

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών κατά την ωρίμανση-
αποθήκευση αλατισμένου γαύρου (*Engraulis encrasicolus*)».**

ΜΑΚΡΥΓΙΑΝΝΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

ΒΟΛΟΣ 2012

**«Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών κατά την ωρίμανση-αποθήκευση
αλατισμένου γούρου (*Engraulis encrasicolus*)».**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

- 1. Ιωάννης Μποζιάρης, Επίκουρος Καθηγητής,** Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **επιβλέπων,**
- 2. Χρήστος Νεοφύτου, Καθηγητής,** Ιχθυολογία-Υδροβιολογία., Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **μέλος,**
- 3. Κωνσταντίνος Κορμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής,** Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **μέλος.**

Στους γονείς και τα αδέρφια μου

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 καθηγητή της εργασίας αυτής, τον κύριο Ιωάννη Μποζιάρη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, αποτελούμενη από τους Χρήστο Νεοφύτου και Κωνσταντίνο Κορμά, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους κατά τη συγγραφή της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφιο διδάκτορα Φωτεινή Παρλαπάνη για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, όσον αφορά χρήσιμες συμβουλές κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, καθώς επίσης τη συμφοιτήτριά μου Σουλτάνα Σαμαρά για την αμέριστη συμπαράστασή της κατά τη διάρκεια του πειράματος αλλά και της όλης πορείας μου, κατά τη χρονική περίοδο των σπουδών μου.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους γονείς μου **Γιάννη** και **Μαρκέλλα** για την αμέριστη συμπαράστασή τους, τη βοήθειά τους, την κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση της τύχης των *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* Enteritidis κατά την ωρίμανση-αποθήκευση παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*), ο οποίος προμηθεύτηκε από την αγορά του Βόλου. Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε εκσπλαχνισμός, αποκεφαλισμός, αφαίρεση του κεντρικού οστού και τοποθέτηση για 2 ώρες σε νερό. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* Enteritidis PT4, με επίπεδο πληθυσμού 5×10^5 cfu/g. Ακολούθησε αλατισμός με χονδρό αλάτι ίσο με το βάρος των ψαριών, σε στρώσεις. Το προϊόν αποθηκεύθηκε στους 15°C για 45 ημέρες. Απαριθμήθηκαν οι *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* Enteritidis σε τρυβλία Baird-Parker, Palcam και XLD αντίστοιχα, καθώς και οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS, ζύμες-μύκητες σε RBC και ο συνολικός πληθυσμός σε TSA, TSA 2,5% NaCl και TSA 5% NaCl. Εξετάστηκε και η σύνθεση της αρχικής ενδιάμεσης και τελικής μικροβιακής χλωρίδας. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές χρησιμοποιώντας διαφορετικές παρτίδες γαύρου. Οι πληθυσμοί στα MRS και RBC στο πρώτο πείραμα ήταν κάτω από το ελάχιστο επίπεδο απαρίθμησης, ενώ οι πληθυσμοί στο TSA, TSA 2,5% NaCl και TSA 5% NaCl ξεκίνησαν στα 5,5 log cfu/g και από την τρίτη μέρα και μετά κυμάνθηκαν περί τα 3 log cfu/g σε όλη την διάρκεια του πειράματος. Στο δεύτερο πείραμα ο ολικός πληθυσμός μετρήθηκε στο TSA 2,5% NaCl μόνο και οι πληθυσμοί ξεκινούσαν αλλά και συνέχιζαν να βρίσκονται στο επίπεδο των 3 log cfu/g σε όλη την διάρκεια του πειράματος. Η συμπεριφορά των παθογόνων στα δύο πειράματα ήταν πανομοιότυπη. Οι τιμές υποδεκαπλασιασμού των *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus* ήταν 6,0, 10,3, και 24,5 ημέρες αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί της *Salmonella* Enteritidis και *Listeria monocytogenes* μειώθηκαν κάτω από 2 log cfu/g μετά από παρέλευση 14 και 28 ημερών αντίστοιχα, ενώ ο *Staphylococcus aureus* στο τέλος του πειράματος (45 ημέρες) είχε συγκέντρωση 2,5 log cfu/g. Η αλάτιση του γαύρου δημιουργεί περιβάλλον στο οποίο οι παθογόνοι *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus* αδρανοποιούνται, με διαφορετικό ωστόσο ρυθμό.

Λέξεις κλειδιά: αλάτιση, γάυρος, *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Γενικά.....	1
1.2. Ο γαύρος - <i>Engraulis encrasicolus</i> , Linnaeus, 1758	1
1.3. Συστηματική κατάταξη γάβρου (<i>engraulis encrasicolus</i>).....	2
1.5. Αλίπαστοι ιχθύες.....	4
1.6. Αλλοίωση αλιευμάτων	5
1.7. Μικροβιακή αλλοίωση.....	6
1.8. Παθογόνοι μικροοργανισμοί.....	6
1.9. Σκοπός της εργασίας.....	8
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	9
2.1. Προετοιμασία αλατισμένων ιχθύων.....	9
2.2 Μικροβιολογικά υλικά	11
2.2.1. Tryptone Soy Broth (TSB).....	11
2.2.2. Tryptone Soy Agar (TSA).....	12
2.2.3. Tryptone Soy Agar με 2,5% ή 5% αλάτι (TSA 2,5% ή TSA 5%)	13
2.2.4. Red Bile Glucose Agar (VRBGA).....	13
2.2.6. Mann Rogosa Sharpe agar (MRS).....	14
2.2.7. Baird Parker.....	15
2.2.8. Palcam Agar	17
2.2.9. Xylose Lysine Deoxycholate (XLD).....	18
2.2.10. Rose bengal Chloramphenicol Agar (RBC Agar).....	19
2.2.11. Hugh and Leifson medium	21
2.2.12. Ημιστέρεο μέσο σύμφωνα με τους Gram et al. (1987)	21
2.3. Εμβολιασμός με παθογόνους	22
2.4. Μικροβιολογική ανάλυση.....	23
2.5. Μέτρηση pH.....	24
2.6. Ταυτοποίηση αποικιών.....	24
2.6.2. Περιγραφή διαδικασιών ταυτοποίησης.....	26
2.6.2.1. Χρώση Gram, σχήμα του μικροβιακού κυττάρου και παρουσία σπορίων	26
2.6.2.2. Δοκιμή της οξειδάσης.....	26

2.6.2.3. Δοκιμή της καταλάσης	27
2.6.2.4. Δοκιμή αερόβιου και αναερόβιου μεταβολισμού της γλυκόζης	27
2.6.2.5. Μετατροπή του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης σε τριμεθυλαμίνη και παραγωγή υδρόθειου	28
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	29
3.1. Μικροβιακή ανάπτυξη	29
3.1.1. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX).....	29
3.1.1.1. Πρώτο πείραμα.....	29
3.1.1.2. Δεύτερο Πείραμα	30
3.1.2. Enterobacteriaceae	31
3.1.3. Οξυγαλακτικά	31
3.1.4. Ζύμες και μύκητες.....	32
3.1.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	33
3.1.5.1. Πρώτο πείραμα.....	33
3.1.5.2. Δεύτερο πείραμα	34
3.1.6. <i>Listeria monocytogenes</i>	35
3.1.6.1. Πρώτο πείραμα.....	35
3.1.6.2. Δεύτερο πείραμα	36
3.1.7. <i>Salmonella</i> Enteritidis	37
3.1.7.1. Πρώτο πείραμα.....	37
3.1.7.2. Δεύτερο πείραμα	38
3.2. Μεταβολή pH.....	39
3.2.1. Πρώτο πείραμα.....	39
3.2.2. Δεύτερο πείραμα	39
3.3.2. Ρυθμός θανάτου των παθογόνων	40
3.4. Ταυτοποίηση μικροοργανισμών.....	40
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	48
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49
6.1. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.....	49
6.2. Ελληνική βιβλιογραφία	51
6.3. Ηλεκτρονική βιβλιογραφία	52

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά

Οι ιχθείς αλλά και γενικά τα θαλασσινά αποτελούν πλούσια πηγή σε βιταμίνες, ανόργανα άλατα, ιχνοστοιχεία, αλλά και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της σειράς ω-3, τα οποία είναι απαραίτητα για την σωστή διατροφή του ανθρώπινου οργανισμού (Domingo 2007).

Η σάρκα των ιχθύων αποτελεί ένα πολύ καλό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Οι βασικότεροι παράγοντες που συμβάλλουν στη μικροβιολογική αλλοίωση των ζωντανών είναι η επιμόλυνση από το περιβάλλον, καθώς και άλλοι παράγοντες, όπως είναι η θερμοκρασία, το pH και οι μικροβιακές αλληλεπιδράσεις στη σάρκα τους. Το pH της σάρκας των ιχθύων μεταθανάτια είναι σχετικά υψηλό (> 6,0). Οι περισσότεροι ιχθείς διαθέτουν πολύ μικρή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (<0,5 %) στο μυϊκό τους ιστό και παράγονται πολύ μικρές ποσότητες γαλακτικού οξέως μετά τον θάνατο τους. Επίσης παρατηρείται σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε μη πρωτεϊνικό άζωτο (Non Protein Nitrogen-NPN). Αυτό έχει σημαντικές συνέπειες στη μικροβιολογία των ιχθύων και αυτό γιατί επιτρέπει την ανάπτυξη αλλοιωγόνων βακτηρίων όπως τα *Shewanella*, *Pseudomonas* και άλλων (Gram and Hass 1996).

1.2. Ο γάυρος - *Engraulis encrasicolus*

Γάυρος ή γάβρος είναι ψάρι γνωστό ήδη από την αρχαιότητα. Είναι η «αφήνη» των αρχαίων Ελλήνων. Επίσης είναι γνωστό και με το όνομα αντζούγια ή και χαγί (από τη τούρκικη ονομασία του). Το επίσημο όνομά του είναι "εγγραυλίσ η εγκρασίχολος" (*Engraulis encrasicolus*) και ανήκει στην οικογένεια Εγγραυλίδες (Engraulidae).

Το μήκος του φθάνει μέχρι τα 20 εκατοστά. Η ράχη και τα πλευρά του είναι πρασινογάλαζα, ενώ η κοιλιά του είναι λευκή προς το ασημί και γυαλιστερή. Το σώμα του είναι στενόμακρο, το ρύγχος του μακρύ και το πάνω σαγόني του εξέχει μακρύτερο. Το στόμα του φθάνει μέχρι πίσω από τα μάτια, φέρει μικρά και μυτερά δόντια. Φέρει

επίσης, ραχιαίο πτερύγιο, ένα θωρακικό χαμηλά, το κοιλιακό αντικρυστά του ραχιαίου, ένα μικρό τριγωνικό εδρικό καθώς και διχαλωτή ουρά.

Ζει σε ζεστές περιοχές, κατά κοπάδια και περισσότερο στον αφρό ειδικά την άνοιξη και το καλοκαίρι. Το χειμώνα αντίθετα παραμένει στο βυθό σε βάθος 100-200 μέτρα. Τρέφεται με μικροσκοπικά μαλακόστρακα και το γόνιο άλλων ιχθύων. Αναπαράγεται από τον Απρίλη μέχρι το Σεπτέμβρη. Τα αυγά έχουν ωοειδές σχήμα και διαφέρουν από τα αντίστοιχα της σαρδέλας. Τα νεογέννητα κατεβαίνουν στο βυθό στο τέλος του έτους και επιστρέφουν στην επιφάνεια κατά την άνοιξη, όπου και όντας 10-12 cm θεωρούνται ενός έτους. Τότε, έχοντας ώριμους γενετικούς αδένες, γεννούν για πρώτη φορά. Στη συνέχεια επιστρέφουν και πάλι στο βυθό μέχρι την επόμενη άνοιξη. Τότε θα είναι 15-20 cm και σε ηλικία δύο ετών θα ανέβουν για δεύτερη φορά στην επιφάνεια και θα γεννήσουν (Ανανιάδη 1961).

Τα είδη *Engraulis encrasicolus* (γαύρος) και *Sardina pilchardus* (σαρδέλα), συνιστούν δύο από τα πιο σημαντικά είδη μικρών πελαγικών στις ελληνικές θάλασσες καθώς η παραγωγή τους ανέρχεται στο 30% των συνολικών εκφορτώσεων (Stergiou et al. 1997).

Η αλιεία του γαύρου στις ελληνικές θάλασσες, σύμφωνα με την Εθνική Στατιστική Υπηρεσία δείχνει μια αύξηση των εκφορτώσεων από τα μέσα της δεκαετίας του '60 ως τις αρχές του '90. Στη συνέχεια υπάρχει μείωση και διακύμανση των τιμών η οποία παρατηρείται σύμφωνα και με τις εκφορτώσεις των χρονολογιών 2001, όπου αλιεύθηκαν 10.770 τόνοι, το 2002 με 9.975 τόνους και το 2003 με 13.780 τόνους. (ΕΛ.ΣΤΑΤ, <http://www.statistics.gr>). Μια πιο πρόσφατη έρευνα των Μαχιά και συν. (2007) παρουσιάζει την εκτίμηση της συνολικής βιομάζας του γαύρου στο Βόρειο Αιγαίο με βάση την ακουστική μέθοδο, όπου επαληθεύει τα παραπάνω στοιχεία. Συγκεκριμένα 47838 mt το 2003, 46508 mt το 2004, 31852 mt το 2005 και 62604 mt το 2006.

1.3. Συστηματική κατάταξη γάβρου (*engraulis encrasicolus*).

Βασίλειο: Animalia

Φύλλο: Chordata

Κλάση: Actinopterygii

Τάξη: Clupeiformes

Οικογένεια: Engraulidae

Γένος: *Engraulis*

Είδος: *Encrasicolus*

(<http://www.fishbase.org>).

1.4. Αλιπάστωση των τροφίμων

Τα παστά αποτελούν μία κατηγορία τροφίμων όπου συντηρούνται λόγω μειωμένης ενεργότητας νερού (a_w) όπως και οι αφυδατωμένες τροφές. Ωστόσο αφυδατωμένες τροφές θεωρούνται αυτές όπου η υγρασία τους έχει μειωθεί κάτω από το 20% του βάρους τους. Η αφυδάτωση πραγματοποιείται σύμφωνα με τις εξής μεθόδους:

- έκθεση σε θερμό αέρα,
- έκθεση στον ήλιο,
- επαφή με θερμή επιφάνεια,
- έκθεση σε μικροκύματα,
- έκθεση σε υπέρυθρη ακτινοβολία,
- εμβάπτιση σε πυκνό διάλυμα σακχάρων ή άλατος και
- λυοφιλίωση

(Αρβανιτογιάννης και Τζούρος 2004)

Το αλάτισμα των τροφών αποτελεί μία από τις αρχαιότερες γνωστές μεθόδους συντήρησης, που μπορεί να εφαρμοσθεί μόνη της ή και σε συνδυασμό με άλλες. Το αλάτισμα μπορεί να γίνει κατά δύο τρόπους:

- Με προσθήκη αλατιού, όπως γίνεται με τα ψάρια (ρέγγες, βακαλάοι, σαρδέλλες).
- Με βύθιση του τροφίμου σε άλμη (σαλαμούρα), όπως γίνεται με τις ελιές, τα κληματόφυλλα, κ.ά..

1.5. Αλίπαστοι ιχθύες

Η αλάτιση των ιχθύων και κυρίως του γαύρου και της σαρδέλας είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται στην Μεσόγειο για να προσδώσει στο προϊόν ωραία γεύση αλλά και χρώμα.

Η μέθοδος αυτή είναι αρχαία και δεν υπάρχουν ακριβείς πληροφορίες σχετικά με τον μηχανισμό και η διαδικασία γίνεται σχεδόν εμπειρικά. Δεδομένου ότι ο αλατισμένος γαύρος δεν είναι ένα αποστειρωμένο προϊόν, είναι αρκετά ενδιαφέρον να ερευνηθούν τα βακτήρια που υπάρχουν στην αρχή, κατά την διάρκεια αλλά και στο τέλος της ωρίμανσης (Villar et al. 1984).

Η τεχνολογία του αλατίσματος των αλιευμάτων περιλαμβάνει την προπαρασκευή αυτών, όπου απαραίτητη προϋπόθεση είναι η φρεσκότητα των αλιευμάτων, το καλό πλύσιμο, ο καθαρισμός και η απεντέρωση. Κατόπιν απαιτείται το γέμισμα των δοχείων, το αλάτισμα, η ωρίμανση και τέλος η διατήρησή τους (Παπαναστασίου 1976).

Η χρήση αλατιού ως μέθοδος συντήρησης των αλιευμάτων δρα στη μείωση της ενεργότητας του νερού (a_w). Με την μείωσή της έχουμε παρεμπόδιση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Σε $a_w < 0.92$ έχουμε αναστολή της βακτηριακής δράσης, με εξαίρεση κάποιους αλλόφιλους μικροοργανισμούς (Μποζιάρης 2009). Εξαίρεση αποτελεί το τοξινογόνο βακτήριο *Staphylococcus aureus* το οποίο μπορεί να πολλαπλασιαστεί και να παράγει τοξίνη σε τιμή a_w 0.86 (Lupin et al. 1981). Η αλάτιση μπορεί να γίνει με προσθήκη ξηρού άλατος αλλά και με υγρή αλάτιση (Αρβανιτογιάννης και Τσούρος 2004).

Ξηρή αλάτιση

Μπορεί να γίνει με λεπτό αλλά και με χοντρό αλάτι. Το λεπτό έχει την δυνατότητα να προκαλεί γρήγορη αφυδάτωση των επιφανειακών στρωμάτων με τον σχηματισμό κρούστας η οποία δυσκολεύει τη συνέχιση της εισχώρησης του άλατος αλλά και την αποβολή του ύδατος. Σε αντίθεση το χοντρό αλάτι εισέρχεται στο τρόφιμο με μεγαλύτερη καθυστέρηση και έτσι η διαδικασία μπορεί και γίνεται καλύτερα (Horner 1997).

Υγρή αλάτιση

Στην υγρή αλάτιση μπορούν να χρησιμοποιηθούν συγκεντρώσεις άλμης ανάλογα με τον τύπο χρήσης που θέλουμε να έχει το προϊόν μας. Αν πρόκειται το προϊόν να μεταεξεργαστεί με άλλη μέθοδο όπως καπνισμό ή κονσερβοποίηση, τότε χρησιμοποιούμε μέση ή ασθενή αλάτιση (συγκέντρωση άλμης <20%) και σύντομο χρονικό διάστημα ωρίμανσης. Σε περιπτώσεις όμως που στο ψάρι δεν θα χορηγηθεί άλλη επεξεργασία, η αλάτιση πρέπει να είναι αρκετά πιο ισχυρή (συγκέντρωση άλμης >20%) και το χρονικό διάστημα ωρίμανσης πιο μακρύ (Horner 1997).

1.6. Αλλοίωση αλιευμάτων

Με τον όρο αλλοίωση αλιευμάτων αλλά και γενικά τροφίμων αναφερόμαστε στις αλλαγές που το καθιστούν μη αποδεκτό για ανθρώπινη κατανάλωση. Η αλλοίωση των αλιευμάτων είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο όπου λαμβάνουν χώρα φαινόμενα τα οποία αφορούν μικροβιολογική δραστηριότητα, χημικές αντιδράσεις υποβάθμισης αλλά και ενζυμική δραστηριότητα (Huis in't Veld 1996).

Η αξιολόγηση της ποιότητας των θαλασσιών μπορεί να γίνει με βάση ποιοτικά χαρακτηριστικά όπως οργανοληπτικά, φυσικοχημικά ή μικροβιολογικά (Botta 1995). Αυτά που μπορούμε συνήθως να παρατηρήσουμε εύκολα σε ένα αλλοιωμένο αλίευμα είναι:

- η ανίχνευση ανεπιθύμητων οσμών
- ο σχηματισμός 'γλίτσας'
- οι αλλαγές στο χρώμα και την εμφάνιση
- οι αλλαγές στην υφή

(Gram and Huss 1996).

Φυσικοχημικές παράμετροι που χρησιμοποιούνται για την μελέτη της αλλοίωσης των νωπών ιχθύων είναι ο προσδιορισμός των προϊόντων διάσπασης της ATP, ο προσδιορισμός του ολικού πτητικού βασικού αζώτου (TVB-N), της τριμεθυλαμίνης (TMA), των βιογενών αμινών, καθώς και των δεικτών τάγχισης όπως TBA, αριθμού υπεροξειδίων κτλ (Ozogul et al. 2004), ενώ οι μικροβιολογικές παράμετροι είναι η απαρίθμηση του Ολικού Μικροβιακού Πληθυσμού (ή Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας-OMX) και των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών.

1.7. Μικροβιακή αλλοίωση

Ως μικροβιακή αλλοίωση των νοπών αλιευμάτων αλλά και γενικά των νοπών τροφίμων ζωικής προέλευσης, ορίζεται οποιαδήποτε μεταβολή των οργανοληπτικών μεταβολών του, δηλαδή αλλαγή στην οσμή, στο άρωμα ή γενικά στην εμφάνιση του τροφίμου λόγω μικροβιακής δραστηριότητας (Gill 1986).

Όλα τα νοπά τρόφιμα περιέχουν ποικιλία μικροοργανισμών. Όμως ένα μέρος μόνο από αυτούς καταφέρνει τελικά να φτάσει σε μεγάλους αριθμούς που θα αλλοιώσουν τα τρόφιμα, και ονομάζονται 'ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (EAM). Παρατηρείται μεγάλη διαφορετικότητα ειδικών αλλοιωγόνων οργανισμών ιδιαίτερα σε ιχθείς από διαφορετική γεωγραφική προέλευση (Gram and Huss 1996, Koutsoumanis 2000, Boziaris et al. 2011).

Η πλειονότητα των ψαριών στην Ευρώπη περιέχουν πλήθος από δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς όπως *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, και *Yersinia enterocolitica* οι οποίοι είναι ικανοί να αναπτυχθούν σε χαμηλές θερμοκρασίες (Davies 2001).

1.8. Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Listeria monocytogenes

Η *L. monocytogenes* είναι Gram-θετικό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο. Αναπτύσσεται στους 1-45 °C με ιδανική θερμοκρασία τους 30-37 °C. Είναι ψυχρότροφος μικροοργανισμός, ο οποίος μπορεί να επιβιώσει σε διάφορες άλλες ακραίες συνθήκες, όπως σε υψηλή αλατότητα ή χαμηλό pH. Αναπτύσσεται σε pH 4,1-9,6, με άριστο το 6-7, και αλάτι έως 12% (Cormac 1999, Gandhi 2007). Η *L. monocytogenes* είναι πολύ διαδεδομένη στη φύση και απαντάται στα φυτά, στο έδαφος, στο νερό και στον εντερικό σωλήνα πολλών ζώων και υγιών ατόμων. Έρευνες δίνουν θετικά αποτελέσματα στην ύπαρξη *L. monocytogenes* σε νοπά και κατεψυγμένα ψάρια. Ο ίδιος ο άνθρωπος μπορεί να είναι φορέας της *L. monocytogenes* σε ποσοστό 5-10%. Η *L. monocytogenes* μπορεί να εγκατασταθεί σε ένα εργοστάσιο επεξεργασίας. Όπως και άλλα βακτήρια, μετά την εγκατάστασή τους, μπορεί να δημιουργήσουν βιουμένιο

σε διάφορες επιφάνειες επεξεργασίας, σε ψυκτικούς θαλάμους και στο πάτωμα (Feldhusen 2000). Η *L. monocytogenes* είναι ένα κοινό παθογόνο βακτήριο, που εκτός από γαστρεντερίτιδα μπορεί σε ευαίσθητα άτομα να προκαλέσει αποβολή εμβρύων, μηνιγγίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και δηλητηρίαση του αίματος. Παρόλο που τα κρούσματα λιστερίωσης δεν είναι αρκετά συχνά, το ποσοστό θνησιμότητας είναι αρκετά υψηλό και φτάνει το 34%. Η θεραπεία γίνεται με τη χρήση αντιβιοτικών, αν και στις σοβαρότερες περιπτώσεις δεν είναι αποτελεσματικά (Gounadaki 2007).

Salmonella spp

Το γένος *Salmonella* ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Τα βακτήρια του γένους είναι προαιρετικά αναερόβια, Gram-αρνητικά. Αναπτύσσονται από τους 6-46 °C, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37 °C, σε pH 3,8-9,0 με βέλτιστη τιμή pH 6,6-8,2 και σε ενεργότητα νερού 0,94-0,99. Οι σαλμονέλες είναι κοινές στη φύση. Βρίσκονται στον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων και μέσω των απεκκρίσεων μολύνουν το νερό, το έδαφος και τα τρόφιμα. Τα νωπά κόκκινα και λευκά κρέατα είναι από τις πιο συνηθισμένες πηγές σαλμονέλας αλλά και τα αλιεύματα (Μποζιάρης 2009). Μάλιστα, τα πουλερικά αποτελούν την αιτία των περισσότερων κρουσμάτων. Έχουν τη δυνατότητα εισβολής στο σύστημα αναπαραγωγής των πουλερικών, με αποτέλεσμα να μεταδίδονται στα αυγά των μολυσμένων πτηνών. Μέσω του εντερικού συστήματος είναι εφικτή η μετάδοση τους στα κόπρανα και από εκεί, μολύνοντας τρόφιμα, νερό και άλλα, μεταφέρονται στον άνθρωπο. Στον άνθρωπο προκαλούν λοιμώξεις των εντέρων και αποτελούν σοβαρό πρόβλημα στις ανεπτυγμένες χώρες, ενώ έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας από τους κυριότερους παράγοντες των τροφικών δηλητηριάσεων. (Roberts 1996).

Staphylococcus aureus

Ο *Staphylococcus aureus* (χρυσίζων σταφυλόκοκκος) είναι ένας Gram-θετικός, προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός. Προτιμά τη θερμοκρασία των 35-37 °C, αλλά μπορεί να αναπτυχθεί από 6-7 °C έως τους 47 °C. Η παρουσία μικρού πληθυσμού *S. aureus* δεν είναι ασυνήθιστη στα τρόφιμα. Μάλιστα, στα πουλερικά και στα ωμά κρέατα είναι πολύ συνηθής, καθώς αποτελεί μέρος της χλωρίδας του δέρματος των ζώων. Μόλυνση εκτός από το δέρμα, μπορούν να προκαλέσουν οι χειριστές τροφίμων

όταν ο άνθρωπος είναι φορέας του μικροοργανισμού αυτού. Ο μικροοργανισμός μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε a_w 0,83 και να παράγει τοξίνη σε a_w 0,86. Για να προκληθούν όμως κρούσματα τροφικής δηλητηρίασης πρέπει ο *S. aureus* να πολλαπλασιαστεί σε πληθυσμό μεγαλύτερο από 10^6 κύτταρα/g. Ο λόγος είναι ότι τότε παράγεται αρκετή ποσότητα θερμοανθεκτικής εντεροτοξίνης, η οποία προκαλεί συμπτώματα ναυτίας και εμετούς. Σε άριστες συνθήκες μπορεί να σχηματιστεί τοξίνη σε 4-6 h. Η τροφική δηλητηρίαση που προκαλείται από τον *S. aureus*, η σταφυλοκοκκική τοξίνωση, χαρακτηρίζεται από μικρή περίοδο επώασης, συνήθως 2-4 h. Τα κυρίαρχα συμπτώματα είναι ναυτία, εμετός, έντονοι πόνοι στο στομάχι και διάρροια. Η πλήρης ανάρρωση έρχεται μετά από 1-2 ημέρες (Μποζιάρης 2009).

1.9. Σκοπός της εργασίας

Το αλάτισμα δημιουργεί μη ευνοϊκό περιβάλλον για την επιβίωση διαφόρων μικροοργανισμών, λόγω της χαμηλής ενεργότητας νερού που δημιουργείται με την εισχώρηση του άλατος εντός του τροφίμου. Η παρούσα εργασία έχει σκοπό να διερευνήσει την τύχη των παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. και *Staphylococcus aureus*) καθώς και της φυσικής μικροχλωρίδας (Ολικός μικροβιακός πληθυσμός, εντεροβακτήρια, οξυγαλακτικά, ζύμες και μύκητες) κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου. Εξετάστηκε η σύνθεση της μικροβιακής χλωρίδας στην αρχή, στο μέσο και στο πέρας της ωρίμανσης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πραγματοποιήθηκαν δύο πανομοιότυπα πειράματα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές παρτίδες γαύρου. Ο αρχικός σχεδιασμός προέβλεπε την απαρίθμηση της Ολική Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX), Enterobacteriaceae, οξυγαλακτικά, ζύμες-μύκητες και την παρακολούθηση της τύχης των παθογόνων *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., και *Listeria monocytogenes*. Στην επανάληψη του πειράματος μετρήθηκαν μόνο όσα από τα παραπάνω παρουσίασαν αξιοσημείωτες μεταβολές.

2.1. Προετοιμασία αλατισμένων ιχθύων

Αγοράστηκε γαύρος (*Engraulis encrasicolus*) από ιχθυοπωλείο του Βόλου. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε στο εργαστήριο και εκεί αποκεφαλίστηκε και αφαιρέθηκε το κεντρικό οστό. Έπειτα τοποθετήθηκε σε δοχείο που περιείχε νερό για δύο ώρες (2 h), με σκοπό να καθαριστεί κυρίως από το αίμα (Εικ. 1).



Εικόνα 1. Δοχείο όπου τοποθετήθηκαν τα ψάρια (Μακρυγιάννης 2011).

Κατόπιν ζυγίστηκε το καθαρό υπόλοιπο των ιχθύων (1300 g), χωρίστηκε σε τέσσερις ομάδες και μοιράστηκε σε τέσσερα δισκία. Στο δισκίο (Α) τοποθετήθηκαν 400 g γαύρου ενώ στα δισκία (Β), (Γ) και (Δ) τοποθετήθηκαν από 300 g τα οποία και εμβολιάστηκαν (η περιγραφή του εμβολιασμού θα αναλυθεί στην επόμενη ενότητα) με

τους παθογόνους μικροοργανισμούς *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* Enteritidis αντίστοιχα.

Για την αλάτιση των ιχθύων χρησιμοποιήθηκε χοντρό αλάτι σε αναλογία 1/1 με το βάρος των ψαριών. Η διαδικασία ξεκίνησε με την κάλυψη του κάτω μέρους των δισκίων με αλάτι. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν στρώσεις από ψάρια και άλατος εναλλάξ (Εικ. 2). Ανάμεσα στις στρώσεις του γαύρου, τοποθετήθηκε χοντρό αλάτι ώστε να υπάρχει πλήρης κάλυψη από αυτό, αλλά και αποφυγή επαφής των ιχθύων μεταξύ τους (Εικ. 3).



Εικόνα 2. Κάλυψη με αλάτι ανάμεσα στις στρώσεις του γαύρου (Μακρυγιάννης 2011).

Στα δισκία με τους ιχθύς και το αλάτι ανοίχτηκαν τέσσερις μικρές τρύπες σε κάθε γωνία με σκοπό να αποβληθούν από εκεί τα υγρά που θα δημιουργούνταν κατά την εισχώρηση του άλατος στα ψάρια. Από πάνω τοποθετήθηκε μια μαρμάρινη πλάκα ώστε να πιέζει ελαφρά και να υπάρχει επαφή μεταξύ ιχθύων και άλατος στο κάθε δισκίο. Στην συνέχεια τα δισκία τοποθετήθηκαν για ωρίμανση-αποθήκευση στους 15 °C.



Εικόνα 3. Τελική εικόνα δισκίου (Μακρυγιάννης 2011).

2.2 Μικροβιολογικά υλικά

Όλα τα μικροβιολογικά υλικά ήταν της LAB M (Lancashire, UK).

2.2.1. Tryptone Soy Broth (TSB)

Το υλικό αυτό είναι ένας ζωμός γενικής χρήσης που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη όλων των μικροοργανισμών οι οποίοι είναι ικανοί να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά..

Το TSB περιέχει σε 1000 ml απιονισμένου νερού:

Enzymatic Digest of Casein	17 g
Enzymatic Digest of Soybean Meal	3 g
Sodium Chloride	5 g
Dipotassium Phosphate	2,5 g
Dextrose	2,5 g

Διαδικασία παρασκευής:

- Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν: 17,0 g Enzymatic Digest of Casein, 3.0g Enzymatic Digest of Soybean Meal, 5,0 g Sodium Chloride, 2,5 g Dipotassium Phosphate και 2,5 g Dextrose.
- Σε ογκομετρικό κύλινδρο μετρήθηκε 1000ml απιονισμένο νερό και μεταγγίστηκε στη φιάλη.
- Τα υλικά αναδεύτηκαν με την χρήση μαγνητικού αναδευτήρα
- Το pH ρυθμίστηκε στους $7,3 \pm 0,2$.
- Με τη χρήση dispenser μεταγγίστηκαν 10ml σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα όπου κλείστηκε με ειδικό πώμα
- Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 min

2.2.2. Tryptone Soy Agar (TSA)

Η απαρίθμηση της OMX έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Agar (TSA) μετά από επώαση για 48 h στους 25 °C. Το TSA είναι ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης το οποίο επιτρέπει την αύξηση όλων των μικροοργανισμών, που μπορούν να σχηματίσουν αποικίες σε εργαστηριακά υλικά (Εικ. 4).

Το TSA περιέχει σε 1000 ml:

Tryptone	15 g
Soy peptone	5 g
Sodium chloride	5 g
Agar	12 g

Διαδικασία παρασκευής:

- Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν: Tryptone 15,0 g, Soy peptone 5,0 g, Sodium chloride 5,0 g, Agar 15,0 g
- Συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό
- Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά.
- Μοιράστηκε σε τρυβλία

Η διαδικασία είναι ίδια για τα TSA 2,5% NaCl και TSA 5% NaCl με τη μόνη διαφορά ότι προστέθηκε 25,0 g και 50,0 g Sodium chloride αντίστοιχα στην κάθε φιάλη των 1000 ml.



Εικόνα 4. Θρεπτικό υπόστρωμα TSA (Μακρυγιάννης 2011).

2.2.3. Tryptone Soy Agar με 2,5% ή 5% αλάτι (TSA 2,5% ή TSA 5%)

Η απαρίθμηση της OMX έγινε επιπλέον και σε θρεπτικά υποστρώματα Tryptone Soy Agar (TSA) με 2,5% και 5% NaCl, και επώαση για 48 h στους 25 °C. Λόγω της ιδιαιτερότητας του τροφίμου καθότι είναι παστό ψάρι, υπήρχαν πιθανότητες να αναπτυχθούν κάποιοι αλατοάντοχοι μικροοργανισμοί. Γι' αυτόν το λόγο χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικά υποστρώματα TSA με 2,5% και 5% NaCl,

Το TSA 2,5% ή TSA 5% NaCl περιέχει σε 1000ml:

Tryptone	15g
Soy peptone	5g
Sodium chloride	25 g ή 50 g
Agar	12g

2.2.4. Red Bile Glucose Agar (VRBGA).

Ο προσδιορισμός των Enterobacteriaceae έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA). Είναι εκλεκτικό υλικό χάρη στη δράση των χολικών (biles) και του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet) και έτσι αναπτύσσονται μόνο τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae. Η επώαση των τρυβλίων γινόταν στους 37 °C για 24 ώρες και ακολουθούσε καταμέτρηση των αποικιών χρώματος μωβ με δακτύλιο (Εικ. 5).

Το VRBGA περιέχει σε 1000 ml:

Yeast extract	3 g
Peptone	7 g
Sodium chloride	5 g
Bile salts	1,5 g
Glucose	10 g
Neutral red	0,03 g

Crystal violet	0,002 g
Agar	12 g

Διαδικασία παρασκευής:

- Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν: Yeast Extract 3,0 g, Balanced Peptone 7,0 g, Sodium chloride 5,0 g, Bile Salts 1,5 g, Glucose 10,0 g, Neutral red 0,03 g, Crystal violet 0,002 g, Agar 12,0 g
- Συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό
- Τοποθετήθηκε η φιάλη σε συσκευή βρασμού και αναδεύτηκε με μαγνητικό αναδευτήρα έτσι ώστε να διαλυθούν τα υλικά (δεν χρειάζεται αποστείρωση).



Εικόνα 5. Θρεπτικό υπόστρωμα VRBGA (www.oxid.com).

2.2.6. Mann Rogosa Sharpe agar (MRS)

Ο προσδιορισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα Mann Rogosa Sharpe agar (MRS). Το οξικό νάτριο καθώς και το pH του που βρίσκεται στο 7 καταστέλλουν την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών. Η επώαση των τρυβλίων γινόταν για 96 h στους 37 °C (Εικ. 6).

Το MRS περιέχει σε 1000 ml:

Mixed Peptones	10,0 g
Yeast Extract	5,0 g
Beef Extract	10,0 g
Glucose	20,0 g

Potassium phosphate	2,0 g
Sodium acetate	5,0 g
Magnesium sulphate	0,2 g
Manganese sulphate	0,05 g
Tween	1,08 g
Ammonium citrate	2,0 g

Διαδικασία παρασκευής:

- Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν: Mixed Peptones 10,0 g, Yeast Extract 5,0 g, Beef Extract 10,0 g, Glucose 20,0 g, Potassium phosphate 2,0 g, Sodium acetate 5,0 g, Magnesium sulphate 0,2 g, Manganese sulphate 0,05 g, Tween 1,08 g, Ammonium citrate 2,0 g
- Συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό.
- Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 min.



Εικόνα 6. Θρεπτικό υπόστρωμα MRS (www.oxoid.com).

2.2.7. Baird Parker

Ο προσδιορισμός του *Staphylococcus aureus* σύμφωνα με τον Baird Parker (1962), πραγματοποιείται σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Baird Parker. Αυτό περιέχει χλωριούχο λίθιο και τελουρίτη για την αναστολή ανάπτυξης των μη επιθυμητών μικροοργανισμών, ενώ το πυροσταφυλικό και η γλυκίνη διεγείρουν εκλεκτικά την

ανάπτυξη των σταφυλόκοκκων. Οι αποικίες που σχηματίζονται έχουν μαύρο χρώμα. Η επώαση των τρυβλίων γινόταν για 48 h στους 37 °C (Εικ. 7).

Το Baird Parker περιέχει σε 1000 ml:

Mixed Peptones	10,0 g
Yeast Extract	5,0 g
Beef Extract	1,0 g
Sodium pyruvate	14,0 g
Glycine	12,0 g
Lithium chloride	5,0 g
Agar	15,0 g
Μείγμα κρόκου αυγού και τελουρίτη	50 ml

Διαδικασία παρασκευής:

- Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 58 g από το Baird Parker.
- Συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό.
- Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.
- Τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για να φτάσει σε θερμοκρασία 45 °C.
- Προστέθηκε ασηπτικό μείγμα κρόκου αυγού και τελουρίτη.
- Μοιράστηκε σε τρυβλία.



Εικόνα 7. Εκλεκτικό υπόστρωμα Baird Parker με αποικίες *Staphylococcus aureus* (Μακρυγιάννης 2011).

2.2.8. Palcam Agar

Ο προσδιορισμός της *Listeria monocytogenes* πραγματοποιείται με το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Palcam σύμφωνα με τους Van Netten et al. (1989). Η σύνθεσή του αναστέλλει την ανάπτυξη όλων των κατά Gram θετικών βακτηρίων αλλά και των περισσότερων Gram αρνητικών βακτηρίων. Η εκλεκτικότητά του οφείλεται στα συστατικά του, όπως πολυμυξίνη, acriflavin, κεφαζιμίνη και χλωριούχο λίθιο. Η *Listeria monocytogenes* εμφανίζεται με χρώμα πράσινο ελιάς στις αποικίες της και όταν βρίσκονται πολλές μαζί το πράσινο μετατρέπεται σε μαύρο. Η επώαση των τρυβλίων γινόταν για 24 - 48 h στους 37 °C (Εικ. 8).

Το Palcam περιέχει σε 1000 ml:

Peptone	23,0 g
Yeast Extract	3,0 g
Starch	1,0 g
Sodium chloride	5,0 g
Agar	13,0 g
D(-)μαννιτόλη	10,0 g
Κιτρικό αμμώνιο σιδήρου (III)	0,5 g
Εσκουλίνη	0,8 g
Glucose	0,5 g
Sodium chloride	15,0 g
Ερυθρό φαινόλης	0,08 g

Διαδικασία παρασκευής:

- Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 71,8 g σκόνης από το Palcam.
- Συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό.
- Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.

- Τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για να φτάσει σε θερμοκρασία 45 °C.
- Προστέθηκαν ασηπτικά, το περιεχόμενο ενός φιαλιδίου με εκλεκτικό αντιβιοτικό για την *Listeria*.
- Μοιράστηκε σε τρυβλία.



Εικόνα 8. Εκλεκτικό υπόστρωμα Palcam με αποικίες *Listeria monocytogenes* (Μακρυγιάννης 2011).

2.2.9. Xylose Lysine Deoxycholate (XLD)

Ο προσδιορισμός της *Salmonella* spp. γίνεται με το εκλεκτικό υπόστρωμα XLD (Xylose Lysine Deoxycholate). Η σύνθεσή του επιτρέπει την απομόνωση και διαφοροποίηση παθογόνων εντεροβακτηρίων, όπως *Shigella* spp και *Salmonella* spp. Η *Salmonella* spp. εμφανίζει ίδιο χρώμα με αυτό του υποστρώματος (διαυγές, σκούρο, κόκκινο), ημιδιαφανείς με μαύρο κέντρο. Η επώαση των τρυβλίων γινόταν για 24 - 48 h στους 37 °C (Εικ. 9).

Το XLD περιέχει σε 1000 ml:

Yeast Extract	3,0 g
Sodium Chloride	5,0 g
Xylose	3,5 g
Lactose	7,5 g
Sucrose	7,5 g

L-Lysine	5,0 g
Sodium Desoxycholate	2,5 g
Sodium Thiosulfate	6,8 g
Ferric Ammonium Citrate	0,8 g
Phenol Red	0,08 g
Agar	13,5 g

Διαδικασία παρασκευής:

- Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 55 g σκόνης από το XLD.
- Συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό.
- Τοποθετήθηκε η φιάλη σε συσκευή βρασμού και αναδεύτηκε με μαγνητικό αναδευτήρα έτσι ώστε να διαλυθούν τα υλικά (δεν χρειάζεται αποστείρωση).
- Μοιράστηκε σε τρυβλία.



Εικόνα 9. Επιλεκτικό υπόστρωμα XLD με αποικίες *Salmonella spp* (www.oxid.com).

2.2.10. Rose bengal Chloramphenicol Agar (RBC Agar)

Το Rose bengal Chloramphenicol Agar (RBC Agar) είναι ένα εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα, που χρησιμοποιείται για την απομόνωση ζυμών και μυκήτων. Οι αποικίες εμφανίζονται με χρώμα ροζ. Η επώαση των τρυβλίων γινόταν για 48-72 h στους 25°C (Εικ. 10).

Το RBC περιέχει σε 1000 ml:

Mycological peptone	5,0 g
Dextrose	10,0 g
Xylose	3,5 g
Monopotassium phosphate	1,0 g
Magnesium sulfate	0,5 g
Rose bengal	0,05 g
Chloramphenicol	0,1 g
Agar	15,5 g

Διαδικασία παρασκευής:

- Σε μία φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκε και προστέθηκε 32,15 g από το RBC.
- Συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό.
- Τοποθετήθηκε η φιάλη σε συσκευή βρασμού και αναδεύτηκε με μαγνητικό αναδευτήρα έτσι ώστε να διαλυθεί εντελώς.
- Αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 min.
- Μοιράστηκε σε τρυβλία.



Εικόνα 10. Επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα RBC με ζύμες και μύκητες (www.oxid.com).

2.2.11. Hugh and Leifson medium

Για την δοκιμή του αερόβιου και αναερόβιου (ζυμωτικού) μεταβολισμού χρησιμοποιήθηκε η τροποποιημένη μορφή του μέσου καλλιέργειας των Hugh και Leifson (1953).

Το Hugh and Leifson θρεπτικό υλικό περιέχει σε 1000 ml :

Peptone	2,0 g
NaCl	5,0 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
Agar	3,0 g
Bromothymol blue (1% aqueous)	3,0 ml

2.2.12. Ημιστέρεο μέσο σύμφωνα με τους Gram et al. (1987)

Για την ανίχνευση της ικανότητας μετατροπής του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης σε τριμεθυλαμίνη και την παραγωγή υδρόθειου από διάφορα βακτήρια χρησιμοποιήθηκε το ημιστέρεο μέσο σύμφωνα με τους Gram et al. (1987), το οποίο περιέχει σε 1000 ml τα κάτωθι συστατικά:

Bacteriological peptone	20,0 g
Meat extract	3,0 g
Yeast extract	3,0 g
NaCl	4,0 g
K ₂ HPO ₄	4,0 g
KH ₄ PO ₄	5,6 g
Ferric citrate	0,3 g
Sodium thiosulphate	0,466 g
MgSO ₄	2,0 g
Resazurin	0,01 g

L-cysteine	0,6 g
Agar	4,0 g

Το pH ρυθμίζεται στο 6,8

2.3. Εμβολιασμός με παθογόνους

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι *Listeria monocytogenes* Scott A, *Salmonella* Enteridis PT4 και *Staphylococcus aureus* NCBF 1499 και προμηθεύτηκαν από την Τράπεζα Μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Ήταν αποθηκευμένοι σε TSB με 20 % (v/v) γλυκερόλη σε θερμοκρασία -20 °C. Με τον μικροβιολογικό κρίκο, ελήφθησαν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί και εμβαιπίστηκαν σε φρέσκο TSB όπως φαίνεται και στην εικόνα 11. Μετά από 24 ώρες στους 37 °C, οι μικροοργανισμοί εξαπλώθηκαν σε τρυβλία με TSA και επώαστηκαν ξανά στους 37 °C για 24 ώρες. Μετά από 24 ώρες ελήφθησαν καθαρές αποικίες των παθογόνων μικροοργανισμών, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για να εμβολιάσουν νέο TSB και επώαστηκαν ξανά στους 37 °C για 24 ώρες, ώστε οι καθαρές και ανανεωμένες καλλιέργειες να χρησιμοποιηθούν για το πείραμα.



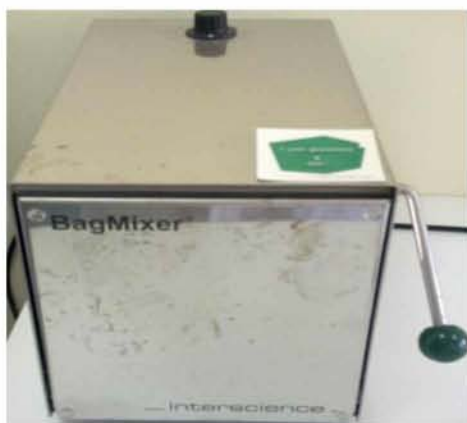
Εικόνα 11. Μέθοδος βαπτίσματος σε σωληνάκι (www.oxoid.com).

Οι υγρές καλλιέργειες *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteridis και *Staphylococcus aureus* έφθασαν σε πληθυσμό περίπου 10^9 cfu/ml, οπότε

πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο MRD (Maximum Recovery Diluent - 0,85% NaCl, 0.1% peptone) και κατόπιν όγκοι (2-3 ml) των βακτηριακών εναιωρημάτων από την κατάλληλη αραιώση χρησιμοποιήθηκαν για να επιμολύνουν το προϊόν με αρχικές συγκεντρώσεις περί των 10^5 cfu/g.

2.4. Μικροβιολογική ανάλυση

Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν δύο φορές ασηπτικά 5 g από τη σάρκα και τον ιστό του γαύρου, τα οποία τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένη σακούλα που περιείχε 45 ml MRD. Πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση του δείγματος σε συσκευή τύπου Stomacher (Εικ. 12) για 1-2 min και ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις σε MRD.



Εικόνα 12. Ομογενοποιητής Bag Mixer (τύπου Stomacher) (Μακρυγιάννης 2011).

Η απαρίθμηση των μικροοργανισμών πραγματοποιούνταν με δύο τεχνικές ανάλογα με τον μικροοργανισμό και το θρεπτικό υπόστρωμα:

- Στην πρώτη περίπτωση έγινε με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique), εναιωρήματος όγκου 0.1 ml στα εξής θρεπτικά υλικά : TSA και TSA 2,5% και 5%NaCl, Rose Bengal Chloramphenicol (RBC), Baird Parker Agar (BP), Palcam Agar (P) και Xylose Lysine Deoxycholate (XLD).
- Στην δεύτερη περίπτωση έγινε με την τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plate technique). Αρχικά τοποθετείται γνωστός όγκος (1ml) από το δείγμα σε τρυβλίο και στην συνέχεια γίνεται μετάγγιση του θρεπτικού υλικού, που περιέχει άγαρ και βρίσκεται σε θερμοκρασία 45 °C. Τα Θρεπτικά υλικά για τα οποία

ακολουθήθηκε αυτή η μέθοδος είναι τα εξής: Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) και Mann Rogosa Sharpe agar (MRS).

2.5. Μέτρηση pH

Ως pH του προϊόντος, ορίστηκε αυτό που μετριόταν κατά την πρώτη αραιώση στο ομογενοποιημένο δείγμα. Για την μέτρηση χρησιμοποιήθηκε πεχάμετρο, τύπου pH 730 inoLab WTW series (Εικ. 13). Το πεχάμετρο ξεπλενόταν κάθε φορά και πριν και μετά την χρήση του με απιονοσμένο νερό, για να αποφευχθεί η μεταφορά δείγματος που θα επηρέαζε το pH του επόμενου. Τακτικά δοκιμάζονταν ρυθμιστικά διαλύματα γνωστού pH για να γίνει βαθμονόμηση.

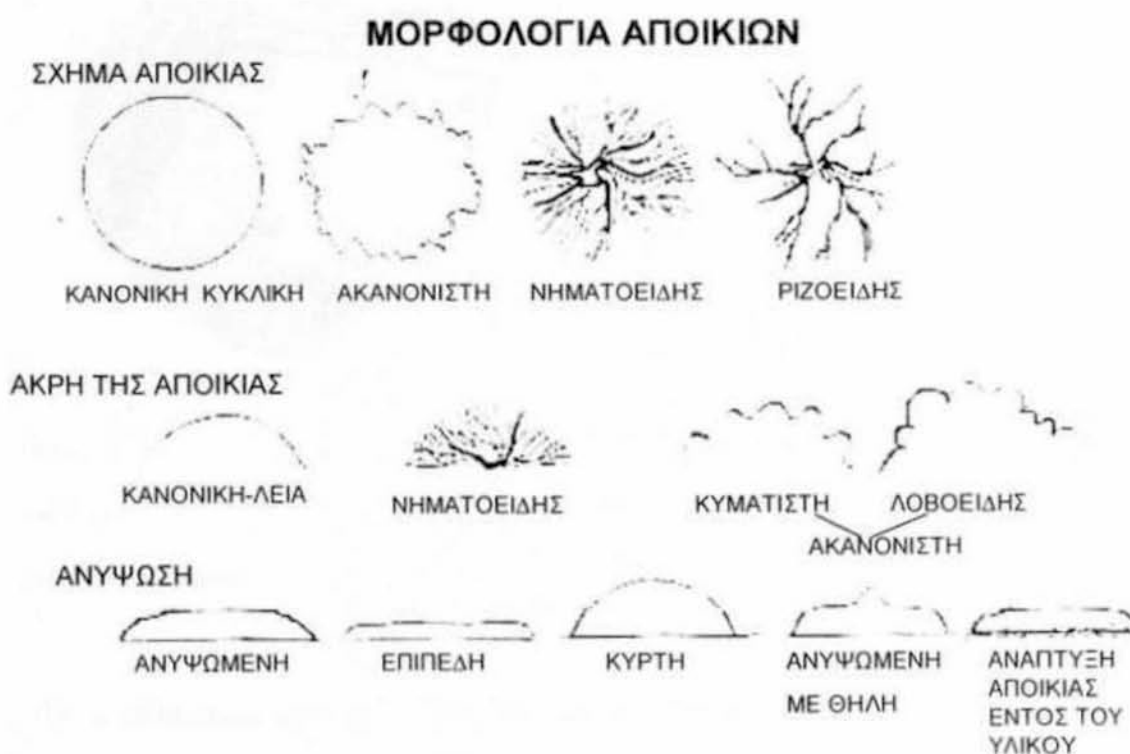


Εικόνα 13. Πεχάμετρο 730 inoLab WTW series που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις. (Σάββα 2010)

2.6. Ταυτοποίηση αποικιών

Η ταυτοποίηση ήταν διερευνητική, διότι δεν ήταν στους αρχικούς στόχους του πειράματος. Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης είναι προσεγγιστικά διότι για τον ακριβή προσδιορισμό ιδιαίτερα σε επίπεδο είδους απαιτούνται περισσότερα μικροβιολογικά τεστ. Για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στο TSA κατά την έναρξη του πειράματος, την εικοστή πρώτη και την τεσσαρακοστή τρίτη ημέρα αποθήκευσης. Αρχικά οι αποικίες ομαδοποιήθηκαν με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (Εικ. 14).

Κατόπιν με την βοήθεια αποστειρωμένου βακτηριολογικού κρίκου ελήφθησαν ποσότητες από τις προαναφερθείσες ομαδοποιημένες αποικίες και μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 9 ml TSB. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για επώαση στους 25 °C για 24 ώρες. Κατόπιν οι μικροοργανισμοί μεταφέρθηκαν σε τρυβλία TSA υπό ασηπτικές συνθήκες με τη μέθοδο της γραμμωτής επίστρωσης (streaking). Αφού τοποθετήθηκαν τα τρυβλία για επώαση στους 25 °C για 48-72 h, πραγματοποιήθηκαν οι εξής διαδικασίες για την ταυτοποίησή τους:



Εικόνα 14. Ομαδοποίηση των αποικιών με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (Μποζιάρης 2009)

- Χρώση Gram, σχήμα του μικροβιακού κυττάρου και παρουσία σπορίων (Harring and McCance 1976).
- Δοκιμή της οξειδάσης (Harring and McCance 1976).
- Δοκιμή της καταλάσης (Harring and McCance 1976).

- Δοκιμή αερόβιου και αναερόβιου μεταβολισμού της γλυκόζης (Hugh and Leifson 1953).
- Μετατροπή του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης σε τριμεθυλαμίνη και παραγωγή υδρόθειου (Gram et al. 1987).

2.6.2. Περιγραφή των διαδικασιών ταυτοποίησης

2.6.2.1. Χρώση Gram, σχήμα του μικροβιακού κυττάρου και παρουσία σπορίων

Σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετήθηκε μια σταγόνα απιονισμένο νερό. Υπό ασηπτικές συνθήκες, με την χρήση λύχνου Bunsen, επιλέχθηκε μια αποικία από τις ανανεωμένες καλλιέργειες και τοποθετήθηκε στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Στην συνέχεια έγινε προσήλωση πάνω από τη φλόγα με προσοχή, ώστε να μην καταστραφούν τα κύτταρα και κατόπιν ξεπλύθηκε με διάλυμα κρυσταλλικού ιωδούς (crystal violet) για ένα-δύο λεπτά. Καθαρίστηκε προσεκτικά με απιονισμένο νερό και προστέθηκε διάλυμα ιωδίου Lugol για ένα λεπτό και κατόπιν ξεπλύθηκε με αιθανόλη 95%. Τέλος το παρασκεύασμα ξεπλύθηκε με διάλυμα σαφρανίνης για 20-30 δευτερόλεπτα και αφού ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό και στεγνώθηκε τοποθετήθηκε στο μικροσκόπιο.

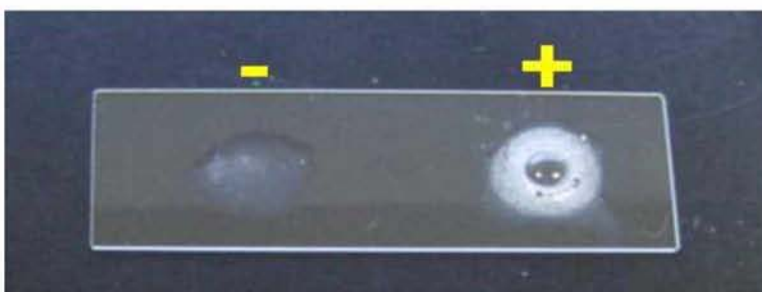
Τα βακτήρια διακρίνονται σε Gram(-) αν εμφανίσουν ροζ χρώμα και σε Gram(+) αν εμφανίσουν σκούρο μπλε χρώμα. Αυτή η διαφορική χρώση οφείλεται στην διαφορετική δομή του κυτταρικού τοιχώματος. Με την μικροσκοπική παρατήρηση εκτός από την χρώση παρατηρείται και το σχήμα του μικροβιακού κυττάρου, αν είναι δηλαδή βάκιλος, κόκκος, ή κοκκο-βάκιλος.

2.6.2.2. Δοκιμή της οξειδάσης

Στον πυθμένα ενός άδειου τρυβλίου τοποθετήθηκε διηθητικό χαρτί και εμποτίζεται με 1-2 σταγόνες από το αντιδραστήριο Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1%. Στην συνέχεια με μια αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα μεταφέρεται ποσότητα από την καλλιέργεια και τοποθετείται στην επιφάνεια του διηθητικού χαρτιού. Η δημιουργία χρώματος (μωβ) μέσα σε 15-20'' μας δηλώνει τη θετική αντίδραση οξειδάσης, ενώ σε στην αρνητική αντίδραση δεν εκδηλώνεται μεταβολή του χρώματος.

2.6.2.3. Δοκιμή της καταλάσης

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί μέσω της ιδιότητας του να καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με απελευθέρωση οξυγόνου. Το H_2O_2 είναι υποπροϊόν της αναπνοής και είναι θανατηφόρο για τα κύτταρα. Για την δοκιμή μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα μια σταγόνα διαλύματος υπεροξειδίου του θείου (H_2O_2) 3%. Στη συνέχεια με κρίκο μεταφέρεται μια ποσότητα από την καλλιέργεια του μικροοργανισμού και αραιώνεται με διάλυμα H_2O_2 . Αν παρατηρηθούν μακροσκοπικά φυσαλίδες σημαίνει ότι ο οργανισμός διαθέτει το ένζυμο της καταλάσης στα κύτταρα του (Harring and McCance 1976) (Εικ. 15).



Εικόνα 15. Δοκιμή της καταλάσης (Σάββα 2010).

2.6.2.4. Δοκιμή αερόβιου και αναερόβιου μεταβολισμού της γλυκόζης

Για τη δοκιμή αερόβιου και αναερόβιου μεταβολισμού χρησιμοποιήθηκε η τροποποιημένη μορφή του μέσου καλλιέργειας των Hugh και Leifson (1953). Αφού το υλικό τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα, εμβολιάστηκε η κάθε αποικία με βακτηριολογική βελόνα σε κάθετη φορά. Ακλούθησε επώαση στους $20^{\circ}C$ για δύο έως επτά ημέρες. Αν το αρχικό πράσινο χρώμα του δείκτη μεταβαλλόταν σε πορτοκαλοκίτρινο, στην επιφάνια του σωλήνα, αποτελούσε ένδειξη του οξειδωτικού χαρακτήρα της εξεταζόμενης αποικίας. Σε περίπτωση που συνέβαινε η ίδια χρωματική μεταβολή αλλά στο μήκος όλου του σωλήνα, η ένδειξη αυτή σημαίνει τον ζυμωτικό μεταβολισμό των κυττάρων. Τέλος όταν η μεταβολή του δείκτη ήταν σε μπλε ή αμελητέα τότε η μεταβολή ήταν αλκαλική ή δεν υπήρχε μεταβολή.

2.6.2.5. Μετατροπή του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης σε τριμεθυλαμίνη και παραγωγή υδρόθειου

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκε αποστειρωμένο ημιστερεό μέσο σύμφωνα με τους Gram et al. (1987) το οποίο εμβολιάστηκε με τη χρήση βακτηριολογικής βελόνας. Η επώαση των δοκιμαστικών σωληναρίων έγινε στους 25°C από 3 έως 7 ημέρες. Μετά την επώαση εάν παρατηρείται μεταβολή στη χρωστική του μέσου από ρόδινο σε κίτρινο, σημαίνει ότι ο μικροοργανισμός είναι ικανός για την μετατροπή του TMAO σε TMA (Εικ. 16). Ενώ εάν παρατηρείται και παραγωγή θειούχου σιδήρου (μαύρο χρώμα) τότε ο μικροοργανισμός είναι ικανός για την παραγωγή υδρόθειου από θειοθειικό άλας ή/και κυστεΐνη.



Εικόνα 16. Δοκιμή μετατροπής του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (TMAO) σε τριμεθυλαμίνη (TMA) (Σάββα 2010).

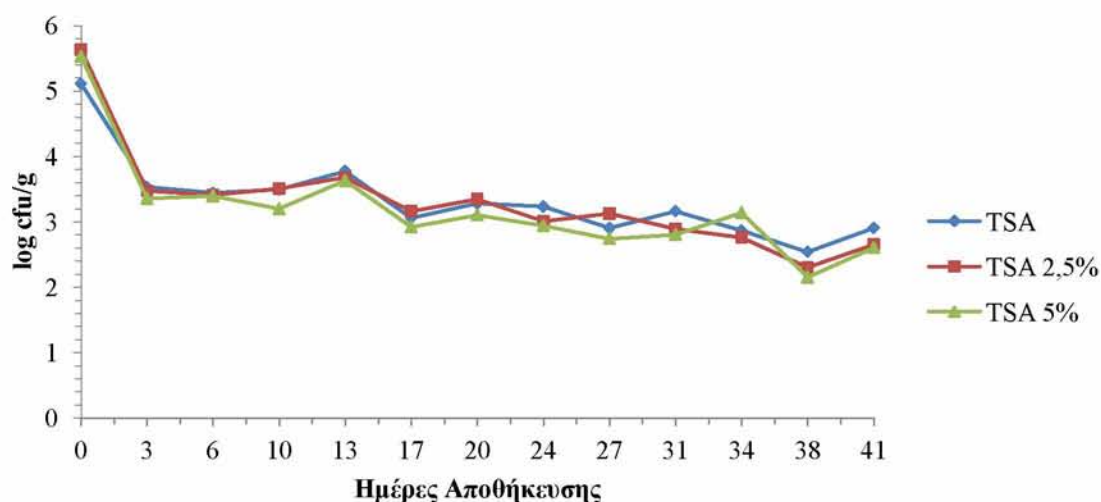
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μικροβιακή ανάπτυξη

3.1.1. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)

3.1.1.1. Πρώτο πείραμα

Η μεταβολή του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (OMX) που καταμετρήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA, TSA 2,5% και TSA 5% περιεκτικότητας σε αλάτι και σε θερμοκρασία 15°C παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.1.



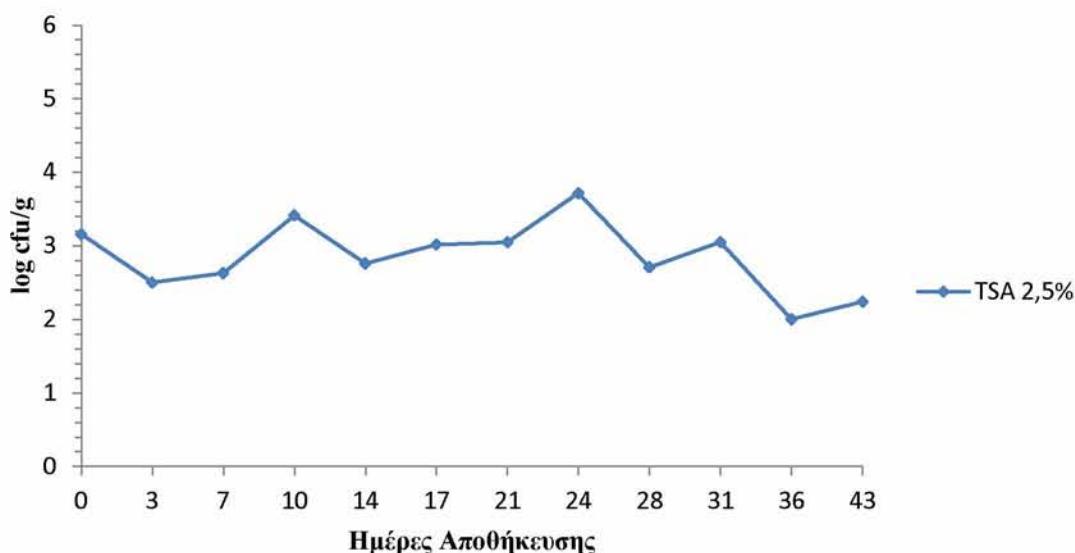
Σχήμα 3.1. Μεταβολή της OMX κατά την διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων.

Κατά την αποθήκευση του παστού γαύρου παρατηρήθηκε ότι η OMX τις πρώτες μέρες παρουσιάζει απότομη πτώση, από 5,5 logs cfu/g σε 3,5 logs cfu/g, που πιθανόν να οφείλεται στο stress λόγω της χαμηλής ενεργότητας νερού. Τις επόμενες μέρες δεν παρατηρήθηκε μεταβολή του πληθυσμού ως την 10^η μέρα. Η σταδιακή μείωση των μικροοργανισμών αρχίζει από την 13^η μέρα, αφού έχει φτάσει τα 4 logs cfu/g, και καταλήγει στο τέλος του πειράματος τα 2,7 logs cfu/g.

Παρατηρήθηκε ότι και τα θρεπτικά υποστρώματα τα οποία δημιουργήθηκαν για την καταγραφή των αλόφιλων μικροοργανισμών ακολούθησαν σχεδόν ίδια πορεία και διακύμανση στο μικροβιακό τους φορτίο.

3.1.1.2. Δεύτερο Πείραμα

Αφού δεν παρατηρήθηκε διαφορετική συμπεριφορά στα θρεπτικά υποστρώματα, που χρησιμοποιήθηκαν για την απαρίθμηση της OMX, στο δεύτερο πείραμα έγιναν μετρήσεις μόνο σε υπόστρωμα TSA με 2,5% αλάτι. Η μεταβολή της OMX σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA με 2,5% και περιεκτικότητα σε αλάτι παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.2.

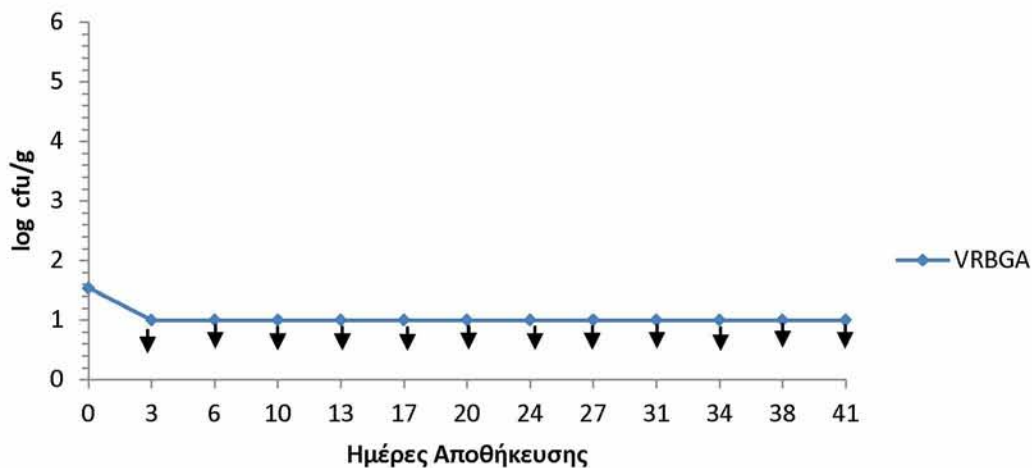


Σχήμα 3.2. Μεταβολή της OMX κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων.

Κατά την αποθήκευση του παστού γαύρου παρατηρούμε ότι η OMX δεν ξεπέρασε τον πληθυσμό των 4 logs cfu/g καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Ωστόσο ο αρχικός πληθυσμός ήταν στους 3,2 log cfu/g ενώ την 43^η μέρα (πέρας πειράματος) περίπου έναν λογάριθμο πιο κάτω (2,4 cfu/g).

3.1.2. Enterobacteriaceae

Η μεταβολή του πληθυσμού των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae που καταμετρήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα VRBGA παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3.



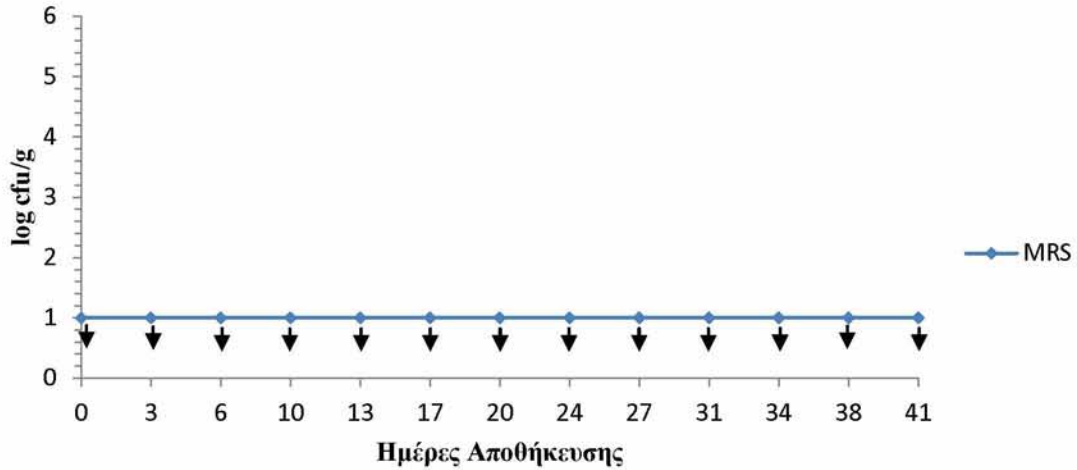
Σχήμα 3.3. Μεταβολή των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων. Τα βελάκια αποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης των 10 cfu/g.

Αρχικά ο πληθυσμός των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae που παρατηρήθηκε ήταν περίπου 1,6 log cfu/g. Ωστόσο ο πληθυσμός μειώθηκε και μετά την 3^η μέρα παρέμεινε κάτω από το όριο καταμέτρησης των 10 cfu/g σε όλη την διάρκεια ωρίμανσης-συντήρησης.

3.1.3. Οξυγαλακτικά

Η μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών που καταμετρήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS φαίνεται στο Σχήμα 3.4.

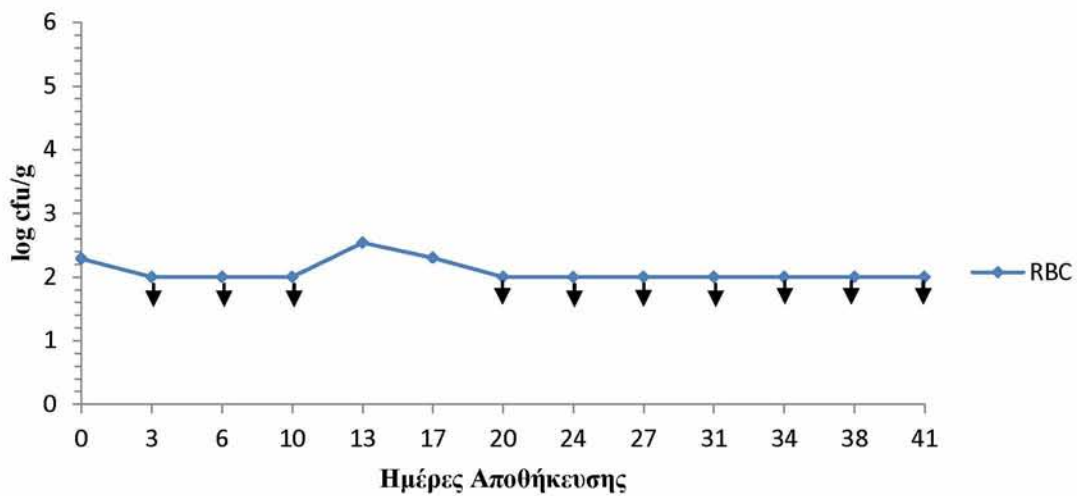
Κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου στους 15°C, ουσιαστικά δεν βρέθηκε πληθυσμός οξυγαλακτικών βακτηρίων πάνω από το επίπεδο καταμέτρησης των 10 cfu/g.



Σχήμα 3.4. Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων. Τα βελιάκια δεικνύουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσής τους.

3.1.4. Ζύμες και μύκητες

Η μεταβολή του πληθυσμού ζυμών-μυκήτων που καταμετρήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα RBC παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.5.



Σχήμα 3.5. Μεταβολή του πληθυσμού ζυμών-μυκήτων κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C. Τα σημεία είναι ο

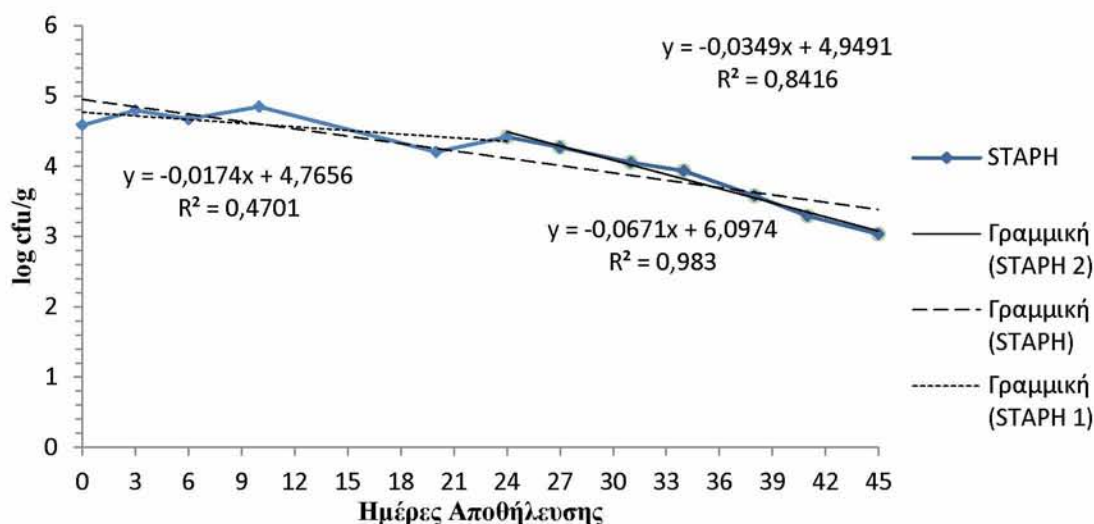
μέσος όρος δύο επαναλήψεων. Τα βελάκια δεικνύουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης τους.

Στην αρχική μέτρηση ο πληθυσμός από ζύμες και μύκητες ήταν 2,3 log cfu/g. Από την 3^η έως την 10^η και από την 20^η έως το τέλος του πειράματος ο πληθυσμός τους παρέμεινε κάτω από το όριο καταμέτρησης των 10² cfu/g. Η μόνη ένδειξη παρατηρήθηκε την 13^η μέρα όπου υπήρξε μια μικρή αύξηση του πληθυσμού στο επίπεδο των 2,5 log cfu/g, αλλά την 17^η μέρα έπεσε στο 2,3 log cfu/g και συνέχισε κάτω από το όριο καταμέτρησης.

3.1.5. *Staphylococcus aureus*

3.1.5.1. Πρώτο πείραμα

Μετά τον εμβολιασμό με τον παθογόνο μικροοργανισμό ο αρχικός πληθυσμός ήταν περίπου της τάξης 5 log cfu/g. Στο παρακάτω Σχήμα 3.6, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού *Staphylococcus aureus* κατά την αποθήκευση-ωρίμανση της πρώτης παρτίδας του παστού γαύρου.

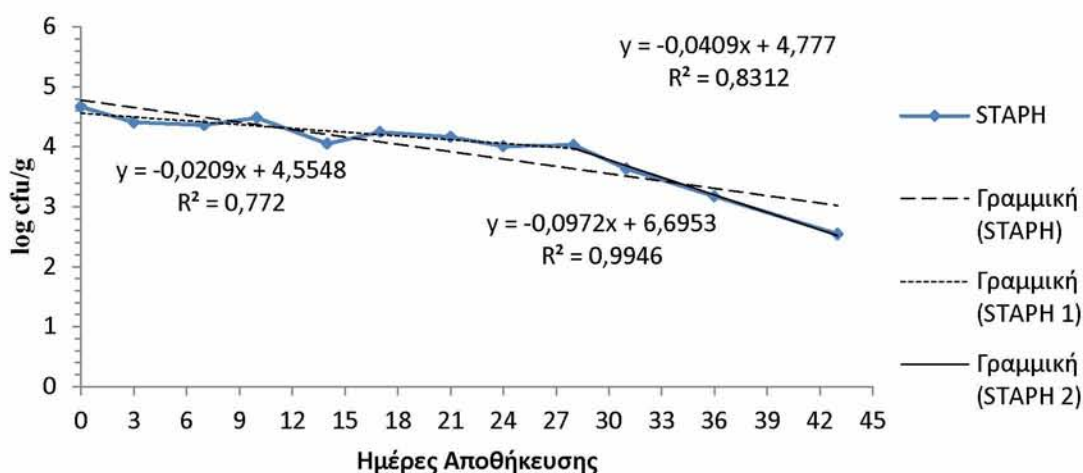


Σχήμα 3.6. Μεταβολή των αποικιών του παθογόνου μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus* κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων (—◆—). Γραμμή τάσης σε όλη τη διάρκεια ωρίμανσης (----), για τις 24 πρώτες μέρες (-----) και για τις μέρες 24-45 (—).

Αρχικά παρατηρήθηκε, ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο περιβάλλον με αλάτι, καθώς μέχρι την 24^η μέρα δεν υπήρξε καμία μεγάλη μεταβολή στον πληθυσμό του. Στην συνέχεια παρατηρείται μείωση του πληθυσμού με αυξανόμενο ρυθμό έως την τελευταία ημέρα του πειράματος (45^η ημέρα). Ωστόσο ακόμη και μετά από 45 ημέρες ωρίμανσης-αποθήκευσης στους 15°C ο πληθυσμός δεν μειώθηκε κάτω από 3.0 log cfu/g.

3.1.5.2. Δεύτερο πείραμα

Μετά τον εμβολιασμό με τον παθογόνο μικροοργανισμό ο αρχικός πληθυσμός ήταν περίπου της τάξης 4,7 log cfu/g. Στο παρακάτω Σχήμα 3.7, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού *Staphylococcus aureus* κατά την αποθήκευση-ωρίμανση του δεύτερου πειράματος παστού γαύρου



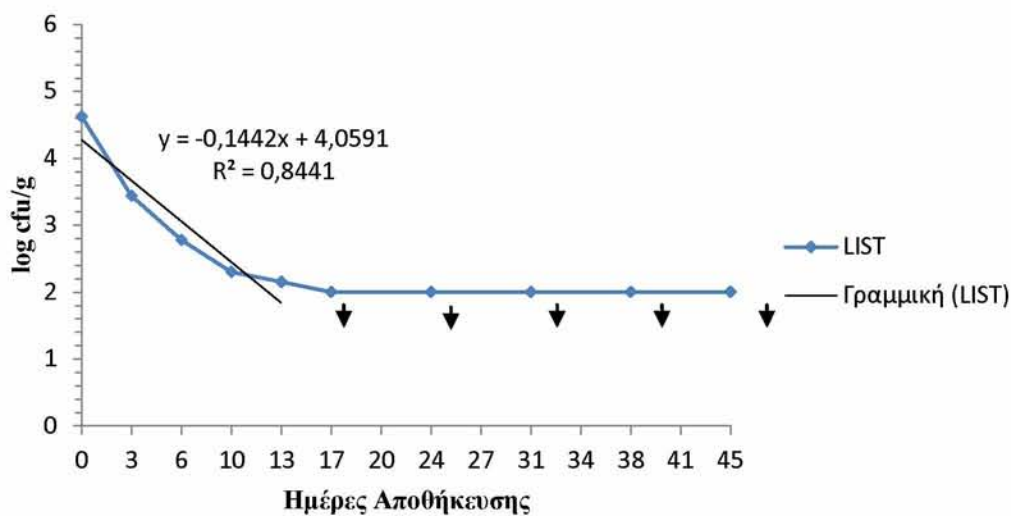
Σχήμα 3.7. Μεταβολή των αποικιών του παθογόνου μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus* κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων (—◆—). Γραμμή τάσης σε όλη τη διάρκεια ωρίμανσης (---), για τις 28 πρώτες μέρες (-----) και για τις μέρες 28-43 (—).

Ο μικροοργανισμός παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο περιβάλλον με αλάτι μέχρι την 10^η μέρα όπου ο πληθυσμός του δεν παρουσίασε καμία μεταβολή. Στη συνέχεια παρατηρείται σταδιακή μείωση του με μικρό ρυθμό ως την 28^η ημέρα και τέλος μείωση με γρηγορότερο ρυθμό έως την τελευταία ημέρα του πειράματος (43^η ημέρα). Ωστόσο ακόμη και μετά από 43 ημέρες ωρίμανσης-αποθήκευσης στους 15°C ο πληθυσμός δεν μειώθηκε κάτω από 2.5 log cfu/g.

3.1.6. *Listeria monocytogenes*

3.1.6.1. Πρώτο πείραμα

Μετά τον εμβολιασμό με τον παθογόνο μικροοργανισμό ο αρχικός πληθυσμός ήταν περίπου της τάξης 5 log cfu/g. Στο παρακάτω Σχήμα 3.8, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού της *Listeria monocytogenes* κατά την αποθήκευση-ωρίμανση της πρώτης παρτίδας του παστού γαύρου.

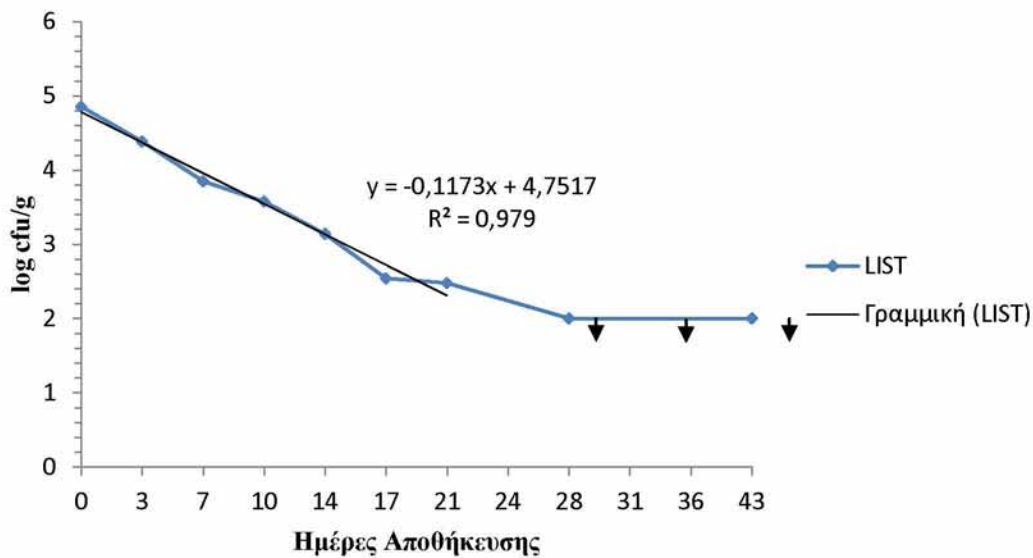


Σχήμα 3.8. Μεταβολή των αποικιών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων. Τα βελάκια δεικνύουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης των 10² cfu/g.

Η *Listeria monocytogenes* φαίνεται ότι δεν ήταν ανθεκτική σε περιβάλλον με υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι. Από 4,6 log cfu/g ο πληθυσμός της μειώθηκε στις 2,4 log cfu/g εντός έξι ημερών. Από την 13^η μέρα ως και την 45^η οι μετρήσεις ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 10² cfu/g.

3.1.6.2. Δεύτερο πείραμα

Μετά τον εμβολιασμό με τον παθογόνο μικροοργανισμό ο αρχικός πληθυσμός ήταν περίπου της τάξης 5 log cfu/g. Στο παρακάτω Σχήμα 3.9, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού της *Listeria monocytogenes* κατά την αποθήκευση-ωρίμανση της δεύτερης παρτίδας του παστού γαύρου.



Σχήμα 3.9. Μεταβολή των αποικιών του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων. Τα βελάκια δεικνύουν, ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης των 10² cfu/g.

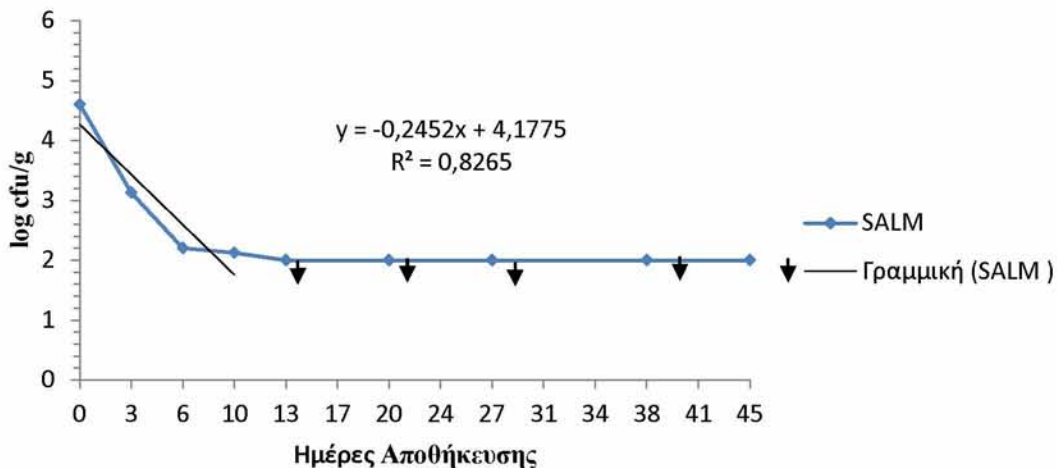
Ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στο δεύτερο πείραμα παρουσίασε σημαντική μείωση από τις πρώτες ημέρες του πειράματος. Ο αρχικός πληθυσμός ήταν 4,8 log cfu/g και μειωνόταν συνεχώς μέσα σε διάστημα 10 ημερών.

Την 28^η μέρα φτάνει στο όριο του μη απαριθμήσιμου πληθυσμού όπου και παρέμεινε ως το τέλος του πειράματος.

3.1.7. *Salmonella* Enteritidis

3.1.7.1. Πρώτο πείραμα

Μετά τον εμβολιασμό με τον παθογόνο μικροοργανισμό ο αρχικός πληθυσμός ήταν περίπου της τάξης 4,2 log cfu/g. Στο παρακάτω Σχήμα 3.10, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού της *Salmonella* sp. κατά την αποθήκευση-ωρίμανση της πρώτης παρτίδας του παστού γαύρου.

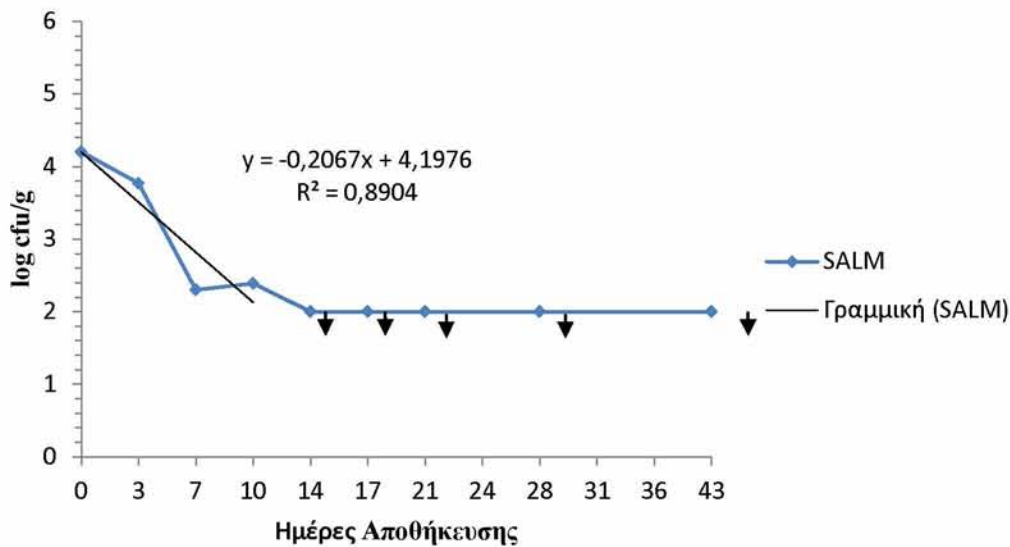


Σχήμα 3.10. Μεταβολή των αποικιών του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* sp. κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων. Τα βελάκια δεικνύουν, ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης των 10² cfu/g.

Η *Salmonella* sp. ως μη αλατοάντοχος μικροοργανισμός δεν παρουσιάζει μεγάλη πιθανότητα επιβίωσης σε ένα αλατισμένο προϊόν. Από την 1^η μέχρι την 6^η μέρα παρουσίασε ραγδαία μείωση, πιο συγκεκριμένα οι αποικίες μειώθηκαν από τις 4,6 log cfu/g σε 2,2 log cfu/g. Από την 6^η έως την 13^η παρατηρήθηκε μείωση με αργούς ρυθμούς. Από εκεί και μετά οι μετρήσεις ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

3.1.7.2. Δεύτερο πείραμα

Μετά τον εμβολιασμό με τον παθογόνο μικροοργανισμό ο αρχικός πληθυσμός ήταν περίπου της τάξης 4,2 log cfu/g. Στο παρακάτω Σχήμα 3.11, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού της *Salmonella* sp. κατά την αποθήκευση-ωρίμανση της δεύτερης παρτίδας του παστού γαύρου. Η καταμέτρηση των μικροοργανισμών έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα XLD.



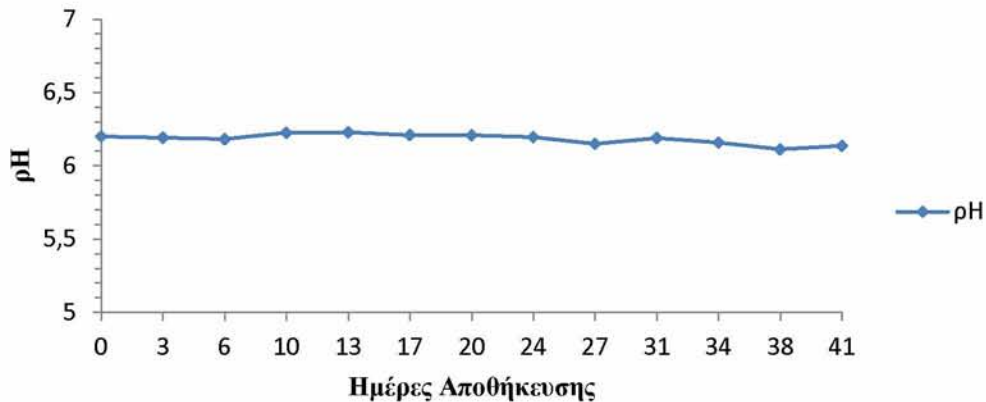
Σχήμα 3.11. Μεταβολή των αποικιών του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* sp. κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων. Τα βελάκια δεικνύουν, ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης των 10² cfu/g.

Η *Salmonella* sp ως μη αλατοάντοχος μικροοργανισμός δεν είχε πολλές πιθανότητες επιβίωσης μετά την επαφή της σε περιβάλλον υψηλής αλατοπεριεκτικότητας. Την 7^η μέρα είχε χάσει 2 λογαρίθμους και έχει μόλις 2,2 log cfu/g αποικίες. Από την 7^η έως την 14^η παρατηρήθηκε με αργούς ρυθμούς μείωση. Από εκεί και μετά οι μετρήσεις ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 10² cfu/g.

3.2. Μεταβολή pH

3.2.1. Πρώτο πείραμα

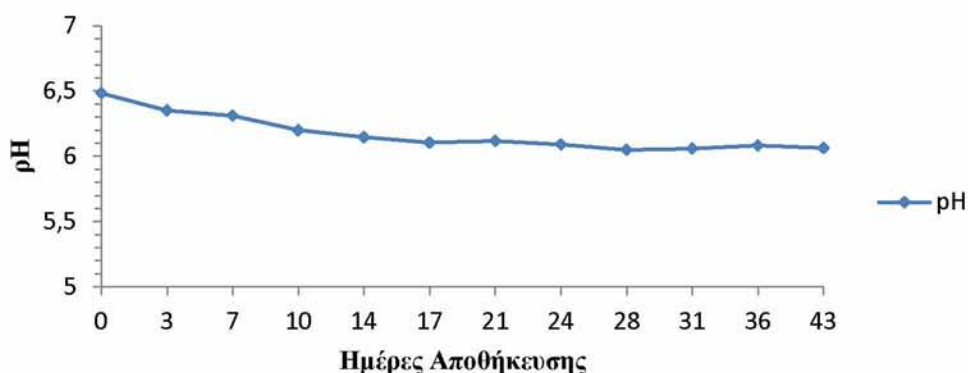
Γενικά δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες αλλαγές στην τιμή του pH κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του γαύρου σε αλατισμένο περιβάλλον. Η τιμή του pH στην αρχή του πειράματος ήταν 6,2 ενώ στο τέλος ήταν 6,14 (41^η μέρα) (Σχ. 3.12).



Σχήμα 3.12. Μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων.

3.2.2. Δεύτερο πείραμα

Γενικά δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες αλλαγές στην τιμή του pH κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του γαύρου σε αλατισμένο περιβάλλον. Ωστόσο η τιμή του pH μειώθηκε κατά μισό βαθμό καθώς στην αρχή του πειράματος ήταν 6,48 ενώ στο τέλος ήταν 6,06 (43^η μέρα) (Σχ. 3.13).



Σχήμα 3.13. Μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C. Τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων.

3.3. Ρυθμός θανάτου των παθογόνων

Παρατηρήθηκε πως ο χρόνος που χρειάζεται για να μειωθεί ο πληθυσμός των παθογόνων μικροοργανισμών κατά έναν λογάριθμο (τιμή D) διαφέρει σημαντικά μεταξύ τους. Για τον *Staphylococcus aureus* η τιμή D στο πρώτο πείραμα είναι 28,6 και στο δεύτερο πείραμα είναι 24,4 ημέρες. Για την *Listeria monocytogene* η τιμή D στο πρώτο πείραμα είναι 6,9 και για το δεύτερο πείραμα είναι 8,5 ημέρες. Αντίστοιχα για την *Salmonella* sp. η D στο πρώτο πείραμα είναι 4,0 και για το δεύτερο πείραμα είναι 4,8 ημέρες (Πίν. 1). Ο *Staphylococcus aureus* φαίνεται να αδρανοποιείται πιο αργά από τους άλλους μικροοργανισμούς και να ακολουθούν η *Listeria monocytogenes* και τέλος η *Salmonella* sp.

Πίνακας 1. Η κλίση της ευθείας κατά την διάρκεια ωρίμανσης-αποθήκευσης του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C για τους παθογόνους *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogene* και *Salmonella* sp (τιμή a) καθώς και ο χρόνος σε ημέρες που χρειάζεται για να μειωθεί ο πληθυσμός τους κατά έναν λογάριθμο (τιμή D).

	Πρώτο πείραμα			Δεύτερο πείραμα		
	STAPH	LIST	SALM	STAPH	LIST	SALM
a	-0,035	-0,1442	-0,2452	-0,041	-0,1173	-0,2067
D	28,6	6,9	4	24,4	8,5	4,8

3.4. Ταυτοποίηση μικροοργανισμών

Όπως προαναφέρθηκε η ταυτοποίηση ήταν διερευνητική, διότι ο αριθμός των φαινοτυπικών τεστ δεν ήταν επαρκής για να γίνει ακριβής προσδιορισμός σε επίπεδο είδους. Οι μικροοργανισμοί που ανιχνεύτηκαν, ως κυρίαρχη αρχική μικροχλωρίδα του παστού γαύρου εικονίζονται στον Πίνακα 2. και στο Σχήμα 3.14. Ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός κυριαρχείται από βάκιλλους, Gram αρνητικούς του γένους *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, όπου καταλαμβάνουν το 57% του συνολικού πληθυσμού. Τα Gram θετικά βακτήρια απαντώνται σε ποσοστό 43%. Σε

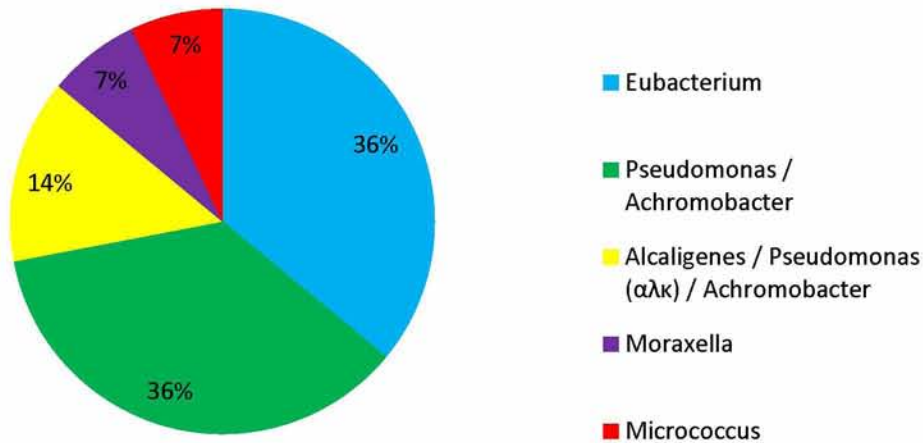
ποσοστό 36% απαντώνται Gram θετικοί βάκιλοι του γένους *Eubacterium* ενώ οι Gram θετικοί κόκκοι του γένους *Micrococcus*, απαντώνται σε μικρό ποσοστό 7%.

Πίνακας 2. Σύνθεση της αρχικής μικροχλωρίδας του παστού γάουρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C.

ΓΕΝΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΣΧΗΜΑ	ΧΡΩΣΗ GRAM	ΚΑΤΑΛΑΣΗ	ΟΞΕΙΔΑΣΗ	ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΓΛΥΚΟΖΗΣ F/O	ΤΜΑΟ/ H ² S	% ΕΠΙ ΤΟΥ ΠΑΘΟΥΣΜΟΥ ΣΤΟ ΤΡΥΒΑΙΟ
<i>Eubacterium</i>	5	Βάκιλοι (R)	+	-	-	- ^α	-/-	36
<i>Pseudomonas / Achromobacter</i>	5	Βάκιλοι (R)	-	+	+	O ^β	-/-	36
<i>Alcaligenes / Pseudomonas (αλκ) / Achromobacter</i>	2	Βάκιλοι (R)	-	+	-	- ^α	-/-	14
<i>Moraxella</i>	1	Βάκιλοι (R)	-	+	+	- ^α	-/-	7
<i>Micrococcus</i>	1	Κόκκοι (S)	+	+	-	- ^α	-/-	7

α: δεν υπήρξε μεταβολή.

β: οξειδωτικός μεταβολισμός.



Σχήμα 3.14 Σύνθεση της αρχικής μικροχλωρίδας του παστού γάουρου (*Engraulis encrasicolus*) στους 15°C.

Τα γένη των μικροοργανισμών που ανιχνεύτηκαν την εικοστή πρώτη μέρα ωρίμανσης-αποθηκείωσης στους 15°C (d=21) ως κυρίαρχη μικροχλωρίδα του παστού γάουρου εικονίζονται στον Πίνακα 3 και στο Σχήμα 3.15. Η αντιστοιχία μεταξύ των Gram θετικών και αρνητικών μικροοργανισμών είναι της τάξεως του 63% και 37%

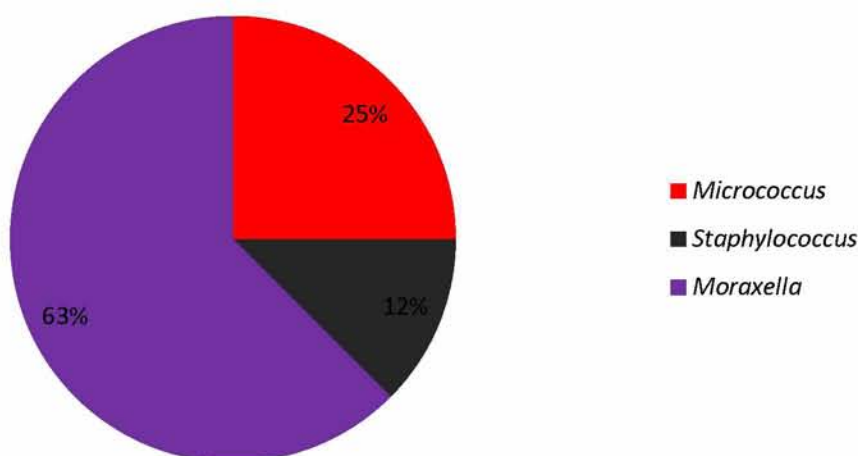
αντίστοιχα. Ο μικροβιακός πληθυσμός κυριαρχείται από βάκιλλους, Gram αρνητικούς του γένους *Moraxella*, όπου καταλαμβάνουν το 63%. Σε ποσοστό 37% απαντώνται Gram θετικοί κόκκοι του γένους *Micrococcus* και *Staphylococcus*.

Πίνακας 3. Σύνθεση της μικροχλωρίδας του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) κατά την εικοστή πρώτη μέρα ωρίμανσης-αποθηκείωσης στους 15°C.

ΓΕΝΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΣΧΗΜΑ	ΧΡΩΣΗ GRAM	ΚΑΤΑΛΛΑΣΗ	ΟΞΕΙΔΑΣΗ	ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΓΛΥΚΟΖΗΣ F/O	ΤΜΑΟ/ H ₂ S	% ΕΠΙ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΣΤΟ ΤΡΥΒΑΙΟ
<i>Micrococcus</i>	2	Κόκκοι (S)	+	+	-	- ^α	-/-	25
<i>Staphylococcus</i>	1	Κόκκοι (S)	+	+	-	F ^γ	-/-	12
<i>Moraxella</i>	5	Βάκιλοι (R)	-	+	+	- ^α	-/-	63

α: δεν υπήρξε μεταβολή.

γ: ζυμωτικός μεταβολισμός.



Σχήμα 3.15. Σύνθεση της μικροχλωρίδας του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) κατά την εικοστή πρώτη μέρα ωρίμανσης-αποθηκείωσης στους 15°C.

Τα γένη των μικροοργανισμών που ανιχνεύτηκαν την τεσσαρακοστή τρίτη μέρα ωρίμανσης-αποθηκείωσης στους 15°C (d=43) ως κυρίαρχη μικροχλωρίδα του παστού γαύρου εικονίζονται στον πίνακα 4. και στο Σχήμα 3.16. Οι Gram αρνητικοί μικροοργανισμοί καταλαμβάνουν ποσοστό της τάξης του 40% των μικροοργανισμών της αρχικής χλωρίδας. Σε αντίθεση με τα Gram θετικά βακτήρια που απαντώνται σε ποσοστό 60%. Ο μικροβιακός πληθυσμός αποτελείται από βάκιλλους, Gram

αρνητικούς του γένους *Pseudomonas*, και *Moraxella*, όπου καταλαμβάνουν το 40%. Σε ποσοστό 33% απαντώνται Gram θετικοί βάκιλοι του γένους *Bacillus* και *Propionibacterium*. Gram θετικοί κόκκοι του γένους *Micrococcus*, απαντώνται σε ποσοστό 27%.

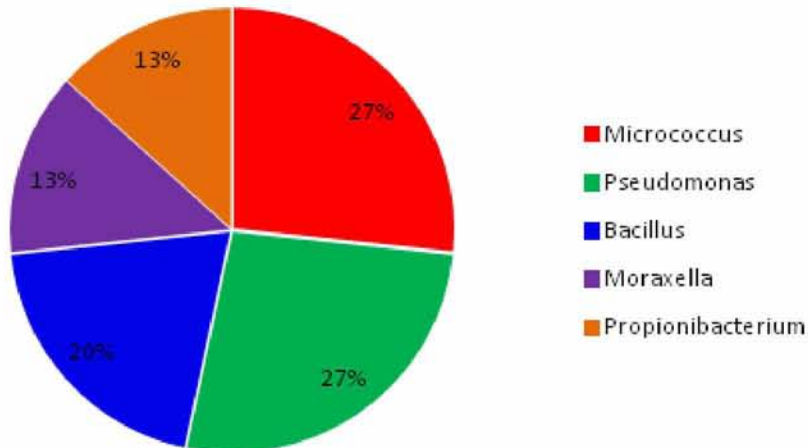
Πίνακας 4. Σύνθεση της μικροχλωρίδας του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) κατά την τεσσαρακοστή τρίτη μέρα ωρίμανσης-αποθηκείωσης στους 15°C.

ΓΕΝΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΣΧΗΜΑ	ΧΡΩΣΗ GRAM	ΚΑΤΑΛΑΣΗ	ΟΞΕΙΔΑΣΗ	ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΓΛΥΚΟΖΗΣ F/O	ΤΜΑΟ/ H ₂ S	% ΕΠΙ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΣΤΟ ΤΡΥΒΑΙΟ
<i>Micrococcus</i>	4	Κόκκοι (S)	+	+	-	- ^α	-/-	27
<i>Pseudomonas</i>	4	Βάκιλοι (R)	-	+	+	O ^β	-/-	27
<i>Bacillus</i>	3	Βάκιλοι (R)	+	+	+	- ^α	-/-	20
<i>Moraxella</i>	2	Βάκιλοι (R)	-	+	+	- ^α	-/-	13
<i>Propionibacterium</i>	2	Βάκιλοι (R)	+	+	+	F ^γ	-/-	13

α: δεν υπήρξε μεταβολή.

β: οξειδωτικός μεταβολισμός.

γ: ζυμωτικός μεταβολισμός.



Σχήμα 3.16. Σύνθεση της μικροχλωρίδας του παστού γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) κατά την τεσσαρακοστή τρίτη μέρα ωρίμανσης-αποθηκείωσης στους 15°C.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για τα αλατισμένα προϊόντα είναι απαραίτητη η ωρίμανσή τους για ένα χρονικό διάστημα πριν από τη διάθεσή τους στην αγορά, προκειμένου να είναι ποιοτικά αλλά και ασφαλή προς κατανάλωση. Ο χρόνος που πρέπει να ωριμάσουν ποικίλει ανάλογα με την πυκνότητα της άλμης που χρησιμοποιείται. Πιο συγκεκριμένα τα προϊόντα που περιέχουν άλμη σε ποσοστό 6-7% πρέπει να κρατηθούν για 10-12 εβδομάδες πριν δοθούν στην κατανάλωση και αυτά με ποσοστό άλμης 8-9% για 5-6 εβδομάδες αντίστοιχα (Horst 1995).

Η αρχική τιμή ολικού μικροβιακού πληθυσμού στο πρώτο πείραμα ήταν περίπου 5,3 log cfu/g και στη δεύτερη 3,2 log cfu/g. Οι ιχθείς αγοράστηκαν σε διαφορετικές περιόδους και όπως είναι φυσικό έχουν και διαφορά στη μικροβιολογική τους ποιότητα. Η παρτίδα του πρώτου πειράματος πιθανόν να ήταν αλιευμένη αρκετές ημέρες πριν, ενώ η δεύτερη φαίνεται ότι ήταν περισσότερο φρέσκια. Ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις η τοποθέτηση τους σε περιβάλλον με υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι, δημιούργησε δυσμενείς συνθήκες για την επιβίωση των μικροοργανισμών αυτών.

Στο πρώτο πείραμα, η μικροβιακή χλωρίδα που αναπτύχθηκε στο TSA, TSA 2,5% και TSA 5%, παρουσιάζει παρόμοια μεταβολή, με αρχικούς πληθυσμούς 5,11, 5,63 και 5,52 log cfu /g αντίστοιχα. Μετά την πάροδο τριών ημερών και λόγω της καταπόνησης των κυττάρων (στρεσάρισμα) από το αλάτι παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού της τάξεως των δύο λογαρίθμων. Στην συνέχεια, η μεταβλητότητα παρουσιάζει σταθερή πτωτική πορεία με μικρή όμως τάση. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και στο δεύτερο πείραμα. Η διαφορά είναι ότι η OMX ξεκινάει με χαμηλότερο μικροβιακό φορτίο και συνεχίζει με μικρή πτωτική πορεία. Πιθανόν, να οφείλεται σε αλατο-άντοχους μικροοργανισμούς. Ο χαρακτηρισμός αυτών των μικροοργανισμών μπορεί να αποτελέσει αντικείμενο μιας μελλοντικής μελέτης.

Σε παρόμοια έρευνα η οποία αφορά φυσικοχημικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του αλατισμένου γαύρου από τους Hernández-Herrero et al. (2002), παρατηρήθηκε πως τα ψυχρότροφα βακτήρια και τα ελαφρώς και μετρίως αλόφιλα μειώθηκαν σημαντικά κατά τις 2 πρώτες εβδομάδες της ωρίμανσης, ενώ στη συνέχεια οι πληθυσμοί μειώθηκαν σταδιακά. Η διαφορά στο δικό μας πείραμα είναι ότι είχαμε υψηλότερο ποσοστό αλατιού στο προϊόν. Σύμφωνα με την ίδια έρευνα, τα εντεροβακτήρια και οι

εντερόκοκκοι μειώθηκαν απότομα κατά την πρώτη εβδομάδα, από 2,8 και 2 log cfu /g σε 0,5 και 0,7 log cfu/g, αντίστοιχα, πράγμα το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με τις δικές μας μετρήσεις.

Σε συγκεντρώσεις αλατιού από 6 έως 8%, τα περισσότερα βακτήρια αδρανοποιούνται ή παρεμποδίζεται η ανάπτυξή τους. Κάποια άλλα βακτήρια και μύκητες, θα προσαρμοστούν και θα καταφέρουν να αυξηθούν σε περιεκτικότητας άλατος από 6 έως 8% αλλά και από 10 έως 13 %. Σε συγκεντρώσεις άλατος πάνω από 12 με 13 % αυτά τα βακτήρια τείνουν να αδρανοποιηθούν ή τουλάχιστον σταματούν να αναπτύσσονται. Τέλος υπάρχουν και βακτήρια, τα οποία ονομάζονται ακραία αλόφιλα και αρχίζουν να αναπτύσσονται σε τέτοια ακραία επίπεδα αλατότητας (Wheaton και Lawson 1985).

Το pH του προϊόντος μειώθηκε κατά τη διάρκεια ωρίμανσης/αποθήκευσης, χωρίς ωστόσο να βρεθούν οξυγαλακτικά βακτήρια σε πληθυσμούς μεγαλύτερους των 10 cfu/g. Πιθανόν η πτώση του pH να οφείλεται σε αυτολυτικές διεργασίες, οι οποίες ως γνωστόν λαμβάνουν χώρα κατά την ωρίμανση τέτοιων προϊόντων (Filsinger 1987). Σημαντική μείωση κατά τις πρώτες μέρες στο pH διαπιστώθηκε και στο πείραμα των Hernández-Herrero M. M. et al. (2002), από 6,13 σε 5,72. Στη συνέχεια ακολούθησε σταθερή πορεία για τις υπόλοιπες βδομάδες. Η συγκέντρωση αλατιού προκαλεί αλλαγές, όχι μόνον στην ενεργότητα νερού, αλλά και στο pH (Rodríguez-Jerez et al. 1993).

Η επιμόλυνση με σταφυλόκοκκο είναι πολύ κοινή για τα τρόφιμα. Η ανταπόκρισή του και στις δύο φάσεις του πειράματος ήταν παρόμοια. Μικρή πρωτική τάση με αργό ρυθμό. Είναι εμφανές ότι τις πρώτες 24 και 28 μέρες αντίστοιχα η τιμή D και για τα δύο πειράματα ήταν μεγαλύτερη από των ημερών στο πέρας του πειράματος. Είναι γνωστό ότι ο *Staphylococcus aureus* έχει την ικανότητα να ανθίσταται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (Harvey and Gilmour 2000). Είναι τεκμηριωμένο ότι ο μικροοργανισμός αυτός μπορεί να αυξηθεί σε επίπεδα ενεργότητας νερού (a_w) τόσο χαμηλά όσο 0,83 με 0,84, ανάλογα με το προϊόν (Tatini et al. 1973). Για να προκληθεί κρούσμα τροφικής δηλητηρίασης, όπως προαναφέρθηκε, πρέπει ο *S. aureus* να πολλαπλασιαστεί σε πληθυσμό πάνω από 10^6 cfu/g (Tatini et al. 1973). Στο παρών πείραμα μετά από 45 και 43 μέρες οι πληθυσμοί του έχουν πέσει σε 3,03 και 2,54 log cfu/g αντίστοιχα. Σε παρόμοια μελέτη επιβίωσης του *Staphylococcus aureus* κατά την

ωρίμανση παστής σαρδέλας, οι πληθυσμοί του μειώθηκαν κάτω του επιπέδου ανίχνευσης έπειτα από 90 ημέρες ωρίμανσης στους 20°C (Arkoudelos et al. 2003).

Σε αντίθεση με τον αλατοάαντοχο *S. aureus*, η *Salmonella* sp. δεν φαίνεται να αντέχει σε υψηλά ποσοστά άλατος. Η μη δυνατότητα να ανθίσταται σε αυτά τα υψηλά ποσοστά άλατος, αλλά και η χαμηλή θερμοκρασία παραμονής του τροφίμου (15°C) οδήγησαν τους πληθυσμούς αυτούς σε γρήγορους ρυθμούς μείωσης. Σε πείραμα για την ωρίμανση παστής σαρδέλας, ο πληθυσμός έφτασε σε μη ανιχνεύσιμο επίπεδο μετά από 60 μέρες (Arkoudelos et al. 2003). Η διαφορά στα δύο πειράματα είναι η χαμηλότερη θερμοκρασία που τοποθετήθηκε το τρόφιμο, Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στην περίπτωση αλάτισης σε σαφρίδι σε δύο ομάδες με διαφορετικές περιεκτικότητες αλάτισης. Η πρώτη περιείχε 80% και η δεύτερη 30%. Η δράση των παθογόνων ξεκινούσε από 5 και 5,3 log cfu /g και αδρανοποιήθηκε σε 55 και 60 μέρες αντίστοιχα (Suhendan et al. 2010). Συμπεραίνουμε ότι το ποσοστό άλατος που χρησιμοποιείτε παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για τη θανάτωση του παθογόνου όσο και η θερμοκρασία στην οποία συντηρείται το τρόφιμο. Όσο υψηλότερο είναι το ποσοστό άλατος, τόσο χαμηλότερη είναι και η ενεργότητα νερού στο τρόφιμο (a_w). Ένας πληθυσμός που εμβολιάζεται με 5 log cfu /g *Salmonella* Typhimurium σε αλατισμένο περιβάλλον θα μπορούσε να επιβιώσει λιγότερες από 15 ημέρες σε επίπεδο ενεργότητας νερού (a_w) ίσο ή κάτω από 0,85 κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε θερμοκρασία $20 \pm 1,5$ °C (Wijnker et al. 2006).

Σύμφωνα με τον Huss (1995) τα κρίσιμα όρια για την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* είναι η θερμοκρασία πάνω από 1°C, τιμή pH πάνω από 5 και αλατότητα έως 10%. Όμως, έχει την ικανότητα να ανθίσταται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (Farber and Peterkin 1991). Στο παρόν πείραμα και μετά από τον εμβολιασμό, ξεκινάει με πληθυσμούς της τάξης των 4,62 και 4,85 log cfu/g. Η παραμονή όμως σε περιβάλλον με υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι και χαμηλή ενεργότητα νερού το οδήγησε σε πτώση κάτω του ορίου ανίχνευσης σε 17 και 24 μέρες αντίστοιχα.. Παρατηρήθηκε ότι η τιμή D ήταν 6,9 και 8,53 αντίστοιχα για κάθε περίπτωση διεξαγωγής του πειράματος. Δηλαδή μόλις σε 6,9 και 8,53 μέρες ο πληθυσμός πέφτει κατά ένα λογάριθμο. Σε πείραμα που έγινε σε σολωμό αποθηκευμένο στους 5 °C και με περιεκτικότητα σε αλάτι 3-5% ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* μειωνόταν έναν λογάριθμο κάθε εβδομάδα (Peterson et al., 1993). Σε

άλλες έρευνες με μικρότερα ποσοστά άλατος η οσμωτική καταπόνηση δεν ήταν ικανή από μόνη της να επιφέρει ταχεία θανάτωση (Shadbolt et al. 2000).

Υπό κανονικές συνθήκες η ενδογενής χλωρίδα των αλιευμάτων σε εύκρατα κλίματα, κατά βάση αποτελείται από Gram αρνητικούς βακίλους. Ο μεγαλύτερος αριθμός αυτών των βακίλων ανήκει στα γένη, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio* και *Aeromonas*. Οι Gram θετικοί μικροοργανισμοί κατά κανόνα ανήκουν στα γένη *Bacillus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* και *Clostridium*. Γενικότερα η αναλογία των Gram αρνητικών και Gram θετικών βακτηρίων ποικίλει. Κατά βάση τα κατά Gram θετικά βακτήρια κυμαίνονται από 0-30% της συνολικής χλωρίδας (ICMF 2000, Huss 1995)

Τα αποτελέσματά μας σχετίζονται με αυτά της παραπάνω έρευνας. Βρέθηκαν Gram θετικά βακτήρια σε ποσοστό 40% του αρχικού πληθυσμού του γένους *Eubacterium* και *Micrococcus* καθώς και Gram αρνητικά βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, *Moraxella* κτλ.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε αλατισμένες ρέγγες έχουν βρεθεί κόκκοι Gram θετική του γένους *Staphylococcus*. Επίσης έχουν ανιχνευτεί σταφυλόκοκκοι σε παστά ψάρια. Δεδομένου ότι ο *S. aureus*, δεν εμφανίζεται ως μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας των αλιευμάτων, πολύ πιθανή αιτία μόλυνσης να είναι οι συνθήκες χειρισμού από τους εργαζομένους (Vilhelmsson et al. 1997). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να είναι υπαίτιο για την παρουσία αποικιών σταφυλόκοκκου κατά την εικοστή πρώτη μέρα των μετρήσεών μας, ενώ στον αρχικό πληθυσμό δεν υπήρχαν ή υπήρχαν σε πολύ μικρούς πληθυσμούς και στην συνέχεια επειδή ευνοούνται σε συνθήκες με υψηλή αλατοπεριεκτικότητα έφθασαν σε μεγάλους πληθυσμούς.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αλάτιση του γαύρου δημιουργεί περιβάλλον στο οποίο οι παθογόνοι *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus* αδρανοποιούνται, με διαφορετικό ωστόσο ρυθμό. Τα υψηλά ποσοστά αλάτισης, σε συνδυασμό με την χαμηλή ενεργότητα νερού δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Προκαλούν όμως τη μείωσή τους, εκτός βέβαια από κάποιους αλατοάντοχους μικροοργανισμούς που μπορεί να διερευνηθούν σε μεταγενέστερη ερευνητική εργασία.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- **Arkoudelos J.S., Samaras F.J., Tassou C.C.** (2003). Survival of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis on Salted Sardines (*Sardina pilchardus*) during Ripening. *Journal of Food Protection* **66**: 1479–1481.
- **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 & Technology*, **46**: 887-895
- **Cormac G.M., Gahan, C.H.** (1999). The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **50**: 93-100.
- **Cox J,** (2000). *Salmonella*. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*, vol. 3, Academic Press, New York: pp. 1928–1937.
- **Davies A., Cristopher C., Jehanno D., Nychas G., Kirby R.** (2001). Incidence of foodborne pathogens on European. *Food Control*, **12**: 67-71.
- **Domingo L. J.,** (2007). Omega-3 fatty acids and the benefits of fish consumption: Is all that glitters gold? *Environment International*, **33**: 993–998.
- **Farber J.M., Peterkin P.I.,** (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, **55**: 476-511.
- **Filsinger B.E.,** (1987) Effect of pressure on the salting and ripening process of anchovies (*Engraulis anchoita*). *Journal of Food Science*, **52**: 919–921,927.
- **Gandhi M., Chikindas M.L.,** (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, **113**: 1-15.
- **Gounadaki A., Skandamis P.N., Drosinos, E.H., Nychas G.-J.E.** (2007). Effect of packaging and storage temperature on the survival of *Listeria monocytogenes* inoculated postprocessing on sliced salami. *Journal of Food Protection*, **70**: 2313-2320.

- **Gram L., Huss H.H.** (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, **33**: 121-137.
- **Gram, L., Trolle, G., 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.
- **Harrigan, W.F., McCance, M.E.** (1976). *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Revised edition prepared by W.F. Harrigan. Academic press: 100.
- **Harvey J, Gilmour A.** (2000). *Staphylococcus aureus*. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. vol. 3, Academic Press, New York: 2066–2071.
- **Hernández-Herrero M.M., Roig-Sagués A.X., López-Sabater E.I. Rodríguez-Jerez J.J., Mora-Ventura M.T.** (1999). Total Volatile Basic Nitrogen and other Physicochemical and Microbiological Characteristics as Related to Ripening of Salted Anchovies. *Journal of Food Science*, **64**:344-347.
- **Horner, W.F.A.** (1997). *Canning Fish and Fish Products*. Fish processing technology, edited by Hall, G.M., 2nd edition. Blackie Academic and Professional, London pp 32-73.
- **Horst K., Roepstor A., Huss, H.H., Bloemsma B.** (1995). Survival of Anisakis larval in marinated herring pellets. *International Journal of Food Science Technology*, **29**: 661-670.
- **Hugh R., Leifson E.** (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, **66**: 24-26.
- **Huss H.H.** (1995) Assurance of seafood quality. *FAO Fisheries Technical Paper No 334*, FAO, Rome.
- **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 Food Vol 6. Microbial Ecology of Food Communities*. Blackie Academic and Professional. London.

- **Lupin M., Boeri L., Moschiar M.** (1981). Water activity and salt content relationship in moist salted fish products. *Journal of Food Technology*, **16**: 31-38.
- **Ozogul F., Gokbulut C., Ozyurt G., Ozogul Y., Dural M.** (2004). Quality assessment of gutted wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice, cling film and aluminium foil. *European Food Research and Technology*, **220**: 292-298.
- **Peterson M.E., Pelroy G.A., Paranjpye R.M., Poysky F.T., Almond J.S., Eklund M.W.** (1993) Parameters for control of *Listeria monocytogenes* in smoked fishery products: sodium chloride and packaging method. *Journal of Food Protection*, **56**: 938-943.
- **Roberts T.A., (Chairman), Baird-Parker A.C., Tompkin R.B.** (1996). ICMSF Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens, Blackie Academic & Professional.
- **Stergiou K.I., Cristou E.D., Georgakopoulos A.Z., Souvermezoglou C.** (1997). The Hellenic Seas: physics, chemistry, biology and fisheries. *Oceanography Marine Biology: an Annual Review*, **35**: 415-538.
- **Vilhelmsson O., Hafsteinsson H., Kristjansson K.J.** (1997). Extremely halotolerant bacteria characteristic of fully cured and dried cod. *International Journal of Food Microbiology*, **36**: 163-170
- **Villar M., Ruiz Holgado A., Sanchez J., Trucco R., Oliver G.** (1984). Isolation and Characterization of *Pediococcus halophilus* from Salted Anchovies (*Engraulis anchoita*). *Applied and Environmental Microbiology*, **49**: 664-666.
- **Wheaton F.W., Lawson T.B.** (1985). Other preservation methods. In *Processing Aquatic Food Products*, p. 273-328. John Wiley & Sons, New York.

6.2. Ελληνική βιβλιογραφία

- **Ανανιάδη Κ.** (1961). Θαλασσινή Εγκυκλοπαίδεια, Τόμος Γ, σελ. 436, Αθήνα.

- **Αρβανιτογιάννης Σ. Ι. και Τζούρος Η. Ν.** (2004). Επιλογή, Συντήρηση και Μεταχείριση Τροφίμων. Οδηγός Καταναλωτή για Ασφαλή Μεταχείριση Τροφίμων. Εκδόσεις Σταμούλη: 145:147.
- **Μαχιάς Α., Γιαννουλάκη Μ., Σωμαράκης Σ., Τσαγκαράκης Κ., Σιαπάτης Α., Σταματάκη Χ., Καλλιανιώτης Α., Παπακωσταντίνου Κ.** (2007). Εκτίμηση της Βιομάζας των Αποθεμάτων του Γαύρου και την Σαρδέλας στο Αιγαίο με την Ακουστική Μέθοδο (2003 - 2006). Υδάτινοι Βιολογικοί Πόροι και Οικοσυστήματα. Πρακτικά 13^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Ιχθυολόγων.
- **Μποζιάρης Ι.** (2009). Επιστήμη και Τεχνολογία Αλιευμάτων. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 101-106.
- **Μποζιάρης Ι.** (2009). Υγιεινή και Συντήρηση Εδώδιμων Αλιευμάτων. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 127-131.
- **Νεοφύτου Ν. Χ.** (1997). Φυσικοχημικές Ιδιότητες των Ρέοντων Υδάτων. Ιχθυολογία. Εκδόσεις University studio press, Θεσσαλονίκη, 21-36.
- **Παπαναστασίου Π. Δ.** (1976). Τεχνολογία και Ποιοτικός Έλεγχος Αλιευμάτων, Α και Β τόμος. Εκδόσεις ΙΩΝ, Αθήνα.
- **Σάββα Μ.** (2010). Μικροβιακή χλωρίδα των γονάδων του αχινού και η επίδρασή της στον εμπορικό χρόνο ζωής κατά την συντήρησή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.

6.3. Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

- <http://www.fishbase.org> (2011)
- <http://www.oxid.com> (2011)
- <http://www.statistics.gr> (ΕΛ.ΣΤΑΤ 2011)

ABSTRACT

In the present study the fate of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis during the ripening-storage of salted anchovy was monitored. The anchovy (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758) was purchased from the local market of Volos. Upon arrival in the laboratory, the anchovy was gutted, de-headed, the central bone was removed and it was placed for two (2) hours in tap water. Inoculation with *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis PT4, with initial population level of about 5×10^5 cfu/g, took place. Subsequently the anchovy was salted in layers using coarse salt in quantity equal to the weight of the fish. Then the products were stored at 15°C for 45 days. The experiment was carried out in two replicates (batches). Enumeration of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in Petri Baird-Parker, Palcam and XLD, respectively, was carried out. Populations of lactic acid bacteria in MRS, yeasts-fungi in RBC and the total population in TSA, TSA 2.5% NaCl and TSA 5% NaCl were also monitored. Finally the composition of predominant initial, middle and final microbial flora, was investigated using traditional methodology. In the first batch the counts on MRS, and RBC were below the detection level of enumeration, while the populations on TSA, TSA 2.5% NaCl and TSA 5% NaCl were initially up to 5.5 log cfu/g until the third day and then were dropped down to 3 log cfu/g and remained there throughout the experiment duration. In the second anchovy batch, the measured TSA was 2.5% NaCl and the population started and continued at 3 log cfu/g throughout the experiment. The behavior of pathogens in both replicated batches of the experiment was identical. The decimal reduction time (D values) of *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* was 6.0, 10.3 and 24.5 days respectively. The populations of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* decreased below 2 log cfu/g after a lapse of 14 and 28 days respectively, while *Staphylococcus aureus* at the end of the experiment (45 days) had a population level of 2.5 log cfu/g. The salting of anchovy creates an environment in which pathogenic *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* inactivated, but with different death rates.

Keywords: salting, anchovies, *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus*

ПАРПТНМА

**Παρουσίαση προπτυχιακής εργασίας στο 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Τροφίμων
της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας.**

Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών κατά την ωρίμανση-αποθήκευση παστού γάου

Μακρυγιάννης Αλέξανδρος, Μποζιάρης Ιωάννης Σ. *

Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Φυτόκο, 38446, Ν. Ιωνία Βόλου

e-mail: boziaris@uth.gr

* Συγγραφέας επικοινωνίας. Διεύθυνση: Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Οδός

Φυτόκου, 38446, Νέα Ιωνία Μαγνησίας, Βόλος, Ελλάδα, Τηλ: +30-24210-93153. Φαξ: +30-24210-93157. e-mail: boziaris@uth.gr

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση της τύχης των *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* Enteritidis κατά την ωρίμανση-αποθήκευση παστού γαύρου. Ο γάυρος (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758) προμηθεύτηκε από την αγορά του Βόλου. Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε εκσπλαχνισμός, αποκεφαλισμός, αφαίρεση του κεντρικού οστού και τοποθέτηση για 2 ώρες σε νερό. Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* Enteritidis PT4, με επίπεδο πληθυσμού 5×10^4 cfu/g. Οι μικροοργανισμοί προσφέρθηκαν από την συλλογή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε η αλάτιση χρησιμοποιώντας χονδρό αλάτι ίσο με το βάρος των ψαριών, σε στρώσεις. Το προϊόν αποθηκεύθηκε στους 15°C για 45 ημέρες. Απαριθμήθηκαν οι *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* Enteritidis πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία Baird-Parker, Palcam και XLD αντίστοιχα, καθώς και οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS, ζύμες-μύκητες σε RBC και ο συνολικός πληθυσμός σε TSA, TSA 5% NaCl και TSA 15% NaCl. Οι πληθυσμοί στα MRS, RBC και TSA 15% NaCl ήταν κάτω από το ελάχιστο επίπεδο απαρίθμησης, ενώ οι πληθυσμοί στο TSA και TSA 5% NaCl κυμάνθηκαν περί τα 3 log cfu/g σε όλη την διάρκεια του πειράματος. Οι τιμές υποδεκαπλασιασμού των *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus* ήταν 6,0, 10,3, και 24,5 ημέρες αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί της *Salmonella* Enteritidis και *Listeria monocytogenes* μειώθηκαν κάτω από 2 log cfu/g

μετά από παρέλευση 14 και 28 ημερών αντίστοιχα, ενώ ο *Staphylococcus aureus* στο πέρας του πειράματος (45 ημέρες) είχε συγκέντρωση 2,5 log cfu/g. Η αλάτιση του γαύρου δημιουργεί περιβάλλον στο οποίο οι παθογόνοι *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus* αδρανοποιούνται, με διαφορετικό ωστόσο ρυθμό. Η ποιότητα της πρώτης ύλης είναι σημαντική για την επίτευξη ασφαλούς τελικού προϊόντος.

Λέξεις κλειδιά: αλάτιση, γάυρος, *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus*

Εισαγωγή

Ο γαύρος ή γάβρος είναι ψάρι, γνωστό ήδη από την αρχαιότητα. Είναι η «αφή» των αρχαίων Ελλήνων. Επίσης είναι γνωστό και με το όνομα αντζούγια ή και χαψί (από τη τούρκικη ονομασία του). Το επίσημο όνομά του είναι "εγγραυλίσ η εγκρασίχολος" (*Engraulis encrasicolus*) και ανήκει στην οικογένεια εγγραυλίδες (Engraulidae). Τα είδη *Engraulis encrasicolus*, γαύρος και το *Sardina pilchardus*, σαρδέλα, συνιστούν δύο από τα πιο σημαντικά είδη μικρών πελαγικών στις ελληνικές θάλασσες καθώς η παραγωγή τους ανέρχεται στο 30% των συνολικών εκφορτώσεων (Stergiou et al. 1997).

Η σάρκα των ιχθύων υποστηρίζει την μικροβιακή ανάπτυξη περισσότερο από ότι το κρέας των θηλαστικών της στεριάς και αυτό οφείλεται: α) στην ποικιλόθερμη φύση των ψαριών, β) στο υψηλό pH της σάρκας των αλιευμάτων ($\text{pH} > 6$), γ) στη υψηλή ποσότητα του μη πρωτεϊνικού αζώτου NPN και γ) στο χαμηλό ποσοστό υδατανθράκων (0,5 %) που περιέχεται στον μυϊκό ιστό των αλιευμάτων καθώς συνεπώς στην μικρή μεταθανάτια συγκέντρωση του γαλακτικού οξέως (Gram and Huss 1996).

Η *L. monocytogenes* είναι ένας ψυχρότροφος παθογόνος μικροοργανισμός με μεγάλη διάδοση στη φύση, που τα τελευταία χρόνια απασχολεί ιδιαίτερα τη βιομηχανία τροφίμων, καθώς ο αποτελεσματικός έλεγχος της στα τρόφιμα δυσχεραίνεται εξαιτίας της σχετικά μεγάλης ανθεκτικότητας της σε παρεμποδιστικές συνθήκες όπως χαμηλό pH, a_w και θερμοκρασίες ψύξης (Farber and Peterkin 1991). Το γένος *Salmonella* είναι δυνατόν να βρεθεί στα αλιευτικά προϊόντα τα οποία έχουν επιμολυνθεί είτε από μολυσμένα νερά είτε από κακές πρακτικές υγιεινής κατά τους χειρισμούς μετά την

αλίευση. Ο *Staphylococcus aureus* (χρυσίζων σταφυλόκοκκος) είναι Gram θετικός τοξινογόνος μικροοργανισμός ο οποίος μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε συνθήκες χαμηλής ενεργότητας νερού/υψηλής αλατότητας. Μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε a_w 0,83 και να παράγει τοξίνη σε a_w 0,86. Για να προκληθεί τροφική δηλητηρίαση πρέπει ο *S. aureus* να πολλαπλασιαστεί σε πληθυσμό μεγαλύτερο από 10^6 κύτταρα/g. Η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του είναι 7°C. Οι εργαζόμενοι αποτελούν σημαντική πηγή επιμόλυνσης από αυτόν τον μικροοργανισμό (Harvey and Gilmour 2000).

Το αλάτισμα των τροφίμων αποτελεί μία από τις αρχαιότερες μεθόδους συντήρησης που μπορεί να εφαρμοσθεί μόνη της ή και σε συνδυασμό με άλλες. Το πάστωμα των ψαριών και κυρίως του γαύρου και της σαρδέλας είναι μια μέθοδος συντήρησης που χρησιμοποιείται στις Μεσογειακές χώρες (Vieites et al. 1997). Η αντιμικροβιακή δράση του αλάτος οφείλεται στην μείωση της ενεργότητας νερού αλλά και στις αντισηπτικές ιδιότητες των ιόντων χλωρίου (Jay 2005).

Σκοπός της εργασίας ήταν η παρακολούθηση της τύχης των *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* Enteritidis κατά την ωρίμανση-αποθήκευση παστού γαύρου.

Υλικά και μέθοδοι

Ο γαύρος (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758) προμηθεύτηκε από την αγορά του Βόλου. Μεταφέρθηκε άμεσα στο εργαστήριο όπου πραγματοποιήθηκε εκσπλαχνισμός, αποκεφαλισμός, αφαίρεση του κεντρικού οστού και τοποθέτηση για 2 ώρες σε καθαρό νερό. Κατόπιν η ποσότητα χωρίστηκε σε 4 παρτίδες. Κάθε μία από τις 3 πρώτες παρτίδες επιμολύνθηκε με *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και

Salmonella Enteritidis, με επίπεδο πληθυσμού 5×10^4 cfu/g. Ακολούθησε η αλάτιση όπου χρησιμοποιήθηκε χονδρό αλάτι ίσο με το βάρος των ψαριών. Τα ψάρια και το αλάτι τοποθετήθηκαν σε στρώσεις εναλλάξ. Το προϊόν αποθηκεύθηκε στους 15°C για 45 ημέρες. Από τις πρώτες 3 παρτίδες πραγματοποιήθηκε απαρίθμηση *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* Enteritidis σε τρυβλία Baird-Parker agar with Egg Yolk, Palcam agar και XLD (xylose, lysine deoxycholate) agar αντίστοιχα. Από την 4^η παρτίδα πραγματοποιούνταν απαρίθμηση σε TSA (Tryptone Soy agar), TSA 5% NaCl, TSA 15% NaCl, MRS (Mann-Rogosa, Sharp) Agar και RBC (Rose Bengal Chloroamphenicol) Agar. Όλα τα μικροβιολογικά υλικά προμηθεύτηκαν από την εταιρεία LAB M (Lancashire, UK).

Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν ασηπτικά 5 g από τη σάρκα του γαύρου εις διπλούν, τα οποία τοποθετούνταν σε αποστειρωμένη σακούλα και προσθέτονταν 45 ml αποστειρωμένου Maximum Recovery Diluent (MRD-NaCl 0,85%, peptone 0,1%). Πραγματοποιείτο ομογενοποίηση του δείγματος σε συσκευή τύπου Stomacher για 1 min, διαδοχικές αραιώσεις σε MRD και επίστρωση σε τρυβλία εις διπλούν, εκτός του MRS όπου πραγματοποιήθηκε ενσωμάτωση. Οι θερμοκρασίες επώασης ήταν 37°C για τα τρυβλία XLD και Baird-Parker, 30°C για τα Palcam και MRS και 25°C για τα RBC, TSA (Tryptone Soy agar), TSA 5% NaCl, TSA και 15% NaCl. Επιπλέον ως pH της σάρκας λαμβάνονταν συμβατικά το pH του υδατικού εναιωρήματος που παρασκευάζονταν με διαλυτοποίηση 2 g σάρκας του γαύρου σε 10 ml απιονισμένο νερό.

Αποτελέσματα

Οι πληθυσμοί στα MRS, RBC και TSA 15% NaCl ήταν κάτω από το ελάχιστο επίπεδο απαρίθμησης (10 cfu/g για το MRS και 100 cfu/g για το RBC και το TSA 15% NaCl), ενώ οι πληθυσμοί στο TSA και TSA 5% NaCl κυμάνθηκαν περί τα 3 log cfu/g σε όλη την διάρκεια του πειράματος. Οι μεταβολές του πληθυσμού των παθογόνων μικροοργανισμών *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus* κατά την διάρκεια της ωρίμανσης-αποθήκευσης στους 15°C, παρουσιάζονται στο Γράφημα 1. Ο πιο ευαίσθητος μικροοργανισμός στις παρούσες συνθήκες ήταν η *Salmonella* Enteritidis, ακολουθούσε η *Listeria monocytogenes*, ενώ ο πιο ανθεκτικός ήταν ο *Staphylococcus aureus*. Πράγματι οι πληθυσμοί της *Salmonella* Enteritidis και *Listeria monocytogenes* μειώθηκαν κάτω από 2 log cfu/g μετά από παρέλευση 14 και 28 ημερών αντίστοιχα, ενώ ο *Staphylococcus aureus* στο πέρας του πειράματος (45 ημέρες) είχε πληθυσμό 2,5 log cfu/g. Οι τιμές υποδεκαπλασιασμού των *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus* ήταν 6,0, 10,3, και 24,5 ημέρες αντίστοιχα. Η pH του προϊόντος μειώθηκε κατά 0.5 περίπου στην διάρκεια των 45 ημερών αποθήκευσης/ωρίμανσης στους 15°C (Γράφημα 2).

Συζήτηση

Η αλάτιση αποτελεί παραδοσιακή μέθοδο συντήρησης των αλιευμάτων. Η προσθήκη άλατος μειώνει την ενεργότητα νερού και δημιουργεί συνθήκες τέτοιες ώστε οι μικροοργανισμοί παρεμποδίζονται ή/και αδρανοποιούνται. Ο *Staphylococcus aureus* βρέθηκε να είναι ο πιο ανθεκτικός μικροοργανισμός σε σχέση με την *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* Enteritidis. Είναι γνωστό ότι ο *Staphylococcus aureus* έχει την ικανότητα να ανθίσταται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (Harvey

and Gilmour 2000), όπως και η *Listeria monocytogenes* (Farber and Peterkin 1991). Αντίθετα η *Salmonella* είναι ευαίσθητη σε συνθήκες υψηλής αλατότητας (Cox 2000). Σε παρόμοια μελέτη επιβίωσης *Staphylococcus aureus* και *Salmonella* Enteritidis κατά την ωρίμανση παστής σαρδέλας οι πληθυσμοί μειώθηκαν κάτω του επιπέδου ανίχνευσης έπειτα από 80 και 60 ημέρες ωρίμανσης στους 20°C (Arkoudelos et al. 2003).

Η μικροβιακή χλωρίδα που αναπτύχθηκε στο TSA 5% δεν μεταβλήθηκε κατά την διάρκεια των 45 ημερών της ωρίμανσης/αποθήκευση στους 15°C. Πιθανόν να οφείλεται σε αλατο-άντοχους μικροοργανισμούς. Ο χαρακτηρισμός αυτών των μικροοργανισμών μπορεί να αποτελέσει αντικείμενο μια μελλοντικής μελέτης. Στο TSA 15% NaCl δεν βρέθηκαν πληθυσμοί πάνω από 100 cfu/g. Προφανώς οι πληθυσμοί αλόφιλων μικροοργανισμών ήταν χαμηλοί στο εν-λόγο προϊόν. Το pH του προϊόντος μειώθηκε κατά την διάρκεια ωρίμανσης/αποθήκευση, χωρίς ωστόσο να βρεθούν οξυγαλακτικά βακτήρια σε πληθυσμούς μεγαλύτερους των 10 cfu/g. Πιθανόν η πτώση του pH να οφείλεται σε αυτολυτικές διεργασίες οι οποίες είναι γνωστό ότι λαμβάνουν χώρα κατά την ωρίμανση τέτοιων προϊόντων (Filsinger 1987).

Συμπεράσματα

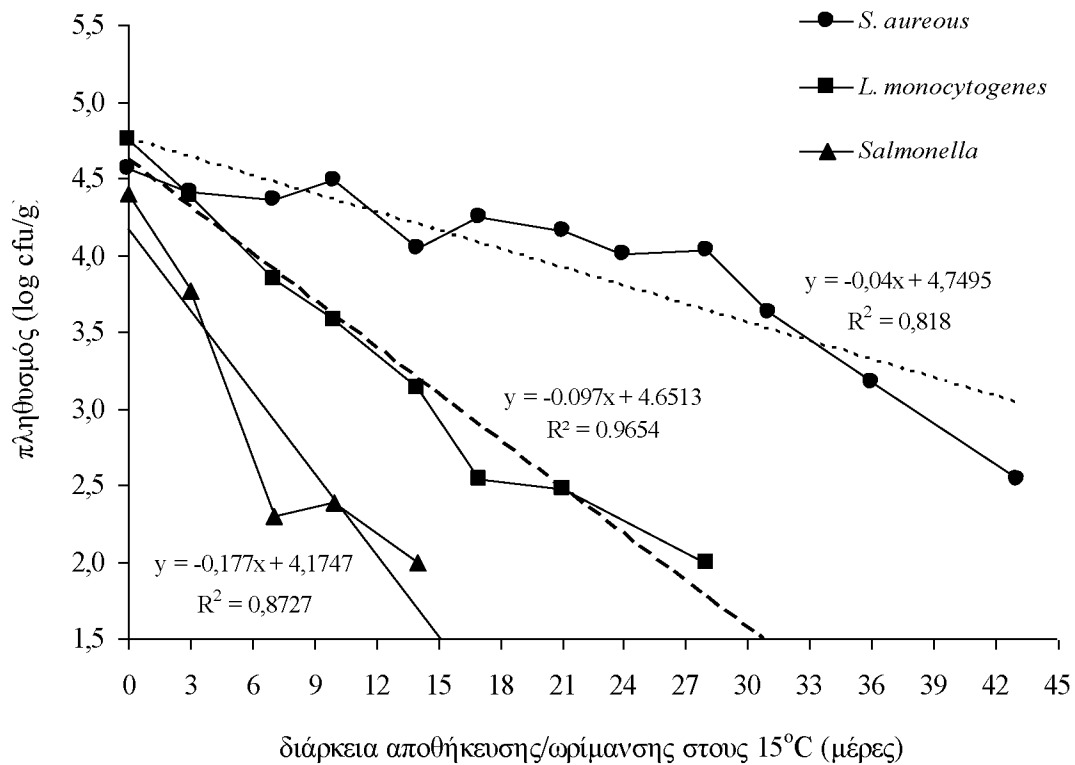
Η αλάτιση του γαύρου δημιουργεί περιβάλλον στο οποίο οι παθογόνοι *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus* αδρανοποιούνται, με διαφορετικό ωστόσο ρυθμό. Η ποιότητα της πρώτης ύλης είναι σημαντική για την επίτευξη ασφαλούς τελικού προϊόντος.

Βιβλιογραφία

- Arkoudelos JS, Samaras FJ, Tassou CC (2003) Survival of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis on Salted Sardines (*Sardina pilchardus*) during Ripening. J Food Prot 66: 1479–1481.
- Cox J (2000) Salmonella. In: Encyclopedia of Food Microbiology. vol. 3, Academic Press, New York: pp. 1928–1937.
- Farber JM, Peterkin PI (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Rev 55: 476-511.
- Filsinger BE (1987) Effect of pressure on the salting and ripening process of anchovies (*Engraulis anchoita*). J Food Sci 52: 919–921,927.
- Gram L, Huss HH (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. Int J Food Microbiol 33: 121-137.
- Hammack TS, Andrews WH (2000) Salmonella enteritidis. In: Encyclopedia of Food Microbiology. vol. 3, Academic Press, New York: pp. 1937–1943.
- Harvey J, Gilmour A (2000) Staphylococcus aureus. In: Encyclopedia of Food Microbiology. vol. 3, Academic Press, New York: 2066–2071.
- Jay JM (2005) Modern Food Microbiology. 7th ed., Van Nostrand Reinhold, New York.
- Stergiou KI, Cristou ED, Georgakopoulos AZ, Souvermezoglou C (1997) The Hellenic Seas: physics, chemistry, biology and fisheries. Ocean. Mar Biol 35: 415-538.

Vieites JM, Delgado ML, Leira F (1997) Monitoring the proteolytic activity in ripening anchovies (*Engraulis encrasicolus*). Ital J Food Sci 2: 127–132.

Γράφημα 1. Μεταβολές πληθυσμού των *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus* κατά την διάρκεια της ωρίμανσης-αποθήκευσης παστού γαύρου στους 15°C. Το κάθε σημείο αποτελεί το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.



Γράφημα 2. Μεταβολή του pH του προϊόντος π κατά την διάρκεια της ωρίμανσης-αποθήκευσης παστού γάουρου στους 15°C. Το κάθε σημείο αποτελεί το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

