστατευτούν από το τοξικό υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι οξειδωτικός παράγοντας ο οποίος μπορεί να καταστρέψει ένα κύτταρο. Γι'αυτό κάθε κύτταρο αερόβιο πρέπει να αποβάλλει το υπεροξείδιο του υδρογόνου και αυτό γίνεται με τη δράση του ενζύμου καταλάση.

Για την δοκιμή, μεταφέρεται ποσότητα από την αποικία με βακτηριολογικό κρίκο μέσα σε σταγόνα διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου 3% που είχε τοποθετηθεί πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η απελευθέρωση αερίου οξυγόνου με τη μορφή αφρού σηματοδοτεί την παρουσία ένζυμου καταλάσης στα κύτταρα που εξετάζονται (Harrigan and McCance, 1976) (Εικ.5).



Εικόνα 5. Δοκιμή της καταλάσης

2.6.4 Δοκιμή αερόβιου και αναερόβιου μεταβολισμού της γλυκόζης σε Hugh and Leifson medium

Χρησιμοποιήθηκε η τροποποιημένη μορφή του μέσου καλλιέργειας των Hugh και Leifson (1953) [Σύνθεση: Πεπτόνη (peptone) 0.2 γρ, χλωριούχο νάτριο (NaCl) 0.5 γρ, K_2HPO_4 , 0.03 γρ, άγαρ (agar), 0.3 γρ, μπλε της βρωμοθυμόλης (bromthymol blue) 0.003 γρ, γλυκόζη 1.0 γρ ανά χίλια मिलीτρα απιονισμένου νερού. Τελικό pH 7.1]. Σε

δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε το αποστειρωμένο ημιστερεό μέσο καλλιέργειας των Hugh και Leifson , εμβολιάστηκε η κάθε αποικία με την βακτηριολογική βελόνα και σε κάθετη φορά. Η επώαση έγινε στους 25°C για δυο-επτά ημέρες. Οι παρατηρήσεις που προκύπτουν από το μέσο αυτό έχουν ως εξής:

-Οξειδωτικός μεταβολισμός: Η μεταβολή του αρχικού πρασίνου χρώματος του δείκτη σε πορτοκαλοκίτρινο, στην επιφάνεια του σωλήνα, αποτελεί ένδειξη του οξειδωτικού χαρακτήρα της εξεταζόμενης αποικίας.

-Ζυμωτικός μεταβολισμός: Συμβαίνει η ίδια χρωματική μεταβολή αλλά κατά μήκος όλου του σωλήνα . Η ένδειξη αυτή σηματοδοτεί τον ζυμωτικό μεταβολισμό των κυττάρων.

-Αλκαλική ή καμία μεταβολή: Η μεταβολή του αρχικού δείκτη είναι σε μπλε ή αμελητέα αντίστοιχα.

Η παραπάνω διαδικασία έγινε και με την προσθήκη στο δοκιμαστικό σωλήνα με το μέσο καλλιέργειας δυο μιλιέτρων αποστειρωμένου παραφινέλαιου μετά τον εμβολιασμό.

2.6.5 Ικανότητα κίνησης

Κατά τον κάθετο εμβολιασμό με την βακτηριολογική βελόνα εξετάστηκε αν υπήρχε ανάπτυξη ως προς το οριζόντιο επίπεδο κάτι που μαρτυρά ικανότητα κίνησης (Hugh and Leifson, 1953).

2.6.6 Μετατροπή του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (TMAO) σε τριμεθυλαμίνη (TMA) και παραγωγή υδρόθειου

Σύμφωνα με τους Gram et al. (1987), γίνεται κάθετος εμβολιασμός δοκιμαστικών σωλήνων με χρήση βακτηριολογικής βελόνας, που περιείχαν το κάτωθι

αποστειρωμένο ημιστερεό μέσο: είκοσι γρ. πεπτόνη (peptone), τρία γρ. εκχύλισμα κρέατος (meat extract), τρία γρ. εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), τέσσερα γρ. χλωριούχο νάτριο (NaCl), τέσσερα γρ. μονόξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4), 0.3γρ. κιτρικός σίδηρος (ferric citrate), 0.3γρ. θειοθειικό νάτριο (sodium thiosulphate), 0.3 γρ. L- κυστεΐνη, 0.5γρ. θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$), 0.01γρ. ρεσαζουρίνη (Resazurin), 4γρ. άγαρ, σε χίλια मिलίτρα απιονισμένου νερού και ρύθμιση του pH σε 6.8 . Η επώαση των δοκιμαστικών σωλήνων έγινε σε θερμοκρασία 25°C για τρεις-επτά ημέρες. Οι παρατηρήσεις που προκύπτουν είναι οι εξής:

-Η παρατήρηση της μετατροπής του TMAO σε TMA γίνεται με μεταβολή της χρωστικής του μέσου από ρόδινο σε κίτρινο (Εικ.6).

-Παραγωγή υδρόθειου από το θειοθειικό ή από την κυστεΐνη και παραγωγή θειώδους σιδήρου (μαύρο χρώμα).



Εικόνα 6. Δοκιμή μετατροπής του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (TMAO) σε τριμεθυλαμίνη (TMA).

Η ταξινόμηση των αποικιών σε γένος ή οικογένεια πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω δοκιμές, κατά Dainty et al. (1979) και Cowan (1993), καθώς και τη δοκιμή της μετατροπής του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης σε τριμεθυλαμίνη και παραγωγή υδρόθειου, για τον προσδιορισμό της *Shewanella putrefaciens*, σύμφωνα με

Gram et al. (1987). Επιπλέον, τα Gram αρνητικά τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως *Aeromonas/Vibrio* διαχωρίστηκαν με το string test (Keast & Riley 1997). Το “string test” χρησιμοποιείται σαν δοκιμή για τον διαχωρισμό των βακτηρίων *Vibrio* και *Aeromonas*. Δυο με τρεις αποικίες από κάθε τρυβλίο μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρο και εμποτίζονται με σταγόνα διαλύματος δεοξυχολικού νατρίου (sodium deoxycholate) 0.5%. Ως θετική αντίδραση θεωρείται η εμφάνιση κολλώδους μάζας η οποία στοιχίζεται σε γραμμή με τη βοήθεια βακτηριακής ράβδου. Ως αρνητική αντίδραση θεωρείται η μη εμφάνιση της κολλώδους μάζας. Τα αποτελέσματα της δοκιμής αυτής γίνονται εμφανή στο πρώτο λεπτό της ανάμιξης (Keast & Riley 1997).

Επιπλέον για επιβεβαίωση της ταυτοποίησης των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν και τα κάτωθι υποστρώματα:

- για τις ζύμες και μύκητες χρησιμοποιήθηκε το εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Rose Bengal Chloramphenicol Agar και επώαση στους 25 °C για σαράντα οκτώ-εβδομήντα δυο ώρες.
- για τους βάκιλους του γένους *Pseudomonas* χρησιμοποιήθηκε το Cetrimide Fusidin Cephaloridine Agar (CFC) με επώαση στους 20-25°C για σαράντα οκτώ-εβδομήντα δυο ώρες.
- για τους βάκιλους της οικογένειας Enterobacteriaceae χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Violet Red Bile Glucose Agar-VRBGA και επώαση στους 37 °C για εικοσιτέσσερις ώρες.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Οργανοληπτικές μεταβολές

Στους 5°C οι οργανοληπτικές αλλαγές συμβαίνουν με αργό ρυθμό. Οι γονάδες απορρίπτονται στις εξήντα δυο ώρες και αφού χαρακτηρίζονται απαράδεκτες και στις δυο παραμέτρους (μυρωδιά και χρώμα) (Πίν. 1). Αντίθετα στους 20°C, οι οργανοληπτικές αλλαγές είναι ταχύτερες. Οι γονάδες απορρίπτονται σε μικρότερο χρόνο (εικοσιτέσσερις ώρες) εξαιτίας της δυσάρεστης οσμής τους ενώ το χρώμα τους παραμένει ακόμα σε αποδεκτό επίπεδο (Πίν. 2). Το δείγμα παρουσίασε έντονη αλλαγή χρώματος από κόκκινο-πορτοκαλί σε κίτρινο-καφέ προς το πέρας της δεύτερης ημέρας (σαράντα δυο ώρες).

Πινάκας 1. Οργανοληπτική εκτίμηση των γονάδων κατά την αποθήκευσή της στους 5°C

Χρόνος Συντήρησης (ώρες)	Χρώμα	Οσμή
0	άριστο	άριστο
16	άριστο	άριστο
24	αποδεκτό	αποδεκτό
36	αποδεκτό	αποδεκτό
42	αποδεκτό	αποδεκτό
52	αποδεκτό	αποδεκτό
62	απαράδεκτο	απαράδεκτο

Πινάκας 2. Οργανοληπτική εκτίμηση των γονάδων κατά την αποθήκευσή της στους 20°C

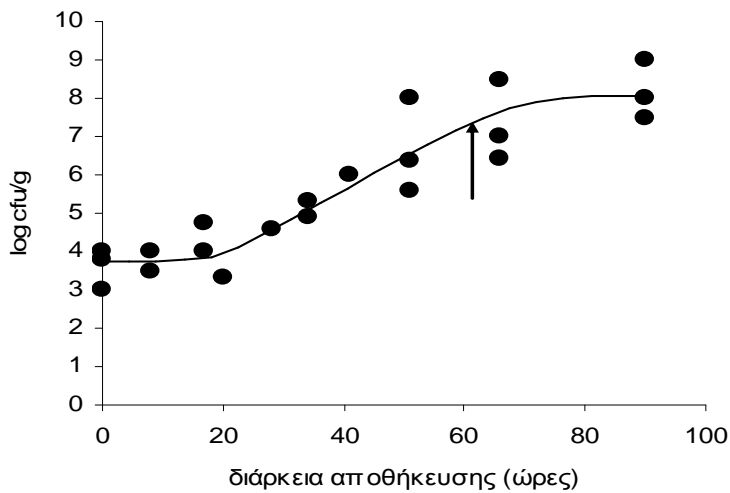
Χρόνος Συντήρησης (ώρες)	Χρώμα	Οσμή
0	άριστο	άριστο
16	αποδεκτό	αποδεκτό
24	αποδεκτό	απαράδεκτο
36	απαράδεκτο	απαράδεκτο
42	απαράδεκτο	απαράδεκτο

3.2 Επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης στη μεταβολή της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (OMX) και στο χρόνο αλλοίωσης των γονάδων του αχινού

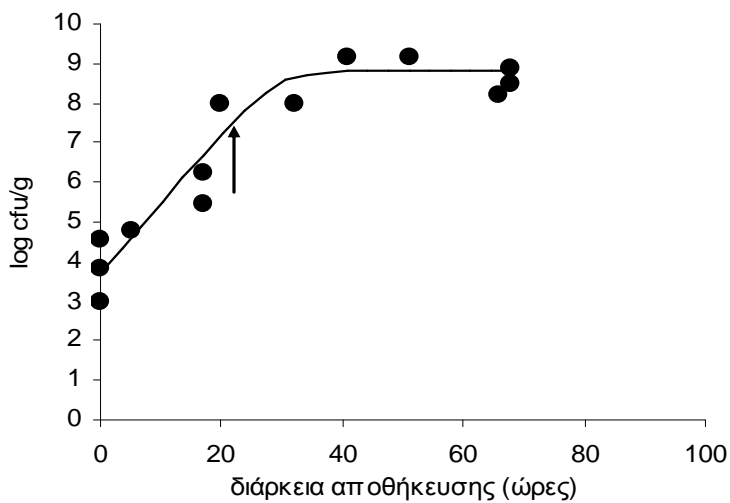
Ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός των γονάδων του αχινού ήταν της τάξης των 10^4 cfu/ gr (αποικίες μικροοργανισμών ανά γραμμάριο γονάδων). Από τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των αποικιών διαπιστώθηκε ότι το δείγμα που ήταν αποθηκευμένο στους 5°C παρουσίασε μικρότερη ταχύτητα μικροβιακής αύξησης σε σχέση με το δείγμα αποθηκευμένο στους 20°C .

Συγκεκριμένα, στο δείγμα που ήταν αποθηκευμένο στο ψυγείο στους 5°C , παρουσίασε φάση προσαρμογής περί της εικοσιτέσσερις ώρες και κατόπιν σημαντική μικροβιακή ανάπτυξη με αποτέλεσμα την δεύτερη ημέρα της αποθήκευσης ο πληθυσμός να είναι της τάξεως των 10^6 cfu/ gr (Σχ. 1) ενώ άρχισε και να παρουσιάζεται σχετική αλλοίωση της οσμής του προϊόντος. Ο μικροβιακός πληθυσμός στους 20°C δεν παρουσίασε φάση προσαρμογής (Σχ. 2) και αναπτύχθηκε ταχύτατα φθάνοντας το επίπεδο των 10^7 cfu/ gr εντός εικοσιτεσσάρων ωρών.

Παρακάτω δίδεται πίνακας με τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και τη διάρκεια φάσης προσαρμογής (Πιν. 3). Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης αυξάνεται ενώ αυξάνεται η θερμοκρασία, (0.175 h^{-1} στους 20°C και 0.087 h^{-1} τους 5°C .) ενώ μειώνεται η διάρκεια της φάσης προσαρμογής, καθώς είναι περίπου είκοσι ώρες στους 5°C , ενώ μηδενίζεται στους 20°C .



Σχήμα 1. Μεταβολή και καμπύλη ανάπτυξης του ολικού μικροβιακού πληθυσμού των γονάδων του αχινού αποθηκευμένου στους 5 °C. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων. Για την προσαρμογή των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση του Baranyi (Baranyi et al. 1993). Το βέλος υποδεικνύει το επίπεδο αλλοίωσης δηλαδή το μέγεθος του μικροβιακού πληθυσμού στο σημείο της οργανοληπτικής απόρριψης του προϊόντος



Σχήμα 2. Μεταβολή και καμπύλη ανάπτυξης του ολικού μικροβιακού πληθυσμού των γονάδων του αχινού αποθηκευμένου στους 20 °C. Για την προσαρμογή των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση του Baranyi (Baranyi et al. 1993). Το βέλος υποδεικνύει το επίπεδο αλλοίωσης δηλαδή το μέγεθος του μικροβιακού πληθυσμού στο σημείο της οργανοληπτικής απόρριψης του προϊόντος.

Πίνακας 3. Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, διάρκεια φάσης προσαρμογής και μέγιστος πληθυσμός της ολικής μικροβιακής χλωρίδας σε TSA των γονάδων του αχινού αποθηκευμένων στους 5 και στους 20°C.

θερμοκρασία αποθήκευσης	μ_{\max} (1/h)	διάρκεια φάσης προσαρμογής (h)	αρχικός πληθυσμός (log cfu/g)	μέγιστος πληθυσμός (log cfu/g)	standard error of fit	R ²
5°C	0.0868	18.7	3.75	8.06	0.404	0.942
20°C	0.1758	----	3.72	8.81	0.867	0.842

Ο χρόνος ζωής του προϊόντος (ο χρόνος ζωής συμπίπτει με τη χρονική στιγμή της οργανοληπτικής απόρριψης) στους 5°C, υπολογίστηκε περίπου στις εξήντα δυο ώρες με το επίπεδο αλλοίωσης, το μέγεθος δηλαδή του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού στο σημείο απόρριψης του προϊόντος, να είναι περί τους επτά λογάριθμους (Σχ. 1, Πίν. 4) Το προϊόν κατέστη ανεπιθύμητο λόγω ανάπτυξης δυσάρεστων οσμών και αλλοίωσης του χρώματος του και της όψης του.

Ο χρόνος ζωής του προϊόντος στους 20°C, υπολογίστηκε στις εικοσιτέσσερις ώρες (Σχ. 2, Πίν. 4) με το επίπεδο αλλοίωσης να είναι περίπου στους επτά λογάριθμους. Το προϊόν κατέστη ανεπιθύμητο λόγω ανάπτυξης κυρίως δυσάρεστων οσμών

Πίνακας 4. Χρόνος αλλοίωσης των γονάδων του αχινού και επίπεδο αλλοίωσης.

Θερμοκρασία Αποθήκευσης	Χρόνος αλλοίωσης γονάδων (ώρες)	Επίπεδο αλλοίωσης γονάδων (log cfu/gr)
5°C	62	6.7
20°C	24	7.4

3.3 Μεταβολή του pH στις γονάδες του αχινού

Το pH του δείγματος στους 5°C (Πίν. 5) την πρώτη ημέρα του πειράματος ήταν 6.95 βαθμούς της κλίμακας pH ενώ τις επόμενες ημέρες κυμάνθηκε μεταξύ 6.7-6.05. Το

pH του δείγματος στους 20°C την πρώτη ημέρα ήταν 6.95 και τις επόμενες ημέρες έγινε ελαφρά όξινο καθώς κυμάνθηκε από 6.04 έως 5.5 βαθμούς στην κλίμακα pH. Η μεταβολή του pH των γονάδων ήταν ταχύτερη κατά την αποθήκευση στις υψηλές παρά στις χαμηλές θερμοκρασίες.

Πίνακας 5. Μεταβολή του pH των γονάδων του αχινού στους 5°C

Χρόνος (ώρες)	Αποθήκευσης	pH 5°C	pH 20°C
0		6.95	6.95
17		6.7	6.04
28		6.58	6.06
34		6.67	5.78
41		6.58	5.58
51		6.18	5.76
68		6.05	5.5

3.4 Ταυτοποίηση αποικιών

Τα γένη των μικροοργανισμών που ανιχνεύθηκαν ως κυρίαρχη αρχική μικροχλωρίδα των γονάδων του αχινού εικονίζονται στον Πίνακα 6 και στο Γράφημα 3. Ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός κυριαρχείται από βάκιλλους, *Gram* θετικούς κυρίως του γένους *Bacillus*, αλλά και από *Gram* αρνητικούς ψυχρότροφους όπως αυτοί των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* και *Alcaligenes*. *Gram* θετικοί κόκκοι του γένους *Micrococcus*, απαντώνται σε μικρότερο ποσοστό (Πιν. 6). Οι *Gram* αρνητικοί μικροοργανισμοί καταλαμβάνουν ποσοστό της τάξης του 37,2% των

μικροοργανισμών της αρχικής χλωρίδας. Σε αντίθεση με τα *Gram* θετικά βακτήρια που απαντώνται σε ποσοστό 62,8%.

Η μικροχλωρίδα αλλοίωσης των γονάδων του αχινού συντηρημένου υπό ψύξη (5°C) αποτελείται εξ'ολοκλήρου από *Gram* αρνητικούς ψυχρότροφους βακίλλους των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* και *Alcaligenes*. Η σύνθεση της μικροχλωρίδας παρουσιάζεται τον Πίνακα 7 καθώς και στο Σχήμα 4. Η σύνθεση της μικροχλωρίδας στους 5 °C βρέθηκε ότι αποτελείται σε ποσοστό 100% από αρνητικά κατά *Gram* βακτήρια.

Η σύνθεση της μικροχλωρίδας των γονάδων του αχινού αποθηκευμένου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20°C) στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής του παρουσιάζονται στον Πίνακα 8 καθώς και στο Σχήμα 5. Ο μικροβιακός πληθυσμός αλλοίωσης κυριαρχείται από βάκιλλους *Gram* αρνητικούς της οικογένειας *Enterobacteriaceae* αλλά και θετικούς του γένους *Bacillus* και *Micrococcus*. Σε μικρότερα ποσοστά απαντώνται μικρόκοκκοι, αλλά και *Gram* αρνητικοί βάκιλλοι του γένους *Aeromonas*. Τα *Gram* θετικά βακτήρια απαντώνται στους 20 °C σε ποσοστό 50,9% ενώ τα αρνητικά κατά *Gram* σε ποσοστό 49,1%.

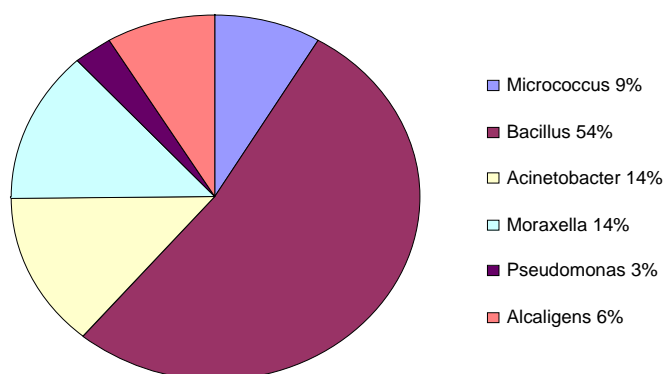
Πίνακας 6. Σύνθεση της αρχική μικροχλωρίδας των γονάδων του αχινού.

Γένος	αριθ. αποικιών	σχήμα	χρώση Gram	κίνηση	καταλάση	οξειδάση	μεταβολή γλυκόζης	TMAO/H ₂ S	% επί του πληθυσμού στο τρυβλίο
<i>Micrococcus</i>	3	κόκκοι	+	-	+	+	O ^β	- / -	9
<i>Bacillus</i>	19	βακιλλοι	+	+/- ^α	+	+/- ^α	F ^γ	- / -	54
<i>Acinetobacter</i>	5	βακιλλοι	-	-	+	-	O	- / -	14
<i>Moraxella</i>	5	βακιλλοι	-	-	+	+	- ^δ	- / -	14
<i>Pseudomonas</i>	1	βακιλλοι	-	+	+	+	O	- / -	3
<i>Alcaligenes</i>	2	βακιλλοι	-	+	+	-	- ^δ	- / -	6

α: διαφορετική αντίδραση από τις αποικίες που δοκιμάστηκαν.

β: οξειδωτικός μεταβολισμός.

γ: ζυμωτικός μεταβολισμός, δ: δεν υπήρξε μεταβολή.



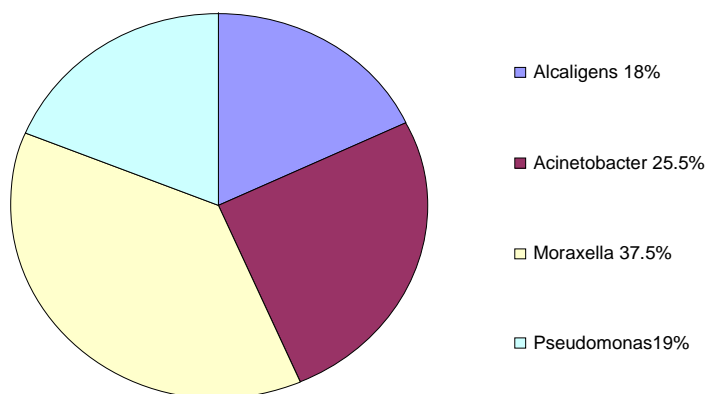
Σχήμα 3. Σύνθεση της αρχικής μικροχλωρίδας των γονάδων του αχινού.

Πίνακας 7. Σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού των γονάδων του αχινού σε συντήρηση στους 5°C στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.

Γένος	αριθ. αποικιών	σχήμα	χρώση Gram	κίνηση	καταλάση	οξειδάση	μεταβολή γλυκόζης	TMAO/H ₂ S	% επί του πληθυσμού στο τρυβλίο
<i>Acinetobacter</i>	34	βακιλλοί	-	-	+	-	O ^β	- / -	25.5
<i>Moraxella</i>	50	βακιλλοί	-	-	+	+	- ^α	- / -	37.5
<i>Pseudomonas</i>	25	βακιλλοί	-	+	+	+	O ^β	- / -	19
<i>Alcaligenes</i>	24	βακιλλοί	-	+	+	-	- ^δ	- / -	18

β: οξειδωτικός μεταβολισμός.

δ: δεν υπήρξε μεταβολή



Σχήμα 4. Σύνθεση της μικροχλωρίδας των γονάδων του αχινού σε αποθήκευση στους 5 °C στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.

Πίνακας 8. Σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού των γονάδων του αχινού σε συντήρηση στους 20°C στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.

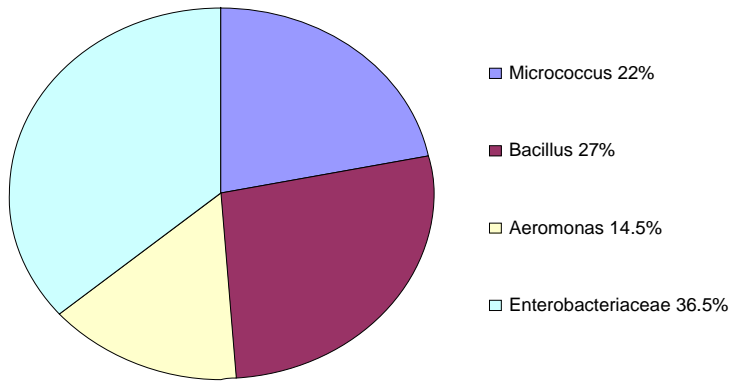
Γένος	αριθ. αποικιών	σχήμα	χρώση Gram	κίνηση	κατα-λάση	οξει-δάση	μεταβολή γλυκόζης	TMAO/H ₂ S	% επί του πληθυσμού στο τρυβλίο
<i>Aeromonas</i> *	8	βακιλλοι	-	+	+	+	F	+ / +	14.5
Enterobacteriaceae	20	βακιλλοι	-		+	-	F	+ / +	36.5
<i>Bacillus</i>	15	βακιλλοι	+	+/- ^α	+	+/- ^α	F/O ^α	- / -	27
<i>Micrococcus</i>	12	κοκκοι	+	-	+	+	-	- / -	22

α: διαφορετική αντίδραση από τις αποικίες που δοκιμάστηκαν

β: οξειδωτικός μεταβολισμός.

γ: ζυμωτικός μεταβολισμός.

* διαχωρισμός από το γένος *Vibrio* με το string test (Keast and Riley 1997).



Σχήμα 5. Σύνθεση της μικροχλωρίδας των γονάδων του αχινού σε αποθήκευση στους 25 °C στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τα βιολογικά συστήματα, καθώς από αυτή εξαρτώνται φυσικοχημικές ιδιότητες των μικροοργανισμών. Στους μικροοργανισμούς η θερμοκρασία επιδρά άμεσα επηρεάζοντας το ρυθμό ανάπτυξης, τις μεταβολικές τους δραστηριότητες, τη χημική σύσταση των βιολογικών τους δομών, καθώς και την ικανότητα δέσμευσης και μεταφοράς ουσιών μέσω της κυτταρικής τους μεμβράνης (Gould 1988).

Η θερμοκρασία αποθήκευσης φαίνεται να έχει καταλυτικό ρόλο στον εμπορικό χρόνο ζωής του αχινού. Έρευνες έχουν δείξει ότι η αποθήκευση υπό ψύξη αποτελεί σημαντική μέθοδο συντήρησης για τα εχινοειδή. Οι χαμηλές θερμοκρασίες επιβραδύνουν την ενζυμική δραστηριότητα και καθυστερούν ή παρεμποδίζουν την αύξηση των μικροοργανισμών (De la Cruz-Garcia et al. 2000).

Τα αποτελέσματα μας συμπίπτουν με τα αποτελέσματα και τις διαπιστώσεις άλλων ερευνητών σχετικά με την αλλοίωση των αλιευμάτων γενικότερα (Dalgaard et al. 1993, Tryfinopoulou et al. 2002). Οι γονάδες του αχινού αποτελούν εξαιρετικά ευαλλοίωτο προϊόν, με μικρό εμπορικό χρόνο ζωής ακόμη και σε συντήρηση υπό ψύξη.

Συγκεκριμένα, στους 5°C οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν φάση προσαρμογής και μικρότερο ρυθμό αύξησης οπότε η αλλοίωση του προϊόντος παρουσιάζεται μετά τις εξήντα ώρες. Οι μικροοργανισμοί στρεσάρονται και θέλουν περισσότερο χρόνο για να αρχίσουν την εκθετική αύξηση τους. Η χαμηλή θερμοκρασία μειώνει τις βιοχημικές δραστηριότητες (Ashie et al. 1996). Όπως παρουσιάστηκε σε έρευνα για τον μπακαλιάρο (Olley and Lovern 1960), η χαμηλή θερμοκρασία είναι αυτή που επιβραδύνει την πρωτεϊνική διάσπαση και την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων, διαδικασίες που επιταχύνουν την αλλοίωση. Η προοδευτική μείωση των βιοχημικών

και μικροβιακών δραστηριοτήτων σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι αυτό που συνέβαλε στην μέθοδο των χαμηλών θερμοκρασιών ως σημαντική μέθοδο συντήρησης (Olley and Ratkowsky 1973).

Οι χαμηλές θερμοκρασίες παρατείνουν τους ρυθμούς αύξησης των μικροοργανισμών και επιπλέον παίζουν σημαντικό ρολό στον χρόνο που χρειάζονται για να αναπτυχθούν. Αυτό έχει σημαντική επίδραση στον ρυθμό αλλοίωσης των γονάδων του αχινού. Στα ψάρια που αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (0-5°C), η μικροβιακή δραστηριότητα γίνεται πιο αργά, καθυστερεί αλλά δεν αναστέλλει την αλλοίωση των ψαριών (Rodriguez-Jerez et al. 1994).

Ο αριθμός των βακτηρίων στο σημείο απόρριψης των γονάδων (10^7 cfu) στους 5°C είναι ίδιος και με άλλες έρευνες σε ψάρια και προϊόντα ψαριών (Huss et al., 1997). Αυτό επισημαίνει την κοινή ιδέα ότι η ενζυματική δράση είναι πιο αποτελεσματική και ταχύτερη στις χαμηλές θερμοκρασίες (Hurtado et al. 1998).

Σε έρευνα που αφορά τον χρόνο ζωής του μυϊκού ιστού της γόπας αποθηκευμένη σε χαμηλές θερμοκρασίες, αυτός κυμάνθηκε στις εξήντα ώρες στους 7°C (Koutsoumanis and Nychas 1999). Το αποτέλεσμα διαφέρει σε σχέση με τη δική μας έρευνα, ο χρόνος αλλοίωσης των γονάδων αποθηκευμένων στους 5°C ήταν εξήντα ώρες. Συμπεραίνεται έτσι ότι οι γονάδες είναι πιο ευαίσθητο προϊόν από τον μυϊκό ιστό της γόπας με γρηγορότερο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (ειδικός ρυθμός ανάπτυξης βακτηρίων της γόπας $\mu_{\max} = 0,064$ και για τις γονάδες του αχινού $\mu_{\max} = 0,0868$).

Στους 20°C η αλλοίωση εμφανίζεται μετά από είκοσι ώρες. Οι υψηλές θερμοκρασίες και γενικά η θερμοκρασία ασκούν σημαντικό ρολό στον εμπορικό χρόνο ζωής του αχινού. Οι Gram et al. (1987), στην έρευνα τους διαπίστωσαν την αλλοίωση δειγμάτων μυϊκού ιστού του μπακαλιάρου, τα οποία ήταν αποθηκευμένα

στους 20°C, σε εικοσιτέσσερις ώρες. Από τα αποτελέσματα παρόμοιου πειράματος που διεξήχθη σε συγγενικό είδος αχινού (*Echinus esculentus*), τα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στους 20°C αλλοιώθηκαν σε λιγότερες από τριάντα ώρες (Unkles 1977).

Η αλλοίωση είναι αποτέλεσμα παραγωγής οσμών και γεύσεων προκαλούμενα από τον βακτηριακό μεταβολισμό. Συνήθως όμως δεν υπάρχει συσχέτιση του ολικού αριθμού βακτηρίων με την αλλοίωση. Εκτός αν ένα κλάσμα της ολικής χλωρίδας συμμετέχει στην αλλοίωση (Gram and Huss 1996). Κάποιες ομάδες ερευνητών τόνισαν την αναγκαιότητα καταμέτρησης διαφορών ομάδων βακτηρίων σε αντίθεση με την καταμέτρηση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας που χρησιμοποιούνταν ευρέως. Οι Valle et al. (1998) απέδειξαν ότι οι καλύτερες συνθήκες για να καταμετρηθεί η ολική μικροβιακή χλωρίδα στα ψάρια είναι η παρουσία οξυγόνου, η χρήση θρεπτικού μέσου TSA με 1.5% NaCl σε επώαση για δυο-τέσσερις ημέρες. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε και για την διεξαγωγή της παρούσας έρευνας. Όμως είναι ανάγκη να βρεθούν τεχνικές πιο γρήγορες και εξελιγμένες ώστε να αποφευχθεί η πολύωρη αναμονή για την εξαγωγή αποτελεσμάτων καθώς και για να αντιμετωπιστούν σε σύντομο χρονικό διάστημα τα ψάρια που είναι εξαιρετικά ευαλλοίωτο προϊόν (Rodriguez-Jerez et al. 1994).

Το pH επηρεάζει την αλλοίωση λόγω της επίδρασής του στην μικροβιακή και ενζυμική δραστηριότητα. Το pH μετά τον θάνατο των ψαριών αλλά και κάποιων θαλασσινών μειώνεται συνήθως σε 5,5 έως 6,5 λόγω του γαλακτικού οξέος που παράγεται. Η μείωση του pH επηρεάζει την ποιότητα με ποικίλους τρόπους. Παραδείγματος χάριν, όταν γίνονται μεγάλες συλλήψεις τόνου και αυτά υποφέρουν από έλλειψη οξυγόνου, ο επόμενος επίμονος αγώνας πριν από το θάνατο τους μπορεί να προκαλέσει την συστολή στο μυ. Η δυσκολία της γρήγορης ψύξης τέτοιων

μεγάλων ειδών ψαριών οδηγεί στα συμπτώματα του καμένου τόνου, ο οποίος εμφανίζει χλωμό καφετί χρώμα ή θολό. Οδηγεί επίσης σε μαλακή σύσταση και ξινή γεύση (Davie P.S and Sparksman R.I. 1986). Παρόμοιες έρευνες για την μείωση του pH έχουν αναφερθεί και για άλλα είδη ψαριών (Haard 1992).

Η αύξηση του pH είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στην πρωτεολυτική δράση των διαφόρων αλλοιογόνων μικροοργανισμών με την επακόλουθη παραγωγή βασικών παραπροϊόντων (Dainty 1996). Παρόλο αυτά σημαντική αλλαγή συμβαίνει αρκετά αργότερα από την χρονική στιγμή απόρριψης του προϊόντος και κατά συνέπεια δεν μπορεί η μεταβολή του pH να αποτελέσει φυσικοχημικό δείκτη αλλοίωσης του προϊόντος. Στην παρούσα έρευνα παρατηρήθηκε μείωση του pH. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην παραγωγή οξέων από τον μεταβολισμό των μικροοργανισμών, όμως η μέτρηση της παραγωγής διαφόρων μεταβολιτών δεν ήταν αντικείμενο της παρούσης έρευνας.

Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι υπό κανονικές συνθήκες η ενδογενής χλωρίδα των αλιευμάτων από εύκρατα κλίματα κυριαρχείται από Gram αρνητικούς βακίλους. Οι βάκιλοι αυτοί κατά κανόνα ανήκουν στα γένη, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio* και *Aeromonas* καθώς και Gram θετικούς οργανισμούς όπως *Bacillus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, και *Clostridium*. Γενικότερα η αναλογία των Gram αρνητικών και Gram θετικών βακτηρίων ποικίλει. Γενικά τα κατά Gram θετικά βακτήρια κυμαίνονται από 0-30% της συνολικής χλωρίδας (ICMSF 2000, Huss 1995).

Τα αποτελέσματά μας είναι πολύ κοντά αυτά που έχουν ήδη αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Βρέθηκαν Gram αρνητικοί βάκιλοι που ανήκουν στα γένη, *Pseudomonas*, *Moraxella*, κτλ καθώς και Gram θετικά βακτήρια όπως *Bacillus*, *Micrococcus*, αλλά σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% της συνολικής μικροβιακής

χλωρίδας, σε σχέση με το 0-30% της βιβλιογραφίας. Δεν βρέθηκε στην αρχική μικροχλωρίδα ή στην χλωρίδα αλλοίωση υπό ψύξη *Shewanella putrefaciens*, σε αντίθεση με τους ιχθύες (Gram et al. 1987, Gram and Huss 1996). Εξάλλου, η σύνθεση της φυσικής μικροχλωρίδας των αλιευμάτων εξαρτάται πάρα πολύ από το περιβάλλον αλίευσης (ICMSF 2000, Huss 1995).

Τα περισσότερα εκ των Gram αρνητικών βακτηρίων συνδέονται με χαλασμένες γονάδες και δυσάρεστες οσμές οι οποίες προέρχονται από το εντερικό σύστημα του αχινού (Kajikazawa et al. 2007). Πολλά από αυτά αποτελούν ξενιστές του εντερικού σωλήνα των ψαριών και είναι παθογόνα των ψαριών (Κοτζεκίδου-Ρουκά 2002).

Όσον αφορά τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια η παρούσα έρευνα βρήκε στην αρχική μικροχλωρίδα βακτήρια του γένους *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas* και *Alcaligenes*.

Σε αχινούς του δυτικού Ατλαντικού και ανατολικού Ειρηνικού διαπιστώθηκε η ύπαρξη των παραπάνω γενών των βακτηρίων αλλά επίσης και βακτήρια του γένους *Flavobacterium*, *Vibrio* και *Aeromonas*. Αυτό οφείλεται στη μόλυνση των υδάτων των περιοχών αυτών καθώς και ότι τα βακτήρια αυτά είναι φυσικοί κάτοικοι των θαλασσιών αυτών περιβαλλόντων (Bauer and Agerter 1994).

Σε διάφορες μελέτες οι κύριοι μικροοργανισμοί που βρέθηκαν στα γένη *Pseudomonas* και *Vibrio* και σε πολύ μικρότερα ποσοστά *Aeromonas* και *Flavobacterium* (Unkles 1977). Στην δική μας έρευνα δεν βρέθηκαν βακτήρια αυτών των στελεχών (*Aeromonas* και *Flavobacterium*) και αυτό οφείλεται στην διαφορετικότητα του περιβάλλοντος απ' όπου συλλέχτηκαν οι αχινόι. Η έρευνα του Unkles (1997) αναφέρεται στα νερά της θάλασσας της Σκωτίας (17°C το καλοκαίρι και 6°C τον χειμώνα), κάτι που έρχεται σε αντίθεση με το υδάτινο περιβάλλον

συλλογής των αχινών της έρευνας (Παγασητικός κόλπος-27.4°C το καλοκαίρι και 12.5°C τον χειμώνα).

Τα κατά Gram θετικά βακτήρια από την παρούσα έρευνα είναι τα γένη *Bacillus* και *Micrococcus*. Τα βακτήρια του γένους *Bacillus* είχανε και το μεγαλύτερο ποσοστό και από τα αρνητικά και θετικά βακτήρια κατά Gram με ποσοστό σχεδόν 50% στην αρχική μικροχλωρίδα αλλά και περίπου 30% στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής. Τα περισσότερα είναι μεσόφιλα αλλά υπάρχουν θερμόφιλα και ψυχρότροφα στελέχη (Κοτζεκίδου-Ρουκά 2002).

Οι Kajikazawa et al. (2007) σε έρευνα που έκαναν για την ανίχνευση βακτηρίων σε γονάδες φρέσκου αχινού με τη μέθοδο ριβοσωμικής DNA ανάλυσης 16S διαπίστωσαν την ύπαρξη μεγάλου ποσοστού *Pseudomonas* καθώς και πέντε νέα είδη βακτηρίων *Arthrobacter*, *Marinomonas*, *Pseudomonas* και *Shewanella*.

Έχει διαπιστωθεί από πολλούς ερευνητές ότι η αποθήκευση των νωπών αλιευμάτων σε ψύξη μετά την αλίευσή τους, παρέχει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη ψυχρότροφου μικροβιακού πληθυσμού ο οποίος τελικά θα είναι και ο επικρατών πληθυσμός στο πέρας του χρόνου ζωής του προϊόντος (Koutsoumanis and Nychas 1997).

Σε έρευνα στην γόπα αποθηκευμένη σε χαμηλή θερμοκρασία (3°C και 7°C) κύρια χλωρίδα αλλοίωσης ήταν βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και στις δυο θερμοκρασίες. Ακόμη, σε μικρότερο ποσοστό ανιχνεύτηκαν βακτήρια του γένους *Shewanella* καθώς και οξυγαλακτικά βακτήρια (Koutsoumanis and Nychas 1997). Αυτό έρχεται σε συμφωνία και με άλλες έρευνες (Koutsoumanis and Nychas 1999, Ταουκίς et al. 1999).

Σε αλιεύματα που αποθηκεύθηκαν και τελικά αλλοιώθηκαν σε υψηλότερες θερμοκρασίες η χλωρίδα στο τέλος του χρόνου ζωής τους κυριαρχείται από μεσόφιλα

βακτήρια των γενών *Vibrio*, *Aeromonas* και της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (Gram et al. 1987, Gram et al. 1990, Huss 1995, ICMSF 2000).

Στο τέλος του εμπορικού χρόνου ζωής παρουσιάστηκαν και βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Επίσης, συγκεκριμένα σε ψηλές θερμοκρασίες πολλά Gram αρνητικά στελέχη (*Aeromonas*/*Vibrio*) αναπτύσσονται αλλά παραμένουν μη ανιχνεύσιμα αν το μέσο καλλιέργειας δεν περιέχει αμινοξύ ή κυστεΐνη (Gram et al. 1987).

Σε αντίστοιχη έρευνα στο *Dendraster excentricus* βρέθηκε ότι στο υγρό του σώματος του υπήρχε εξαιρετικά υψηλό ποσοστό των *Bacillus* καθώς και άλλων θαλασσιών βακτηρίων που όμως δεν είναι παθογόνα για τον οργανισμό (Johnson and Charman 1971). Αυτά τα βακτήρια δεν πρέπει να θεωρηθούν κανονική χλωρίδα δεδομένου ότι οι κυμαινόμενες εποχιακά περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να προκαλέσουν στις βακτηριακές κοινότητες για κάθε γεωγραφική περιοχή (Bauer and Agerter 1994).

Οι Gram θετικοί βάκιλοι των *Bacillus* και *Clostridium* παρουσιάζονται στα υδάτινα οικοσυστήματα σε ολόκληρο τον κόσμο και έχουν την ικανότητα να παράγουν τοξίνες οι οποίες είναι παθογενείς για τα ζώα και τον άνθρωπο (Balows 1991). Οι Baya et al. (1992) τονίζουν στην έρευνα τους ότι κάθε βάκιλος των παραπάνω γενών που ανιχνεύεται στα εχινοειδή, πρέπει να απομονώνεται και να καλλιεργείται προς παρατήρηση. Το στέλεχος *Bacillus cereus* το οποίο είναι αυτό που κυρίως ανιχνεύεται προκαλεί δυο τύπους τροφικής δηλητηρίασης, εμετική και διαρροϊκή (Schoeni and Wong 2005). Έχουν απομονωθεί πολλά κατά Gram θετικά βακτήρια κυρίως από την περιστοματική μεμβράνη αλλά κανένα από την κοιλιά (Roberts-Regan et al. 1988).

Μεγάλος αριθμός Gram αρνητικών βακτηρίων που ανήκουν στην οικογένεια *Vibrionaceae* βρέθηκαν σε ψαριά αποθηκευμένα στους 20°C το οποίο οφείλεται ίσως στον μικρό χρόνο ανάπτυξης τους (περίπου τριάντα λεπτά της ώρας) σε αυτήν την θερμοκρασία (Easter et al. 1982). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και από τους Gorczyka et al. (1985) οι οποίοι βρήκαν Gram αρνητικά βακτήρια ως τους κύριους οργανισμούς αλλοίωσης της πέστροφας σε υψηλές θερμοκρασίες (37°C).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο αχινός είναι εξαιρετικά ευαλλοιώτο προϊόν. Ακόμη και σε θερμοκρασίες ψυγείου ο εμπορικός χρόνος ζωής του είναι μικρός. Η σύνθεση της αρχικής μικροχλωρίδας καθώς και της μικροχλωρίδας αλλοίωσης σε χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες αποτελούνται από παρόμοια γένη και οικογένειες όπως και στα άλλα αλιευτικά προϊόντα. Για την αύξηση του εμπορικού χρόνου ζωής θα πρέπει να δοκιμασθεί η εφαρμογή της τεχνολογίας εμποδίων με την μορφή της συσκευασίας τροποποιημένων ατμοσφαιρών καθώς και άλλων εμποδίων όπως το χαμηλότερο pH, η προσθήκη φυσικών αντιμικροβιακών κτλ.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Ashie, I.N.A., Smith, J.P. and Simpson, B.K.** (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**: 87-121
- **Balows, A.** (1991). *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.:1364
- **Baranyi, J., Roberts, T.A. and McClure P.** (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology* **10**: 43 – 59
- **Bauer, J. C. and Agerter C. J.** (1994). Isolation of potentially pathogenic bacterial flora from tropical sea urchins in selected west atlantic and east pacific sites. *Bulletin of Marine Science* **55**: 142-150
- **Baya, A. M., Lupiani B., Bandin I., Hetrick F. M., Figueras A., Carnahan A., May E. M. and Toranzo A. E.** (1992). Phenotypic and pathobiological properties of *Corynebacterium aquaticum* isolated from diseased striped bass. *Disease of Aquatic Organisms* **14**: 115-126
- **Borch E. and Agerhem H.**, (1992). Chemical, microbial and sensory changes during the anaerobic cold storage of beef inoculated with a homofermentative

Lactobacillus sp. or a *Leuconostoc* sp. International Journal of Food Microbiology **15**: 99-108

- **Botta, J.R.** (1995). Evaluation of seafood freshness quality. VCH publishers Inc New York
- **Cowan, J** (1993). Cowan's and Steel's Manual for identification of medical bacteria, Third edition. Cambridge University Press.
- **Dainty, R.H.** (1996) Chemical-biochemical detection of spoilage. International Journal of Food Microbiology **33**: 19-33
- **Dainty, R.H., Shaw, B.G., Hardinger, C.D. and Michanie, S.** (1979). The spoilage of vacuum-packed beef by cold tolerant bacteria. In: Cold tolerant microbes in spoilage and the environment (edited by Russel A.D & Fuller R.) Academic press: **83**-110
- **Dalgaard, P., Gram, L. and 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
- **Davie, P.S. and Sparksman, R.I.** (1986). Burnt tuna: An ultrastructural study of postmortem changes in muscle of yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) caught by rod and reel and southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) caught on handline or longline. Journal of Food Science **51**:1122-1128

- **De la Cruz-Garcia C., Lopez-Hernandez J., Gonzalez-Castro M.J., Rodriguez-Bernaldo De Quiros Al. and Simal-Lozano J.** (2000). Protein, amino acid and fatty acid contents in raw and canned sea urchin (*Paracentrotus lividus*) harvested in Galicia (NW Spain). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 1189-1192
- **Drosinos E.H. and Board R.G.** (1994). Metabolic activities of pseudomonas in batch cultures in extract of minced lamb. *Journal of Applied Bacteriology* **77**: 613-620
- **Easter, M.C., Gibson D.M. and Ward F.B.,** (1982). A conductance method for the assay and study of bacterial trimethylamine oxide reductase. *Journal of Applied Bacteriology* **52**: 357-365
- **Fung, D.Y.C.** (1994) Rapid methods and automation in food microbiology: a review. *Food Reviews International* **10**:357-375
- **Fung, D.Y.C.** (2008). Rapid methods for detecting microbial contaminants in foods: Past, Present and Future. In: *Microbial Food Contamination*. Wilson C.L. second edition. CRC Press New York: 167-168
- **Gianguzza, P., Chiantore, M., Bonaviri, C., Cattaneo-Vietti, R., Vielmini, I. and Riggio, S.** (2006). The effects of recreational *Paracentrotus lividus* fishing on distribution patterns of sea urchins at Ustica Island MPA (Western Mediterranean, Italy). *Fisheries Research* **81**:37-44

- **Gill, C.O.** (1986). The control of microbial spoilage in fresh meats. In: *Advances in meat research: Meat and poultry microbiology*, A.M.Pearson and T.R.Dutson, T.L.Macmillan. London Macmillan:49-88
- **Gilles, K.W. and Pearse, I.S.** (1986). Disease in sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus*: experimental infection and bacterial virulence. *Disease of Aquatic Organisms* **1**: 105-114
- **Gorczyca, E., Sumner J.L., Cohen D. and Brady P.** (1985). Mesophilic fish spoilage. *Food Technology Association of Australia* **37**: 24-26
- **Gould. G.W.** (1988). Interference with homeostasis-food. In: *Homeostatic mechanisms in Microorganisms*. Whittenburq R., Gould G.W., Banks J.G. and Board R.G., Bath University Press:220 228
- **Gram, L., Trolle, G., and Huss, H. H.** (1987). Detection of 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. and Huss, H.H.** (1990) The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lutes niloficus*). *International Journal of Food Microbiology* **10**:303-316

- **Gram, L.,** (1993). Inhibition effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. *Applied and Environmental Microbiology* **16**: 25-39.
- **Gram, L. and Huss, H.H.** (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* **33**: 121-137
- **Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G. and Bailey, M.J.** (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and RNA-based microbial community composition. *Applied Environmental Microbiology* **66**: 5488-5491
- **Haard N.F.** (1992). Control of chemical composition and food quality attribute of cultured fish. *Food Research International* **25**: 289-307
- **Hayes D.S.** (1985). Calibration of Fundamental Stellar Quantities. *Proceedings of International Astronomical Union Symposium No.111*: 225
- **Huis in't Veld, J.H.J., Mulder, R.W.A.W. and Snijders, J.M.A.** (1994) Impact of animal husbandry and slaughter technologies on microbial contamination of meat: monitoring and control. *Meat Science* **36**:123 154
- **Huis in't Veld, J.H.J.** (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology* **33**: 1-18

- **Hugh, R., and Leifson, E.** (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology* **66**: 24-26
- **Harrigan, W.F and McCance, M.E** (1976). *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Revised edition prepared by W.F. Harrigan. Academic Press: 100
- **Hurtado, J.L., Borderias, J., Montero, P. and An, H.** (1998). Characterization of proteolytic activity in octopus (*Octopus vulgaris*) arm muscle. *Journal of Food Biochemistry* **23**: 469-483
- **Huss, H.H., Dalgaard, P., and Gram, L.** (1997). Microbiology of fish and fish products. In *Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality*. Luten J.B., Børresen T. and Oehlenschläger J. Amsterdam: Elsevier:413-430
- **Huss, H.H.** (1995). *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. A training manual for the FAO/DANIDA training programme on fish technology and quality control. FAO Fisheries Series, No. 348
- **ICMSF** (2000). *Microorganisms in Foods Vol 6. Microbial Ecology of Food Communities*. Blackie Academic & Professional. London

- **Jay, J.M.** (1992). *Modern Food Microbiology*. Fourth edition. Van Nostrand Reinhold, New York
- **Johnson, P. T., and Chapman, F. A.** (1971). Comparative studies on the in vitro response of bacteria to invertebrate body fluids, III. *Stichopus tremulus* (sea cucumber) and *Dendraster excentricus* (sand dollar). *Journal of Invertebrate Pathology* **17**: 94- 106
- **Kajikazawa T., Sugita T. and Nishikawa A.** (2007). Comprehensive identification of bacteria in processes fresh edible sea urchin using 16S ribosomal DNA Sequence Analysis: The products contain various food poisoning-related bacteria and opportunistic bacterial pathogens. *Journal of Health Science* **53**:756-759
- **Keast, A. and Riley, T.V.** (1997). Identification of *Vibrio* spp. with the 'string' test. *Letters in Applied Microbiology* **25**: 106-108
- **Kelly, M.S.** (2005). Echinoderms: their culture and bioactive compounds. In: *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Subseries Marine Molecular Biotechnology (edited by V. Matrang). Berlin, Germany: Springer Verlag:140-165
- **Koutsoumanis, K., Lampropoulou, K., Taoukis, P.S. and Nychas, G.J.** (1997). Modeling the effect of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil on the death/survival of *Salmonella enteritidis* in homemade taramasalad.

International Symposium on Applications of Modelling as Innovative Technique in the Agri-Food Chain. ISHS Acta Horticulturae: **476**

- **Koutsoumanis, K., and Nychas, G.J.,** (1999). Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean Bouque (*Boops boops*) stored aerobically at 0, 3, 7 and 10°C. Applied Environment Microbiology **65**: 98-706
- **McDonald, K. and Sun, D.W.,** (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review. International Journal of Food Microbiology **52**:1–27
- **Miguez, L. J., and Catoira, J. L.** (1990). Ourizo de mar: un marisco en alza. Servicio de Extensión Pesqueira. La Coruna, Spain: Conselleria de Pesca.
- **Olafsdottir, G., Martinsdottir, E., Oehlenschlager, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I.M., Henehan, G., Nielsen, J. and Nielsen, H.** (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. Trends in Food Science and Technology **8**: 258-265
- **Olley J. and Lovern J.A.** (1960). Phospholipid hydrolysis in cod flesh stored at various temperatures. Journal of the Science of Food and Agriculture **11**:644-652
- **Olley, J. and Ratkowsky, D.A.,** (1973). Temperature function integration and its importance in the storage and distribution of flesh. Zwietering - Sons, New York:324

- **Pfening, N.** (2007). In: Brock, Βιολογία των Μικροοργανισμών. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο: 711
- **Pineiro-Sotelo M., Rodriguez-Bernaldo de Quiros A., Lopez-Hernandez J., Rodriguez-Jerez J.J., Hernandez-Herrero M.M. and Roig-Sagues A.X.** (2000). New methods to determine fish freshness in research and industry. In: Global quality assessment in Mediterranean aquaculture. CIHEAM-Mediterranean Agronomic Institute of Zaragoza. Zaragoza. 51:149
- **Ramonell, R.** (1985). Guia dos mariscos de Galicia. Vigo, Spain: Galaxia.
- **Roberts-Regan, D. L., Scheibling R. E. and J. F. Jellett.** (1988). Natural and experimentally induced lesions of the body wall of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. Disease of Aquatic Organisms **5**: 51-62
- **Robinson J.K., Mueller J. and Filippone L.** (2000). New molecular beacon technology. American Laboratories **32**:30-34
- **Rodriguez-Jerez, J.J., Mora-Ventura, M.T., Lopez-Sabater, E.I. and Hernandez-Herrero, M.** (1994). Histidine, lysine and ornithine decarboxylase bacteria in Spanish salted-semi preserved anchovies. Journal of Food Protection **57**: 784-787

- **Schoeni J.L. and Wong A.C.** (2005). *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *Journal of Food Protection* **68**:636-648
- **Shapiro, J.** (2007). In: Brock, Βιολογία των Μικροοργανισμών. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο: 711
- **Stamatis, N. and Vafidis, D.** (2009). Effect of marinating and vacuum storage at 6°C on the fate of chemical, microbial and sensory quality indices of echinoid gonads *Paracentrotus lividus* Lamark, 1816. *International Journal of Food Science and Technology* **44**:1626-1633
- **Taoukis, P.S., Koutsoumanis, K. and Nychas, G.J.E.** (1999). Use of time-temperature integrators and predictive modeling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions. *International Journal of Food Microbiology* **53**: 21-31
- **Tortorello M. and Gendel S.M.** (1993). Fluorescent antibodies applied to direct epifluorescent filter techniques for microscopic enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 in milk and juice. *Journal of Food Protection* **56**:672
- **Turon, X., Giribet, G., Lopez, S. and Palacin, C.** (1995). Growth and population structure of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Marine Ecology Progress Series* **122**: 193-204

- **Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E. and Nychas, G.J.E.** (2002). Characterization of *Pseudomonas spp.* Associated of gilt-head sea bream stored under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 65-72
- **Tzanatos, E., Dimitriou, E., Katselis, G., Georgiadis, M. and Koutsikopoulos, C.** (2005). Compositio, temporal dynamics and regional characteristics of small-scale fisheries in Greece. *Fisheries Research* **73**: 147-158
- **Unkles, S.E.** (1977). Bacterial flora of the sea urchin *Echinus esculentus*. *Applied Environmental Microbiology* **34**:347-350
- **Valle, M., Tailliez, R. and Malle, P.** (1998). Optimization of the enumeration of total aerobic bacterial flora in the flesh of seafish. *Journal of Rapid Methods of Automatic Microbiology* **6**:29-42
- **Van Der Vossen, J.M.B.M and Hofstra H.** (1996). DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementation. *International Journal of Food Microbiology* **33**:35-49
- **Voultsiadou, E. and Vafidis, D.** (2007). Marine invertebrate diversity in Aristotle's zoology. *Contribution to Zoology* **76**:103-120

- **Walser P.E.** (2000). Using conventional microtiter plate technology for the automation of microbiology testing of drinking water. *Journal of Rapid Methods of Automatic Microbiology* **8**:193-208

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Κοτζεκίδου-Ρούκα Π.** (2000). Μικροβιολογία Τροφίμων. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
- **Κωνσταντινίου-Κοκοτού, Β., Μαρκίδης, Θ. και Μικρός Ε.** (2005). Απομόνωση και μελέτη με NMR των πολυακορεστων λιπαρών οξέων και λιπιδίων των ιχθύων. 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Συγχρονες τάσεις στον τομέα των λιπών και ελαίων. Εθνικό Ιδρυμα Ερευνών: 10-11
- **Λόλας Αλέξιος.** (2008). Παραλλακτικότητα των πληθυσμών αχινού στον Παρασητικό κόλπο και στις Σποράδες. Μεταπτυχιακή διατριβή.

ABSTRACT

Aquatic products are perishable with relatively short shelf-life. The chemical composition of aquatic products, their high water content (75% on average) as well as their relatively high pH (6.2-6.8 most), render them a very good growth substrate for a wide variety of micro-organisms. Efforts are made to develop methods to ensure the safety of seafood and offer to the consumer food of high quality with as long as possible longer shelf-life.

The determination of composition of initial microbial population and at the point of spoilage, as well as, the growth rate of total microbial population of sea urchin gonads stored at low (5°C) and high (20°C) temperatures were investigated.

The initial microbial flora is constituted mainly of Gram positive *Bacillus* and Gram negative psychrophilic micro-organisms. The level of microbial population at the point of spoilage (spoilage level) was 7 logs cfu/g after 24 and 60 h for gonads that were stored at 20°C and 5°C respectively. The composition of spoilage microflora depends mainly on storage temperature. Spoilage microflora was dominated by Gram negative psychrophilic and Gram negative Enterobacteriaceae for gonads that stored at 5°C and 20°C respectively.

Storage temperature seemed to have catalytic role in the shelf-life of sea urchin. Storage under low temperatures is the most important methods for echinoids preservation. Sea urchin shelf-life was longer at low temperatures (5°C), in contrast to those stored at high temperature (20°C). Sea urchins stored at high temperature (20°C) the microbial flora exhibited higher growth rates compared to chilling

temperature (0.175 h^{-1} at 20°C and 0.087 h^{-1} at 5°C), decreasing shelf-life down to 24 hours, compared to 62 h that observed for low storage temperature.

The study of microbiology of perishable products is very important to ensure the safety of products and for the understanding of spoilage mechanisms. The aim is to apply methods in order to increase shelf-life and assure food safety. In order to increase shelf-life researchers should apply the hurdle technology, such as application of modified atmosphere packaging, low pH, addition of natural antimicrobial etc. However it is necessary to study techniques for rapid determination of quality parameters in order to avoid the long waiting for the export of results, taking into account that aquatic products are exceptionally perishable products with short shelf-life.

Keywords: sea urchin, *Paracentrotus lividus*, microbial spoilage, shelf-life